

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 la polyphénol  
oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L)**

---

**Présenté par :**

-Mme.Benchaoui Hadjira  
-Mlle.Maache Hadjira

**Devant le jury :**

**Président(e) :** Mr Gouzi Hicham (MCA).

**Rapporteur :** Mr Benaceur Farouk (MAB).

**Examineur:** Mr Leboukh Mourad (MAB).

**Soutenu publiquement le : juin 2016**

## *Dédicaces*

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :*

*A la mémoire de mon père*

*A ma mère*

*A mes frères*

*A mes sœurs*

*A mon mari*

*A mes enfants*

*A toute ma famille*

*A tous mes amis.*

*Hadjira . B*

## *Dédicaces*

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je  
dedie :*

*A la mémoire de mon père*

*A ma mère*

*A mes frères*

*A mes sœurs*

*A mon fiancé*

*A toute ma famille*

*A tous mes amis.*

*Hadjira. M*

## *Remerciements*

*Tout d'abord, louange à Dieu qui nous a donné la santé, la force et le courage dans la vie et tout au long de notre cycle d'étude.*

*Nous remercierons tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, et en particulier notre encadreur M. FAROUK BENACEUR (Enseignant-Chercheur à l'Université Amar Telidji de Laghouat), pour ses efforts scientifiques, sa disponibilité, et ses conseils durant la réalisation de ce projet de recherche.*

*On remercie également M. Hicham GOUZI pour sa précieuse collaboration.*

*Sans oublier M. MOURAD LABOUKH et M. Rachid CHAIBI pour leur soutien et encouragement.*

*Nous tenons également à exprimer nos remerciements à tous les membres du jury, désignés parmi les enseignants du département de Biologie, université de Laghouat, d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*En fin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.*

***Benchaoui et Maache***

# Sommaire

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1. Synthèse bibliographique .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Les dattes Deglet Nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Généralités sur le palmier dattier.....	2
1.1.2 La classification botanique.....	2
1.1.3 Ecologie.....	3
1.1.4 Cycle biologique du palmier dattier.....	3
1.1.5 La datte.....	3
1.1.5.1 Définition.....	3
1.1.5.2 Formation et maturation de la datte.....	5
1.1.5.3 Les variétés des dattes.....	6
1.1.5.4 Classification des dattes.....	6
1.1.5.5 Composition biochimique de la datte.....	7
1.1.5.6 Les enzymes des dattes.....	7
1.1.6 La répartition de Deglet Nour en Algérie.....	8
1.1.7 Production mondiale des dattes .....	9
1.1.8 Utilisation des dates et de palmier dattier.....	9
1.1.9 Le brunissement enzymatique des dattes.....	10
<b>1.2 La polyphénol oxydase.....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Historique et perspectives .....	12
1.2.2 Définition, nomenclature et classification .....	12
1.1.2.1 Définition.....	12
1.1.2.2 Classification et Nomenclature .....	12
1.2.2.2.1 Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1).....	13
1.2.2.2.2 Activité <i>o</i> -diphénoloxydase (EC 1.10.3.1).....	13
1.2.3 Structure moléculaire et site actif .....	14
1.2.3.1 Structure moléculaire .....	14
1.2.3.2 Site actif .....	14
1.2. 4.Distribution, localisation subcellulaire, et rôle physiologique .....	16
1..24.1 Distribution et localisation subcellulaire.....	16
1.2.4.2 Rôle physiologique .....	16
1.2.5 Mécanisme catalytique de la polyphénol oxydase .....	17

1.2.6 Extraction de la polyphénol oxydase.....	18
1.2.7 Les méthodes de détermination de l'activité PPO.....	21
1.2.8 Effet du pH sur l'activité PPO.....	22
1.2.9 Effet de la température sur l'activité PPO.....	22
1.2.10 Les substrats de la PPO .....	22
1.2.11 Application de la PPO .....	23
<b>Chapitre 2. Matériels et méthodes.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Matériels.....</b>	<b>25</b>
2.1.1 Matériels biologique.....	25
2.1.2 Produits chimiques.....	25
<b>2.2 Méthodes.....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Extraction de la PPO.....	25
2.2.2 Mesure de l'activité catécholase de la PPO.....	26
2.2.3 Effet de la concentration de l'enzyme.....	27
2.2.4 Détermination des paramètres cinétiques de l'activité catécholase de la PPO.....	27
2.2.5 Effet du pH sur l'activité catécholase de la PPO.....	27
2.2.6 Etude de la stabilité thermique de l'activité catécholase de la PPO.....	27
2.2.7 Analyse des résultats expérimentaux	28
<b>Chapitre 3. Résultats et discussion.....</b>	<b>29</b>
3.1 Extraction de la polyphénol oxydase de Deglet Nour ( <i>Phoenix dactylifera</i> L) .....	29
3.2 Les propriétés biochimiques de l'activité catécholase de la PPO.....	30
3.2.1 Effet de la concentration de l'enzyme .....	30
3.2.2 Détermination des paramètres cinétiques.....	31
3.2.3 Effet du pH.....	34
3.2.4 Etude de la stabilité thermique.....	36
<b>Chapitre 4. Conclusion.....</b>	<b>39</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>40</b>

## *Liste des abréviations*

<b>PPO</b>	Polyphénol oxydase
<b>EC</b>	Enzyme commission
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidone
<b>SDS</b>	Sodium dodécyl sulfate
<b>PVPP</b>	Polyvinylpolypyrrolidone
<b>DIECA</b>	Diéthylthiocarbamate de sodium
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>DOPA</b>	3,4-dihydroxy phénylalanine
<b>UE</b>	Unité enzymatique
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis Menten
<b>V<sub>max</sub></b>	Vitesse maximale
<b>AR</b>	Activité enzymatique résiduelle
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficient de corrélation
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>A<sub>0</sub></b>	Activité enzymatique initiale
<b>A<sub>t</sub></b>	Activité après traitement thermique à l'instant t

## *Liste des figures*

	<b>Pages</b>
<b>Figure 1 :</b> Datte et noyau du palmier dattier (Buelguedj, 2001).	<b>4</b>
<b>Figure 2 :</b> Une coupe réelle au niveau de datte (Chibane, 2008).	<b>4</b>
<b>Figure 3 :</b> Classification des dattes (Estanove, 1990).	<b>7</b>
<b>Figure 4 :</b> La répartition des cultivars de palmier dattier ( <i>Phoenix dactylifera L.</i> ) dans le Sud Algérien (Bennaceur et al., 1991).	<b>9</b>
<b>Figure 5 :</b> Schéma des deux réactions catalysées par la polyphénol oxydase.	<b>13</b>
<b>Figure 6 :</b> Structure de la tyrosinase des procaryotes proposée par (Sendovski et al., 2010). Les ions de cuivre dans le site actif sont colorés en marron.	<b>15</b>
<b>Figure 7 :</b> Site actif de la tyrosinase	<b>15</b>
<b>Figure 8 :</b> Schéma illustrant le mécanisme catalytique de l'activité catécholase de la PPO	<b>18</b>
<b>Figure 9 :</b> Deglet Nour ( <i>Phoenix dactylifera L.</i> )	<b>25</b>
<b>Figure 10 :</b> Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la catéchol par l'extrait brut de la PPO de <i>Phoenix dactylifera L.</i> (catéchol 40 mM, volume de l'extrait enzymatique 20 µl, tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.6, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1 ml)	<b>26</b>
<b>Figure 11 :</b> Protocole d'extraction de la polyphénol oxydase à partir de Deglet Nour ( <i>Phoenix dactylifera L.</i> ).	<b>29</b>
<b>Figure 12 :</b> Effet de la concentration de la catéchol oxydase de Deglet Nour ( <i>Phoenix dactylifera L.</i> ) sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 5.7 ; 30°C ; catéchol 40 mM)	<b>30</b>
<b>Figure 13 :</b> Effet de la concentration du catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par la catéchol oxydase de Deglet Nour (tampon acétate 0.05 M-pH 5.6, 30°C, enzyme 20 µl) : (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.	<b>32</b>
<b>Figure 14 :</b> Variation de l'activité enzymatique de la PPO des dattes Deglet Nour en fonction de pH (en présence de pyrocatéchol comme substrat)	<b>35</b>
<b>Figure 15 :</b> Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes Deglet Nour ( <i>Phoenix dactylifera L.</i> ) après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrocatéchol comme substrat)	<b>37</b>

## *Liste des tableaux*

	<b>Pages</b>
<b>Tableau 1:</b> Stades de développement des dattes (Djerbi, 1994).	<b>5</b>
<b>Tableau 2</b> les valeurs de pH optimal de la PPO obtenue à partir de différentes sources végétales.	<b>34</b>
<b>Tableau 3</b> Paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origine végétale	<b>36</b>

# *Introduction*

La datte, (*Phoenixdactylifera*L.), est le fruit de palmier dattier produit dans les régions sahariennes et considéré comme aliment de grande importance pour la population habitant ces régions. La variété Deglet Nour pour sa haute qualité nutritionnelle et son appréciation à travers le monde est la plus commercialisée à l'échelle nationale et internationale.

Les enzymes jouent un rôle très important dans le processus de conversion qui se déroule durant le développement et de maturation des dattes. Parmi ces enzymes la polyphénol oxydase et/ Ou PPO.

En présence de l'oxygène moléculaire, la PPO présente deux activités différentes, elle est capable d'hydroxyler 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 catécholasiqque 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 des 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 d'une source originale et locale « Deglet Nour » et ceci via la détermination des conditions optimales de la PPO

Dans le premier chapitre nous présenterons une synthèse bibliographique sur les dattes et une partie sur la PPO. Les procédures expérimentales utilisées seront détaillées dans le deuxième chapitre, tandis que pour le troisième chapitre nous présentant nos résultats avec une discussion.

Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO, sont regroupées dans le dernier chapitre.

# *Synthèse bibliographique*

## 1.1 Les dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L)

### 1.1.1 Généralités sur le palmier dattier

Le palmier dattier : *Phoenix dactylifera* L., provient du mot (*Phoenix*) qui signifie dattier chez les phéniciens, et *dactylifera* dérive du terme grec (*dactulos*) signifiant doigt, allusion faite à la forme du fruit (Djerbi, 1994).

C'est une espèce arborescente connue pour son adaptation aux conditions climatiques trop sévères des régions chaudes et sèches (Bouguederi et *al.*, 1994 ).

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).

Le dattier c'est une espèce dioïque, monocotylédone arborescente, appartenant à une grande famille d'arbres à palmes et produit des dattes (Gilles, 2000; Mazoyer, 2002).

Il s'agit d'une herbe géante qui s'élève à plus de 20 mètres de haut : un stipe élancé, plutôt qu'un vrai tronc, sans cerne de croissance, terminé par un unique bourgeon d'où émerge un panache de longues feuilles pennées de 5 à 6 mètres de long. Il ne porte jamais de branches : le long du stipe, on distingue les cicatrices foliaires, trace des palmes sèches. C'est seulement au bout de quatre à cinq ans, quand il fleurit et que les spathes éclatent laissant apparaître une grande quantité de fleurs, qu'on reconnaît l'arbre mâle de l'arbre femelle. Ses fruits les dattes, se présentent en énormes grappes, les régimes, formés de très nombreuses branchettes. En effet, il suffit d'un noyau semé pour donner une pousse, mais de nombreux rejets vont envahir la base du stipe qu'il faudra ensuite élaguer (Brac de la Perrière, 1995). L'entretien seul assure son allure au dattier. L'intervention de l'homme s'avère indispensable à toutes les étapes de sa croissance. C'est donc bien d'un arbre domestiqué qu'il s'agit (Benchelah et Maka, 2006).

### 1.1.2 La classification botanique

La place du palmier dattier dans le règne végétal est rappelée ci-dessous (Feldman, 1976) :

Groupe : Spadiciflores

Ordre : Palmale

Famille : Palmacées

Sous famille : Coryphoïdées

Tribu : Phoenicées

Genre : *Phoenix*

Espèce : *Dactylifera* L.

Le genre Phoenix comporte au moins douze espèces, la plus connue est le *dactylifera*, dont les fruits " dattes " font l'objet d'un commerce international important (Espiard, 2002).

### 1.1.3 Ecologie

Les palmiers sont de la famille des palmacées ou acéracées. Les palmiers sont à l'origine, des arbres des régions tropicales humides, mais au cours des âges, ils se sont adaptés aux climats chauds, semi-arides ou arides.

En Afrique subsaharienne, cette famille est largement représentée, au Sahara, on n'en rencontre que deux espèces, d'une importance économique majeure, *Hyphaene thébaïca*, le palmier doum, *Phoenix dactylifera*, le palmier dattier (Benchelah et Maka, 2006).

Les palmiers dattiers sont cultivés comme arbres fruitiers dans les climats cités. Ces arbres peuvent s'adapter à de nombreuses conditions grâce à leur grande variabilité (Gilles, 2000).

Elles sont connues : une température constante supérieure à 30°C (espèces thermophile) pendant la maturation, une forte luminosité, une humidité relative faible, surtout pas de pluie sur les fruits. L'arbre veut un sol toujours humide et il supporte même un léger degré de salinité (Munier, 1973 ; Toutain, 1979). Aussi la proximité d'un cours d'eau ou d'une nappe phréatique importante est-elle nécessaire (Benchelah et Maka, 2006). Si l'eau n'est pas en quantité suffisante, il faut irriguer et arroser. D'ailleurs, les Sahariens disent que pour produire de bons fruits « le dattier doit avoir la tête dans le feu et les pieds dans l'eau. La palmeraie est donc indissociable de l'oasis, qui seule, correspond dans le désert aux conditions de microclimat requises (Benchelah et Maka, 2006).

### 1.1.4 Cycle biologique du palmier dattier

L'arbre consiste de plantes mâles et femelles, et c'est sur la plante femelle que se développent les fruits ou dates. Un plant mâle est capable de polliniser entre 40 à 50 plantes femelles. Le palmier dattier produit entre 5 et 15 bouquets de par arbre. Chaque bouquet peut contenir jusqu'à 1000 dates correspondant à un poids approximatif entre 6 à 8 kg. Un arbre de palmier commence à produire des dates à partir de 3 ans, mais généralement entre 3 et 5 ans. Il peut rester vivant et productif pendant 150 ans environ (Benchelah et Maka, 2006).

### 1.1.5 La datte

#### 1.1.5.1 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 Figure (1). 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 Figure (1) et (2) (Espiard, 2002).

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, Alhadrami, & Khalil, 1998).

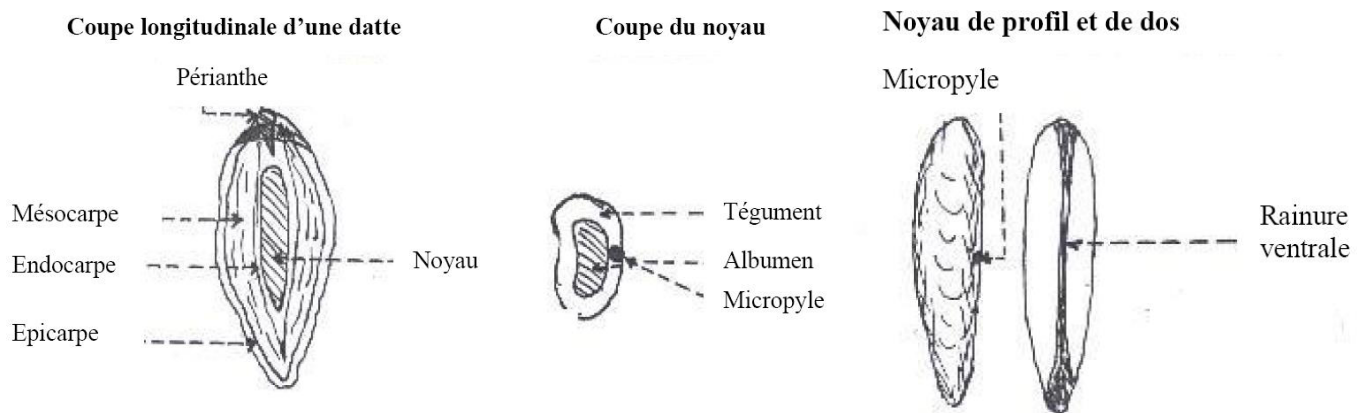


Figure 1 : Datte et noyau du palmier dattier (Buelguedj, 2001).



Figure 2 : Une coupe réelle au niveau de datte (Chibane, 2008).

### 1.1.5.2 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 (Sawaya *et al.*, 1983 ; Benchabane *et al.*, 1996 ; Al-Shahib et Marshall, 2002).

Le Tableau (1) présente les stades d'évolution de la datte et les appellations utilisées en Afrique du Nord et en Irak.

**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 stades peuvent être définis comme suit (Djerbi, 1994) :

- *Hababouk* : Ce stade commence juste après la fécondation et dure environ cinq semaines. A ce stade, le fruit est entièrement recouvert par le périanthe et se caractérise par une croissance lente.
- *Kimiri* : Il se caractérise par la couleur verte, un grossissement rapide du fruit, une augmentation de la concentration en tanins et en amidon, une légère augmentation des sucres totaux et de la matière sèche. Ce stade dure neuf à quatorze semaines.
- *Khalal* : Au cours de ce stade, la couleur du fruit passe du vert au jaune clair, puis vire au jaune, au rose ou rouge selon les variétés. Cette phase est marquée par une augmentation rapide de la teneur en sucres totaux, de l'acidité active, par contre la teneur en eau diminue. Elle dure trois à cinq semaines.
- *Routab* : La couleur jaune ou rouge du stade khalal passe au foncée ou au noir. Certaines variétés deviennent verdâtres comme la khadraoui (Irak) et la Bouskri (Maroc). Ce stade se caractérise par :
  - La perte de la turgescence du fruit suite à la diminution de la teneur en eau ;
  - L'insolubilisation des tanins qui se fixent sous l'épicarpe du fruit ;
  - L'augmentation de la teneur des monosaccharides.

- Tamr : c'est le stade final de la maturation de la datte. Le fruit perd beaucoup d'eau, ce qui donne un rapport sucre/eau élevé.

### 1.1.5.3 Les variétés des dattes

Chaque région a sa datte de prédilection, plus ou moins oblongue, plus ou moins colorée, du jaune translucide au rouge sombre, voire noir. À chaque variété, sa propre appellation. L'Irak prône la *zahidi*, l'Égypte exalte la *Samani*, l'Algérie, la *Deglet Nour*, la Tunisie, la *Ftimi* (A.-C. Bêchera, M.Maka, 2006).

À chaque variété, sa propre appellation. L'Irak prône la *zahidi*, l'Égypte exalte la *Samani*, l'Algérie, la *Deglet Nour*, la Tunisie, la *Ftimi* (Benchelah et Maka, 2006). Plus étonnant, un même fruit, à chaque étape de sa maturation, porte un nom approprié.

Les variétés de dattes sont très nombreuses, seulement quelques unes ont une importance commerciale. Elles se différencient par la saveur, la consistance, la forme, la couleur, le poids et les dimensions (Djerbi, 1994; Buelguedj, 2001).

En Algérie, il existe plus de 940 cultivars de dattes (Hannachi *et al*, 1998). Les principales variétés cultivées sont :

La Deglet-Nour est une variété commerciale par excellence. C'est une datte demi-molle, considérée comme étant la meilleure variété de datte du fait de son aspect, son onctuosité et sa saveur. A maturité la datte est d'une couleur brune ambrée avec un épicarpe lisse légèrement plissé et brillant, le mésocarpe présente une texture fine légèrement fibreuse (Noui, 2007).

Les variétés communes sont de moindre importance économique par rapport à Deglet-Nour. Les variétés les plus répandues sont : Ghars, Degla-Beïda et Mech-Degla. Selon Belguedj (2001). Une grande proportion des variétés communes est de consistance molle selon la Figure (3).

### 1.1.5.4 Classification des dattes

D'après Espiard (2002), la consistance de la datte est variable. Selon cette caractéristique, les dattes sont réparties en trois catégories :

1-Dattes molles : Ahmar (Mauritanie), Kashram et Miskani (Égypte, Arabie-Saoudite).

2-Dattes demi-molles : Deglet-Nour (Tunisie, Algérie), Mehjoul (Mauritanie), Sifri et Zahidi (Arabie-Saoudite).

3-Dattes sèches de consistance dure : Degla-Beïda et Mech-Degla (Tunisie et Algérie), Amersi (Mauritanie).

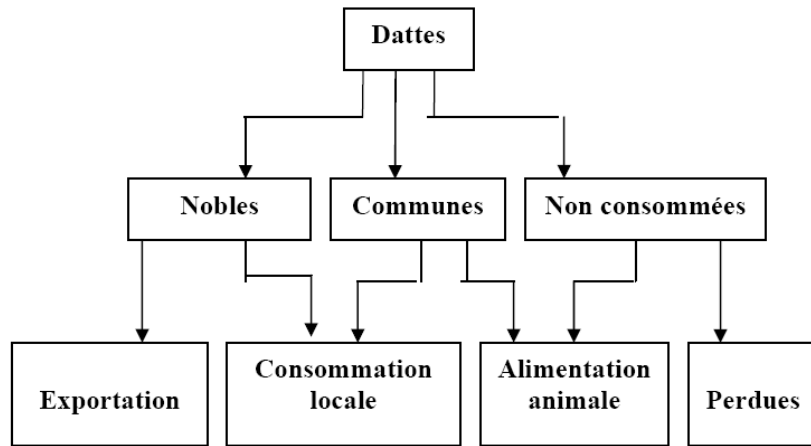


Figure 3: Classification des dattes (Estanove, 1990).

### 1.1.5.5 Composition biochimique de la datte

Les dattes (*Phoenix dactylifera* L.) constituent spécifiquement un important aliment dans les régions arides et semi-arides du monde, elles contiennent des carbohydrates de 44 à 88%, principalement du fructose, du glucose et du saccharose ; des lipides de 0.2 à 0.5% ; des protéines de 2.3 à 5.6% ; des fibres diététiques de 6.4 à 11.5% ; des éléments minérales (le pourcentage de chaque minérale dans les dattes sèches varie de 0.1 à 916 mg/100g de datte), et des vitamines (comme vitamine C, B1, B2, A, riboflavine et niacine) (Al-Hooti et al., 1995; Al-Shahib et Marshal, 2003; Sawaya et al., 1982).

Le taux en eau des dattes est variable, et peut atteindre au maximum 25% (Belarbi et al.; 2000).

En plus de sa valeur nutritionnelle, les dattes sont riches en composés phénolique qui possèdent une activité antioxydante (Mansouri et al, 2005 ; Vayalil, 2002 ; Al-Farsi et al, 2005 ; Vinson et al, 2005).

Les dattes sont aussi une bonne source des macroéléments comme le phosphore, le fer, potassium et d'une quantité importante en calcium (Gamil-Abdel-Hafez et al., 1980; Anwar-Shinwari, 1987).

### 1.1.5.6 Les enzymes des dattes

Les enzymes jouent un rôle très important dans le processus de conversion qui se déroule durant le développement et de maturation des dattes. L'activité des quatre enzymes citées ci-dessous présente un intérêt particulier pour la qualité final du produit (Barreveld, 1993) :

*Invertase* : responsable de la conversion du saccharose en sucre invertis (glucose et fructose) elle influe sur la texture du fruit ;

*Polygalacturonase* et pectinesterase : convertissent les substances pectiques insolubles en pectique plus solubles attribuant au fruit la texture molle ;

*Cellulase* : décompose /hydrolyse la cellulose en substances plus simple, ce qui augmente la solubilité et conduit éventuellement à la formation du glucose, ainsi le taux de fibre diminue ;

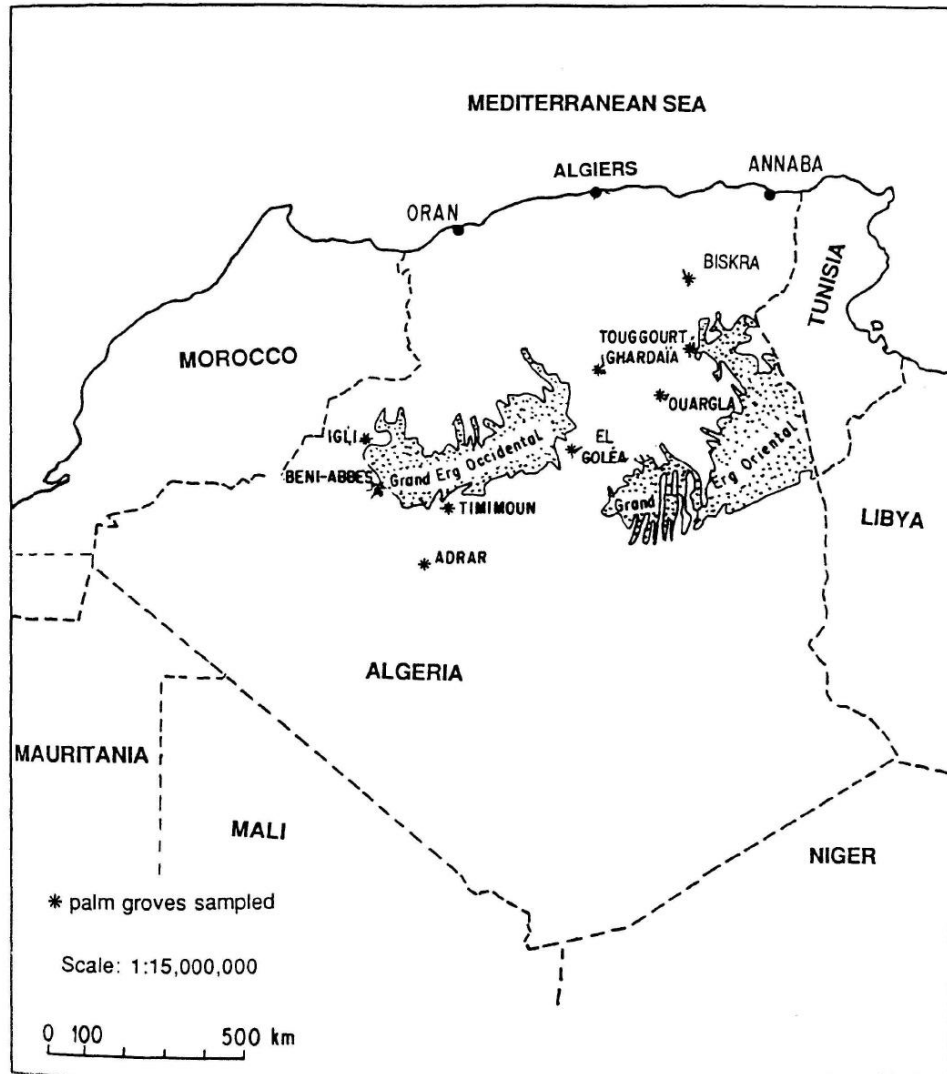
*Polyphénol oxydase* : est responsable des transformations biochimiques des polyphénols dont l'exemple: les tannins. Cette enzyme joue un rôle très important dans les réactions de brunissement non enzymatique des dattes (Sachde et *al.*, 1989a,b ; Hasegawa et Maier, 1980).

La connaissance de l'activité de ces enzymes a une importance capitale pour le conditionneur et le transformateur. Sous l'effet de la température et de l'humidité, l'enzyme peut être activée ou inhibée. L'enzyme est active en solution ou dans un milieu aqueux.

### **1.1.6 La répartition de Deglet Nour en Algérie**

En Algérie, la région de Béchar, le Touat, le Tidikelt et le Mزاب ont de belles palmeraies, mais le pays des dattes se situe entre Ouargla, Oued Rhir et Souf et se poursuit dans le Djerid et Nefzaoua en Tunisie.

Comme c'est indiqué dans la Figure (4) le palmier dattier Deglet Nour est répartie dans les quatre régions d'Algérie suivante : Saoura (Igli et Beni Abbes), Touat (Adrar et Timimoun), centre (Chardaia et El Golea), et Rhir-Zibans (Biskra, (Ferfar), Touggoun (Touggourt, El Arfiane et Sidi Mahdi) et Ouargla).



**Figure 4:** La répartition des cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) dans le Sud Algérien (Bennaceur et *al.*, 1991).

### 1.1.7 Production mondiale des dattes

Selon FAO (2004), la production des fruits de dattes dans le monde est estimée à 6.7 million de tonnes. L'Algérie et la Tunisie sont les premiers exporteurs de Deglet Nour en France et en Europe (Guizani et *al.*, 2010). En 2004, la Tunisie à produire près de 110 000 de tonnes de dattes (Guizani et *al.*, 2010).

En Algérie, la production annuelle de dattes est en moyenne de 200.000 tonnes (Le Berre et Ramousse, 1918).

### 1.1.8 Utilisation des dates et de palmier dattier

Le palmier dattier est considéré comme un arbre providentiel, véritable «arbre de vie». Notre Prophète Muhammad (paix soit sur lui) la nomme «l'arbre béni», Et certainement est

un don éternellement associé à l'humanité et au monde arabe, c'est pour cela le palmier est devenu important dans la culture musulmane. Les dattes sont la base de l'économie saharienne. Le palmier dattier représente un élément fondamental de l'écosystème oasien et d'une importance sociale en assurant une stabilité des populations qui vivent dans les oasis (Le Berre et Ramousse, 1918).

Le tronc du palmier dattier est utilisé comme étant un bois de chauffage et des charpentes des maisons (Chehema et Longo, 2001) :

Les palmes sèches sont utilisées comme clôtures, des brises de vent, dans la confection de couffins, de chapeau, etc. Ils peuvent même servir en industrie de papier (Kachmoula, 1982).

Les dattes sont utilisées pour la production de confiture, du jus et des sirops (Al-hooti et al., 1996; Cheikh-Rouhou et al., 2006; Hobani, 1998; Khatchadourian et al., 1983; Youssif et al., 1990; Youssif et Alghamdi, 1999; Youssif et al., 1996).

Les sous-produits des dattes ont été utilisés comme substrat de fermentation pour la production de biomasse (Al obaidi et Berry 1982; Nacib et al., 1999), ou la production de divers métabolites tels que l'acide citrique, l'oxytétracycline ou l'éthanol (Abou Zied et al., 1991; Abou Zied et Baghlef, 1983; Abou Zied et Khoja, 1993; Al obaidi et Berry 1982).

Les noyaux des dattes ont été utilisés comme source d'huile contenant du tocophérol, des composés phénoliques et des stérols (Besbes et al., 2004).

Les dattes ont des propriétés médicales diverses. Elles sont utilisées pour soigner les hémorroïdes, les troubles intestinaux, les constipations, l'ictère, les rhumes, le maux de gorge, les affections broncho-pulmonaires, la fatigue, et les maladies nerveuses (Benchelah et Maka, 2006).

### **1.1.9 Le brunissement enzymatique des dattes**

Le brunissement enzymatique est un problème significatif dans un certain nombre de produits importants, particulièrement fruits tels que des abricots, des pommes, des poires, des pêches, des bananes, et des raisins ; légumes comme pommes de terre, champignons, et laitue ; et fruits de mer tels que la crevette, les langoustes, et les crabes (Sapers, 1993).

Selon Nicolas et Potus, 1993 ; les phénomènes de brunissement des tissus végétaux sont la première manifestation d'un désordre cellulaire après une mise en contact accidentelle de substrats et d'enzymes.

Les substrats phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants (Salunkhe, 1990). Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont: les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins, responsables de la structure des fruits et légumes. Ils sont transformés en quinones, qui se polymérisent grâce à l'oxygène ; conduisent à des composés plus ou moins colorés. Ils peuvent réagir avec les acides aminés.

Le brunissement enzymatique est dû à des enzymes les polyphénol-oxydases. (Macheix et *al.*, 1990). en général, les dattes sont riches en polyphénols (substrats) dont l'oxydation enzymatique est à l'origine du brunissement plus ou moins intense (Jarrah et *al.*, 1982).

En effet, au cours du stockage, la qualité relative des polyphénols simple et des tanins solubles diminue. Les flavones disparaissent en donnant des composés oxydés de couleur brune ainsi que des acides dactylifériques (Mohamed et *al.*, 1985).

La vitesse de la réaction dépend de la teneur en substrat. Le pH optimum pour la réaction est 5-7, souvent 6-6,5. C'est pourquoi les fruits les plus acides brunissent moins. Tant que les tissus restent sains, il n'y a pratiquement pas de brunissement. (Cheftel et *al.*, 1977).

## 1.2 La polyphénol oxydase

### 1.2.1 historique et perspectives

La polyphénol oxydase a été découverte en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a observé que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés dans les plantes provoquant ainsi la formation d'un pigment bleu (Schoenbein, 1856; Whitaker, 1995)

La polyphénol oxydase a été préparée 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* et partiellement purifiée par précipitation. C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, 1981; Jolivet *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).

### 1.2.2 Définition, nomenclature et classification

#### 1.2.2.1 Définition

Les polyphénols oxydases appartiennent au groupe des oxydoréductases. (Anon; 1973).

Les polyphénols oxydases (PPO) sont largement répandues dans le règne microbien, végétal et animal. Elles participent à la mélanogénèse chez les mammifères et au 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 catechol oxydases EC 1.10.3.1 et les laccases EC 1.10.3.2. (Mesquita & Queiroz., 2013).

#### 1.2.2.2 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-diphénol oxydase qui appartient au groupe des oxydo-réductases a été définie par (Dixon et Webb ; 1964) comme l'o-diphénol : oxygène, oxydoréductase (E.C.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, oxydo-réductase (E.C.1.14.18.1.) (Martinez & Whitaker, 1995., Mesquita & Queiroz., 2013).

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

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

#### 1.2.2.2.1 Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénol oxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. 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).

#### 1.2.2.2.2 Activité *o*-diphénoloxydase (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 catécholoxydase.

Les *o*-quinones sont des composés fortement réactifs qui peuvent soit subir spontanément en solution aqueuse des polymérisations et cyclisations non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène, noir, brun ou rouge généralement appelé mélanine soit réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés (Dicko et al., 2002 ; Cho et Ahn, 1999a ; Burton, 1994).

Les préparations enzymatiques à partir de plusieurs espèces montrent une ou les deux activités (Burton, 1994 ; Thomas, P and Janave, 1986).

Les deux activités de la PPO sont présentées dans la Figure (1).

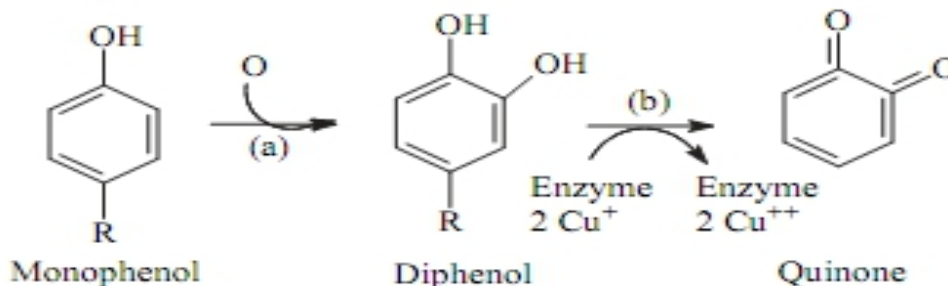


Figure 5 : Schéma des deux réactions catalysées par la polyphénol oxydase.

### 1.2.3. Structure moléculaire et site actif

#### 1.2.3.1 Structure moléculaire

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 native d'*Agaricus bisporus* est une métalloenzymes oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire et dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques, et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa , qui diffèrent par leur composition en acides aminés, formant ainsi une structure tétramérique de la forme  $H_2L_2$  ayant un poids moléculaire global apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La structure secondaire de la PPO est principalement  $\alpha$ - hélicoïdale. Le cœur de l'enzyme est constitué de quatre paquets spiraux composés d'hélice  $\alpha$  :  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$ . Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire de cuivre et qui est entouré par les hélices,  $\alpha_1$  et  $\alpha_4$ , et de plusieurs coudes  $\beta$ . Dans la PPO d'*Agaricus bisporus*, l'isoleucine est le N-terminal, tandis que la valine est le C-terminal (Mayer et Harel, 1979).

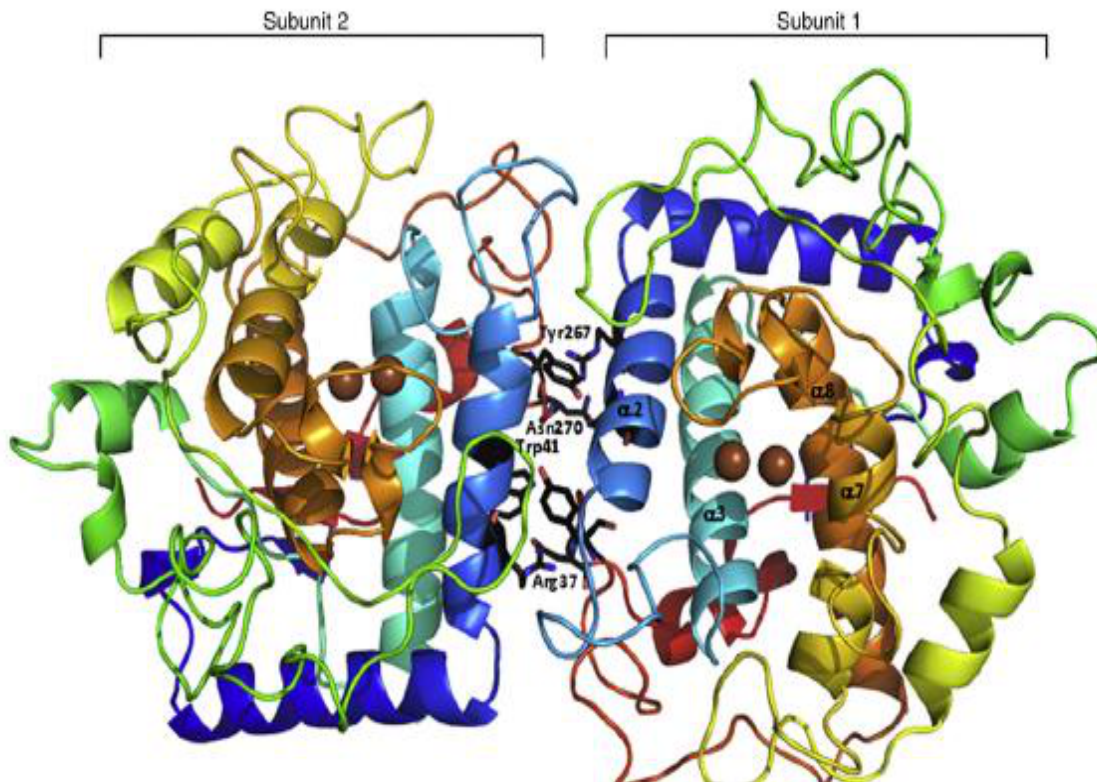
#### 1.2.3.2 Site actif

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).

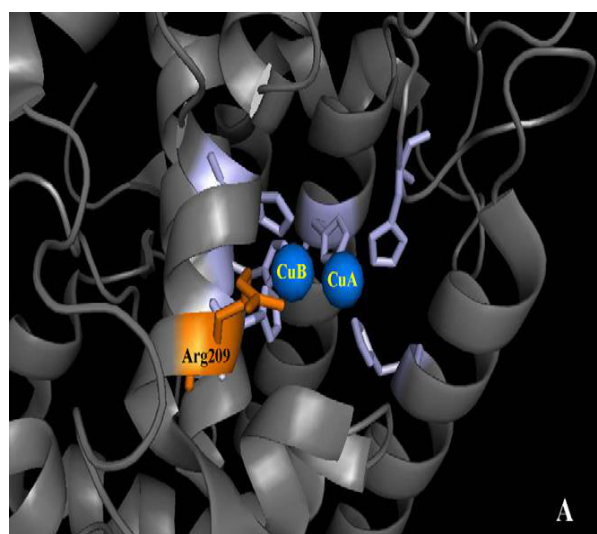
La structure secondaire de la PPO est principalement  $\alpha$ - hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$ ) (Jolivet et al., 1998 ; Ros et al., 1994 ; Decker et Terwilliger, 2000 ; Eicken et al., 1999 ; Haghbeen et al., 2004 ; Claus et Decker, 2006). Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire de cuivre et qui est entouré par les hélices,  $\alpha_1$  et  $\alpha_4$ , et de plusieurs coudes  $\beta$ . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aide à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50) à l'hélice  $\alpha_2$ . La paire du cuivre (CuA et CuB) du site actif est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices  $\alpha$  (figure 2 et 3).

Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice  $\alpha_2$ , tan disque l'His 109 et His 118 sont au début et au milieu de l'hélice  $\alpha_3$ . Le

second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines sont localisés au milieu d'hélices  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$  (Klabunde *et al.*, 1998). La paire de cuivre (CuA et CuB) est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Van Gelder *et al.*, 1997



**Figure 6:** Structure de la tyrosinase des procaryotes proposée par Sendovski *et al.* (2010). Les ions de cuivre dans le site actif sont colorés en marron.



**Figure 7:** Site actif de la tyrosinase (Ben-Yosef *et al.*, 2010).

### 1.2.4 Distribution, localisation subcellulaire et rôle physiologique

#### 1.2.4.1 Distribution et localisation subcellulaire

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes et la proportion de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble peuvent être considérablement inégales. (Mayer et al., 2006). L'activité de PPO est très faible dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer., 1979). Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux PPO de diverses sources telles que : les truffes (Miranda et al., 1996 ; Perez-Gilabert et al., 2001 ; Zarivi et al., 2003 ; Gouzi et al., 2013), les champignons (Papa et al., 1994., Cheng et al., 2013), la banane ( Sojo et al., 1998., Ünal., 2007), l'artichaut (Ziyan & Pekyardimci., 2003 ; Quarta et al., 2013), la poire (Ziyan & Pekyardimci., 2004 ; Kim et al., 2001), la pêche (José et al., 2014), l'abricot ( Tony et al., 1999), les feuilles de Tabac (Shi et al., 2001), la cerise (Kumar et al., 2008), et la pomme (Yemenicioglu et al., 1997).

La PPO se trouve dans une variété des organites subcellulaires telles que les peroxysomes, les mitochondries (Martinez et al., 1989., Webb et al., 2013). 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 (Whitaker et Lee., 1995., Webb et al., 2013).

#### 1.2.4.2 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 & Katoh., 1999). Il a été montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*). (Lax & Vaughn., 1991)

Dans les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez & Whitaker., 1995). La PPO est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (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).

La PPO catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel., 1986), et se polymérisent ensuite, pour former des polymères bruns insolubles construisant une barrière, qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante, grâce à leurs propriétés anti-microbiennes,

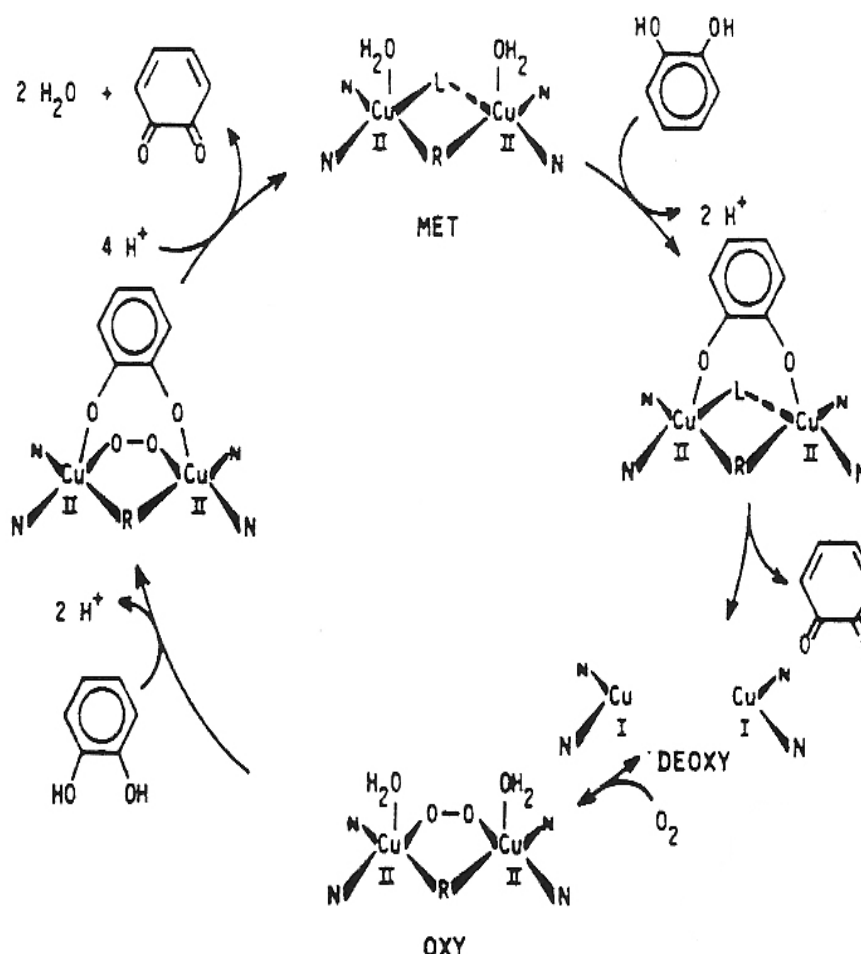
(Zawistowski et al., 1991). Selon Craft et Audia.(1962), ces barrières de protection ont été observées dans les patates douces, les carottes, les betteraves, les courges, les navets et les pommes de terre.

Elle peut induire des modifications des protéines végétales repoussant ainsi les herbivores ou les microbes pathogènes (Steffens et al., 1998). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Zawistowski et al., 1991). L'activité PPO joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer & Harel.,1991) d'une part elle est essentielle pour la coloration bénéfique de certaines nourritures, telles que les prunes, les raisins noires et le thé,et d'autre part elle induit le modifie de façon indésirable les qualités organoleptiques des fruits et des légumes(Whitaker & Lee, 1995 ;Mesquita & Queiroz.,2013).

### 1.2.5 Mécanisme catalytique de la polyphénol oxydase

La Figure 4 représente le mécanisme catalytique de l'activité catécholase de la PPO (Siegbahn, 2003). L'activité catécholase implique l'oxydation de deux o-diphénols en deux quinones avec la réduction concomitante de 4e<sup>-</sup> de l'oxygène moléculaire produisant deux molécules d'eau. Cette activité est initiée par la fixation d'un o-diphénol à la forme met de l'enzyme qui est suivie de la réduction du faisceau bicuivrique menant à la formation du *deoxy tyrosinase* et au dégagement d'o-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'oxytyrosinase est formée et une deuxième o-diphénol est liée, réduisant le peroxyde et en produisant l'eau et la formation d'une autre o-quinone.

Le site actif de la PPO existe sous trois formes physiologique: la forme oxygénée *oxytyrosinase* ( $E_{oxy}$ ) [CuII-O<sub>2</sub><sup>2-</sup>-CuII], la forme *mettyrosinase* ( $E_{met}$ ) Cu(II), et la forme *deoxytyrosinase* ( $E_{deoxy}$ ) Cu(I) (Rodríguez-López et al.,1992; Valero et al., 2002; Espín et al., 1997 ; Eicken et Sacchettini, 1999; Claus et Decker, 2006). Les deux états *met-* et *oxytyrosinase* possèdent l'activité catécholase, tandis que l'activité crésolase exige l'état *oxy* (Claus et Decker, 2006).



**Figure 8:** Schéma illustrant le mécanisme catalytique de l'activité catécholase de la PPO (Nelson et Mason, 1970).

### 1.2.6 Extraction du polyphénol oxydase:

La PPO a été pour la première fois préparée presque simultanément par Kubowitz (1938) à partir de la pomme de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir du champignon de couche (*Agaricus bisporus*) et est partiellement purifiée par précipitation (Jolivet et *al.*, 1998).

Plusieurs méthodes d'extraction et de purification de la PPO de champignon de couche ont été développées. Parmi les méthodes cités dans la littérature, les plus largement utilisées et qui donnent de bon rendement d'activité enzymatique sont celles : de Dawson et Magee (1955), de Frieden et Ottesen (1959), de Bouchilloux et *al.* (1963), de Nelson et Mason (1970), d'Atlow et *al.* (1984), de Papa et *al.* (1994), et de Fan et Flurkey (2004).

Trois problèmes doivent être traités avant d'extraire la PPO à partir du matériel végétal : (1) latence, (2) la solubilisation de l'activité liée à la cellule, et (3) la prévention de l'oxydation enzymatique des phénols endogènes et par conséquent les produits se polymérisent et se précipitent, sur la protéine enzymatique (Vámos-Vigyázó, 1981). La latence est un problème

mineur avec la polyphénol oxydase végétale, comme dans la plupart des espèces l'enzyme est présente sous la forme active.

La PPO représente moins de 1% des protéines totales dans les fruits et les végétaux. Dans les champignons, qui sont considérés comme étant la meilleure source de la PPO, la concentration de l'enzyme est de l'ordre de 0.004% ce qui implique l'utilisation de 1 kg de champignon pour avoir un rendement de 40 mg de PPO purifiée (Zawistowski *et al.*, 1991). Les PPOs liées peuvent être solubilisées dans un milieu hypotonique, par l'utilisation des agents chimiques tel que les détergents (Tween-80®, Triton X-100®, SDS : Sodium Dodecyl Sulfate), ou au moyen des agents physiques comme les ultrasons (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Robb, 1984). L'extraction détersive des tissus augmente substantiellement le niveau de l'activité PPO (Whitaker, 1995). Une caractéristique inhabituelle de cette enzyme est sa capacité à exister dans un état inactif ou latent (Gandia-Herrero *et al.*, 2004). PPO peut être libéré de latence, ou activé par une variété de traitements ou des agents dont l'acide et de base choc (Kenten, 1957), de l'urée (Okot-Kotber, 2002), les polyamines (Jimenezatienzar *et al.* 1991), les détergents anioniques tels que le SDS *al.* (Santosh *et al.*, 2006), des protéases (Laveda *et al.* 2001) et des acides gras (Golbeck *et al.*, 1981).

La solubilisation, est habituellement réalisée après préparation de poudre d'acétone ou l'extraction avec des détergents et d'autres agents. Il en résulte incontestablement une modification de la structure de l'enzyme et de ses propriétés (Mayer et Harel, 1979 ; Vámos-Vigyázó, 1981).

Les plus grandes difficultés à surmonter pendant l'obtention d'une préparation soluble PPO sont la prévention de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques endogènes et la formation des pigments pendant le broyage de la matière végétale et l'extraction de l'enzyme. Les pigments pourraient s'associer avec la protéine enzymatique et rendre cette dernière insoluble et inactive (Vámos-Vigyázó, 1981).

Pendant l'extraction de la PPO, des réactions de tannage peuvent être avoir lieu, et ont comme conséquence la modification des propriétés de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991). Pour réduire au minimum ces risques, toutes les étapes d'extraction de la PPO devraient être effectuées à basse température, probablement à -20°C voire -30°C; en tout cas à des températures inférieures à 0°C (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski *et al.*, 1991). Le morcellement et l'homogénéisation sont souvent faits dans l'azote liquide ou dans l'azote atmosphérique pour réduire le plus possible les interactions protéine- phénol. Dans certains cas, la congélation rapide et la lyophilisation du matériel sont recommandées comme

premières étapes de l'extraction de l'enzyme. La précipitation par l'acétone suivie de l'extraction par un tampon, est l'une des méthodes le plus souvent appliquées.

Parfois l'extraction avec un tampon approprié précède l'étape de précipitation par l'acétone. La précipitation d'acétone ne produit pas d'artefacts. Une grande variété de tampons est employée pour l'extraction, et les valeurs du pH, qui changent avec la source d'enzyme, sont, en général, ajustées pour assurer un milieu légèrement alcalin. Le pH du tampon pourrait affecter la forme enzymatique obtenue. Afin de protéger le produit d'extraction contre l'oxydation enzymatique des polyphénols, des agents réducteurs ou des coupleurs de quinones, aussi bien que des inhibiteurs réversibles d'enzymes, ce sont incorporés dans le milieu. L'acide ascorbique, la cystéine, le métabisulfite de sodium, le DIECA, ou le saccharose, et parfois des mélanges de certains de ces composés, ont été employés (Vámos-Vigyázó, 1981).

L'élimination des composés phénoliques endogènes des extraits de plantes peut réduire la formation des quinones, des pigments et des mélanines indésirables dans l'extrait de polyphénol oxydase. Elle peut être effectuée par l'addition dans l'extrait enzymatique des adsorbants de composés phénoliques tels que les résines échangeuses d'ions et le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP).

Nous avons constaté que ce procédé change les caractéristiques cinétiques de la polyphénol oxydase de champignon dans le milieu organique, dans une certaine mesure, mais il n'affecte pas les produits de réaction dans les milieux aqueux ou organiques (Burton, 1994).

Un moyen très efficace de prévention contre l'oxydation et la polymérisation des phénols pendant l'extraction de l'enzyme est leur élimination par fixation à un polymère insoluble. Les pièges à phénol le souvent utilisés pendant l'extraction sont la polyvinylpyrrolidone (PVP), les résines échangeuses d'ions en raison de leurs capacités fixatrices des composés phénoliques. Elles sont utilisées pendant la séparation des fractions subcellulaires et dans les étapes initiales de purification de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et *al.*, 1991; Ziyen et Pekyardimci, 2004). En même temps le PVP est un inhibiteur partiellement compétitif de la PPO (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et *al.*, 1991). Le polyéthylène glycol (PEG) est parfois préféré, peut-être parce que sa solubilité dans l'acétone présente certains avantages pour l'obtention d'une préparation enzymatique brute. Malheureusement, le déplacement de ces phénols par des résines d'échange ionique ou d'autres composés se liant aux phénols (Bonner, 1955) peut avoir comme conséquence la perte de quelques isoformes (Smith et Montgomery, 1985). Ainsi, le séchage par l'acétone, souvent appliqué comme première étape d'extraction d'enzymes, est, en même temps, un moyen puissant d'élimination

des phénols, particulièrement quand ils contiennent environ 20% d'eau. Le déplacement des substances pectiques des tissus de fruit peut être réalisé par précipitation par l'acétone ou l'acétate de calcium (Vámos-Vigyázó, 1981).

L'extraction de la PPO peut être entravée en présence d'enzymes protéolytiques endogènes qui pourraient produire des formes multiples artéfactuelles et interconvertibles de l'enzyme. Cela a été mis en évidence lorsque l'utilisation des inhibiteurs de protéases (fluorure, phénylméthylsulfonyl, et le Trasylol) a conduit à la diminution du nombre des formes d'isoenzymes obtenues lors de la purification de la PPO de pêche et de datte (Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

### 1.2.7 Les méthodes de détermination de l'activité PPO

La détermination de l'activité enzymatique de la PPO n'est pas aussi simple qu'elle peut apparaître. Un certain nombre de facteurs doivent être pris en considération pendant la détermination de l'activité enzymatique afin d'éviter une surestimation ou des résultats faux. L'activité de la PPO peut être déterminée en mesurant la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit. Il est nécessaire de limiter la mesure à la phase initiale de la réaction afin d'éviter l'inactivation de l'enzyme par le produit de la réaction (o-quinone), la diminution de la concentration du substrat, et la polymérisation du produits (Vámos-Vigyázó, 1981).

La vitesse de disparition du substrat peut être mesurer par l'absorption de l'oxygène dissout, par la technique de Warburg ou par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Mayer et Harel, 1991 ; Gaillard et *al.*, 1993 ; Naish-Byfield et Riley, 1992). La méthode la plus commune pour la mesure de activité de la PPO est la spectrophotométrie de la formation de quinones au 400-500nm, selon les substrats (Serradell et *al.*, 2000; Yoruk et Marshall, 2003). Une grande variété de substrats de synthèse peut être utilisée dans ce cas, par exemple: le catéchol, le 4-méthylcatéchol, le pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique (Vámos-Vigyázó, 1981). La meilleure méthode pour étudier la réaction crésolase est la mesure de la production de l'eau dans le milieu contenant du tritium à partir du [2.6-  $^3\text{H}$ ] monophénol tel que la [3.5-  $^3\text{H}$ ] tyrosine (Mayer et Harel, 1991 ; Jolivet et *al.*, 1998). Il est également plus commode de déterminer la vitesse de perte d'agents réducteurs tel que l'ascorbate à 265 nm ( $\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ou le NADH à 340 nm ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Mayer et *al.*, 1966 ; El-Bayoumi et Frieden, 1957 ; Zawistowski et *al.*, 1991). Plusieurs méthodes pour la mesure de l'activité PPO sont proposées et les chercheurs travaillant sur cette enzyme définissent leur propre méthode. Il est par conséquent difficile de comparer entre les activités de la PPO des diverses sources.

L'activité de la PPO varie entre les fruits et légumes (Nunez-Delicado et *al.*, 2005).

### 1.2.8 Effet du pH sur l'activité PPO

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la PPO varie avec la source de l'enzyme et aussi en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des PPOs étudiées il est compris entre pH 4 et 8 (Mayer et Harel, 1979). Plusieurs paramètres affectent cette valeur. Nous pouvons citer le type de tampon, la pureté de la préparation enzymatique et le stade de maturité du fruit ou du végétal. L'étude du pH peut nous fournir des informations sur l'identification des activateurs ou sur les résidus du substrat susceptibles d'être ionisés, nécessaires pour sa fixation et sa transformation (Kuby, 1991).

Le changement de pH du milieu réactionnel modifie la réaction enzymatique de la PPO par : (1) l'inactivation de l'enzyme à cause du changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés impliquées dans la réaction catalytique, (2) le changement de l'état d'ionisation du substrat, et/ou (3) la modification de l'équilibre de la réaction lorsque les protons H<sup>+</sup> ou les hydroxydes OH<sup>-</sup> sont impliqués.

### 1.2.9 Effet de la température sur l'activité PPO

L'effet de la température sur l'activité des PPOs n'a pas été très étudié, comparativement à l'effet du pH (Joslyn et Ponting, 1951; Vámos-Vigyázó, 1981). Amiot et *al.* (1997) ont montré que la PPO n'est pas une enzyme thermostable. En effet, des traitements thermiques de courte durée en solution ou dans des produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C suffisent dans la plupart des cas à la destruction irréversible, partielle ou totale, de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003). Sa tolérance thermique dépend également de la spécificité du substrat, du pH optimal, de la température, et aussi et surtout de la source d'enzyme et du cultivar (Vámos-Vigyázó, 1981; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003).

### 1.2.10 Les substrats de la PPO

Les PPO des plantes ont grandes spécificités des substrats et sont capables d'oxyder une variété de mono, di ou les polyphénols. Les composés phénoliques sont des substances naturelles qui contribuent à la richesse sensorielle (couleur, goût, arôme et texture) associée à la qualité des fruits (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). La PPO présente différentes affinités vis-à-vis du même substrat selon la source de son obtention (l'espèce, le genre, le *cultivar*, ou également le tissu) (Zawistowski et *al.*, 1991).

Le type et la position des substituants présents sur les mono- et les o-dihydroxy phénols sont également des causes importantes déterminant la réactivité du substrat. Pour les mêmes substrats, des grandes différences dans les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) sont obtenues selon la source et la pureté de l'enzyme (Zawistowski et al., 1991).

Par exemple, la substitution en position 3 (exemple : le 3-méthyl catéchol) cause une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat à cause de la gêne stérique. La présence d'un groupement donneur d'électron en position 4 (exemple : le 4-méthyl catéchol ou l'acide chlorogénique) ou d'un groupement attracteur d'électron (exemple : le 4-nitrocatechol ou le 3,4-dihydroxy acide benzoïque) augmente ou réduit la réactivité du substrat, respectivement (Vámos-Vigyázó, 1981).

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).

Le substrat phénolique le plus simple de la PPO est le catéchol puisqu'il possède la structure de base des o-dihydroxyphénol, mais ceci ne signifie plus qu'il s'agissait d'un meilleur substrat pour l'enzyme. Toute substitution sur le cycle aromatique (position et la nature du substituant) affecte la vitesse de la réaction enzymatique.

### 1.2.11 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 Polyphénol 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 & Toca.,2006).Elles peuvent être également utilisées pour la biosynthèse des antioxydants et colorants alimentaires (Simsek & 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 & 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 & Yoo.,2009,Njagi et *al.*, 2010),le catéchol (Ameer & 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 & Esposito.,2000), comme le cyanure (Shan et *al.*,2004), l'acide benzoïque (Li et *al.*,2010), l'azide 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 & Toca.,2006).

# *Matériels et méthodes*

## **2.1 Matériels**

### **2.1.1 Matériel biologique**

La dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L) est utilisée comme source de la polyphénol oxydase (Figure 5).



**Figure 9** : Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L)

### **2.1.2 Produits chimiques**

La pyrocatechol (catéchol , 98%) fourni par Fluka; acide orthophosphorique (84-90% Prolabo Ph. Eur) ; le  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (99.5% Prolabo R. P Normapur) ; le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (99.5% Prolabo R. P Normapur); acétate de sodium; acide acétique; Acétone (99.8% Carlo Erba); le spectrophotomètre (Thermoscientific (UV/Visible)); un bain-marie (Grant -Sub 28 ; Memmert) ; et une centrifugeuse (Fisher Bioblock Scientific) ; vortex ; mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E).

## **2.2 Méthodes**

### **2.2.1 Extraction de la PPO**

La PPO est extraite à partir des dattes Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L).

150g de chair de Deglet Nour lavés à l'eau distillée, séchés à l'air libre et refroidis à (-15°C). Ensuite sont homogénéisés pendant 2 min à l'aide d'un mixeur dans 225 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate refroidis (0.05 M à pH 7.0) contenant 3.75g de PVPP (1%).

Le broyat est ensuite filtré à travers quatre couches de la gaze par pressage manuel. Le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000 trs/min dans une centrifugeuse.

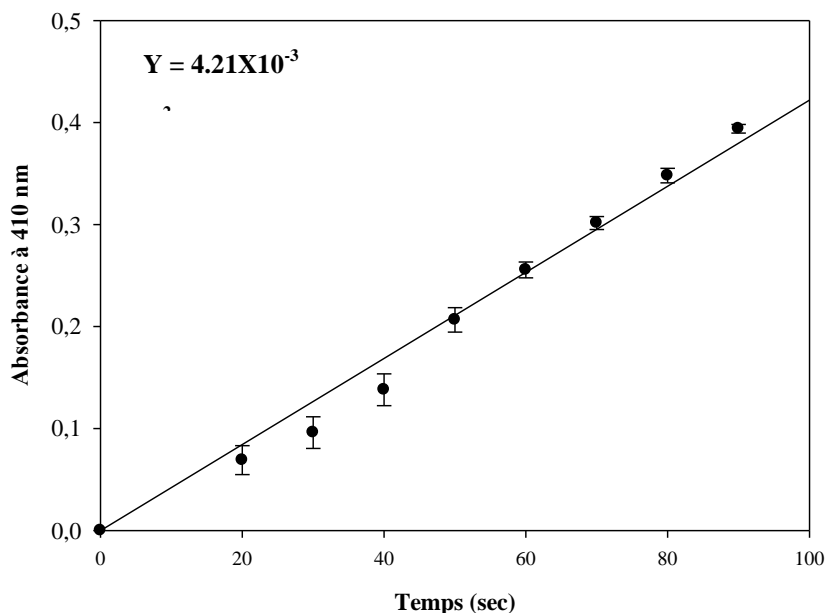
Le surnageant récupéré d'un volume total de 150 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait brut de la PPO. L'extrait brut de la PPO est conservées à -10 °C.

### 2.2.2 Mesure de l'activité catécholase de la PPO

L'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO de la datte Deglet nour est mesurée à 410 nm en utilisant le catéchol 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 (Fan et Flurkey, 2004 ; Espín et al., 1995).

Le catéchol à 0.4 M est préparée dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM (Fan et Flurkey, 2004). Le milieu réactionnel contient 1 ml de substrat à 40 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 (10) (Ünal, 2007).

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 10:** Exemple de calcul de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la PPO de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) (pH 5.6-0.05 M tampon acétate de sodium ; catéchol 40 mM ; 30°C, extrait enzymatique 20  $\mu$ l).

### **2.2.3 Effet de la concentration de l'enzyme**

La vitesse initiale de l'oxydation de la catéchol à 40 mM par la PPO de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L) est mesurée à différents volumes croissants de l'enzyme compris entre 10 et 120  $\mu$ l.

L'activité enzymatique a été mesurée à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C.

### **2.2.4 Détermination des paramètres cinétiques de l'activité catécholase de la PPO**

Pour déterminer les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) de l'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L), l'activité enzymatique est mesurée à pH 5.6 (tampon acétate de sodium à 0.05 M) et à 30°C, à différentes concentrations de la catéchol comprises entre 20 à 100 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  $1/[S]$ ).

### **2.2.5 Effet du pH sur l'activité catécholase de la PPO**

L'activité o-diphénolase de la PPO est mesurée à 30°C dans l'intervalle de pH compris entre 03 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 catéchol à 40 mM est utilisée comme substrat.

Toutes les expériences ont été réalisées deux fois.

### **2.2.6 Etude de la stabilité thermique de l'activité catécholase de la PPO**

L'activité catécholase 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 2 ml 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 5.6 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C, en présence de 40 mM du catéchol comme substrat.

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

$$AR_{(96)} = \left( \frac{A_t}{A_0} \right) \times 100 \quad \text{Equation (6)}$$

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 deux fois.

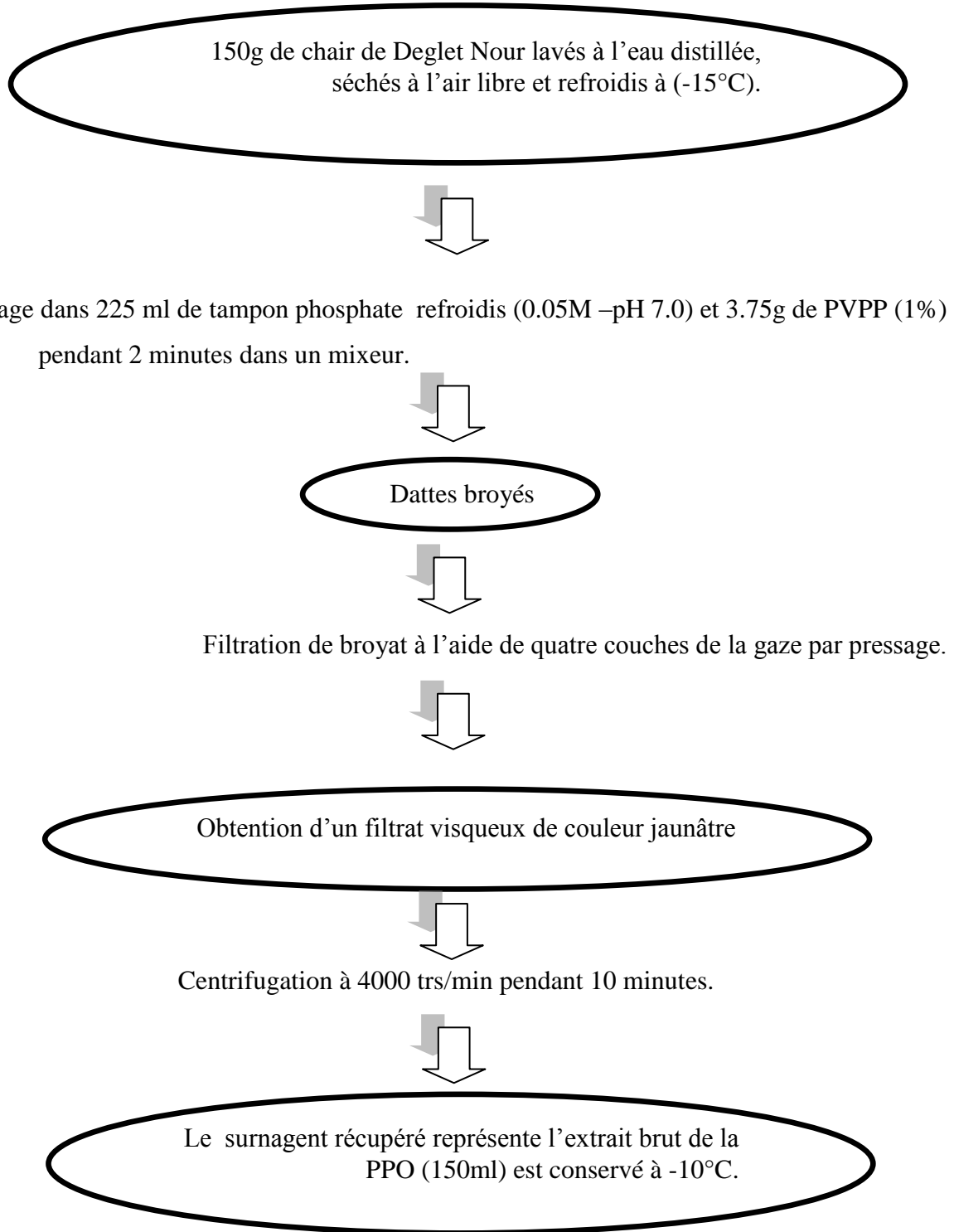
### **2.2.7 Analyse des résultats expérimentaux**

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™ (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.).

# *Résultats et discussion*

**3.1. Extraction de la polyphénol oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L)**

Le diagramme de l'extraction de la PPO des dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) est le suivant (Figure 11) :



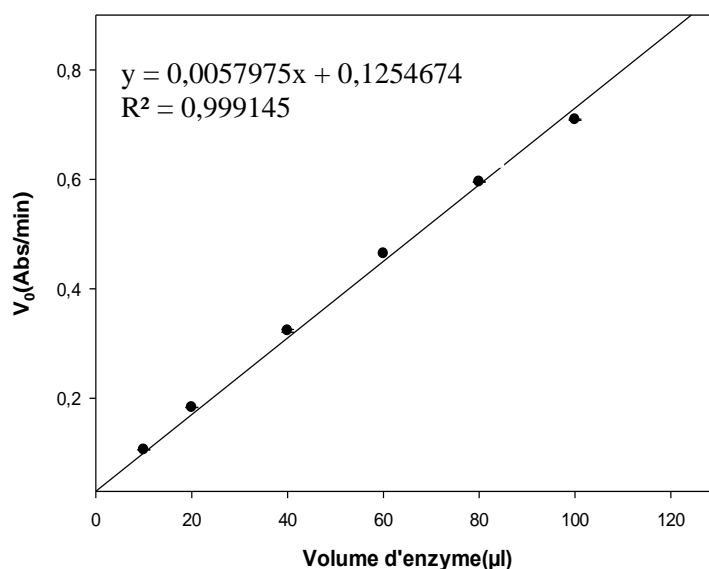
**Figure11:** Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes Deglet nour (*Phœnix dactylifera* L).

L'activité de la PPO dans l'extrait brut a été testée par leur activité catécholase en utilisant le catéchol à 40 mM comme substrat spécifique. On a observé que l'extrait brut est capable d'oxyder le catéchol due à la présence d'une oxydase qui est la polyphénol oxydase.

### 3.2 Propriétés biochimiques de l'activité catécholase

#### 3.2.1. Effet de la concentration de l'enzyme

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de la PPO dans les conditions Michaeliennes, il était nécessaire de déterminer la concentration en enzyme qui permet d'obtenir une réponse linéaire de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'enzyme. Dans ces conditions, la vitesse de réaction dépend uniquement de la concentration en substrat. L'oxydation a été réalisée avec une concentration saturante en catéchol, soit 40 mM de volume réactionnel et différents volumes d'extrait enzymatique allant de 10 à 110  $\mu$ l par 1 ml de volume réactionnel.



**Figure 12:** Effet de la concentration de la catéchol oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L) sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 5.6 ; 30°C ; catéchol 40 mM)

La Figure (12) montre que l'activité catécholase dépend de la concentration de l'enzyme et est directement proportionnelle à sa concentration dans le milieu réactionnel. Ce même comportement a été également décrit par Ziyani et Pekyardimci (2004) et Gouzi et Benmansour (2007).

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

### 3.2.2 Détermination des paramètres cinétiques

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité catécholase a été étudié dans une gamme de concentration catéchol comprise entre 20 et 100 mM. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants (tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.7 à température de 30°C). Les valeurs des paramètres cinétiques  $V_{max}$ ,  $K_m$  ont été calculées à partir des représentations de Michaelis-Menten (Equation (1)) et de Lineweaver-Burk (Equation (2)) selon les équations suivantes (Dalmadi *et al.*, 2006) :

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

$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{K_m}{V_{max}} \right) \left( \frac{1}{[S]} \right) + \left( \frac{1}{V_{max}} \right) \dots\dots\dots \text{Equation (2)}$$

Où

$V_0$  est la vitesse initiale de la réaction (µmol/l/min) ;

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

$[S]$  est la concentration de catéchol (mM) ;

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

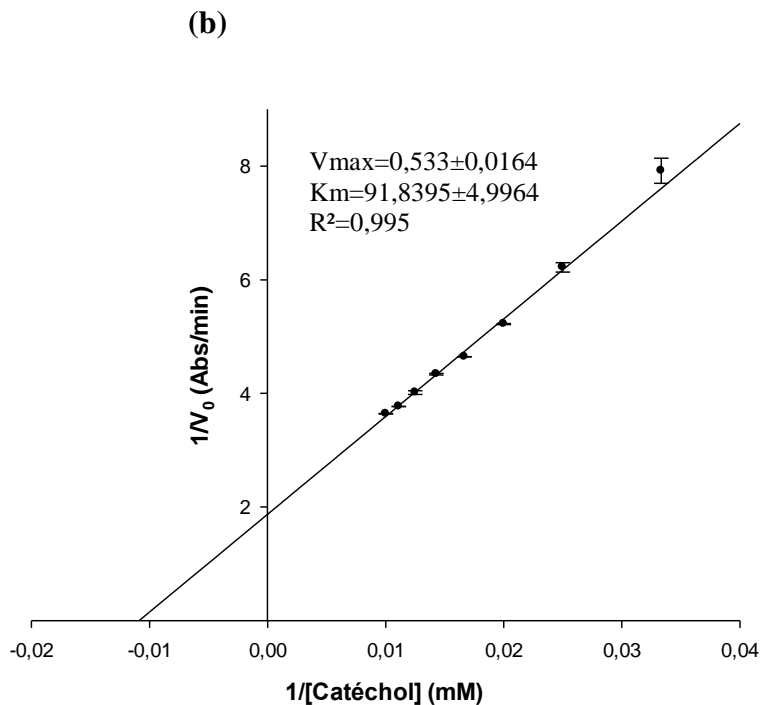
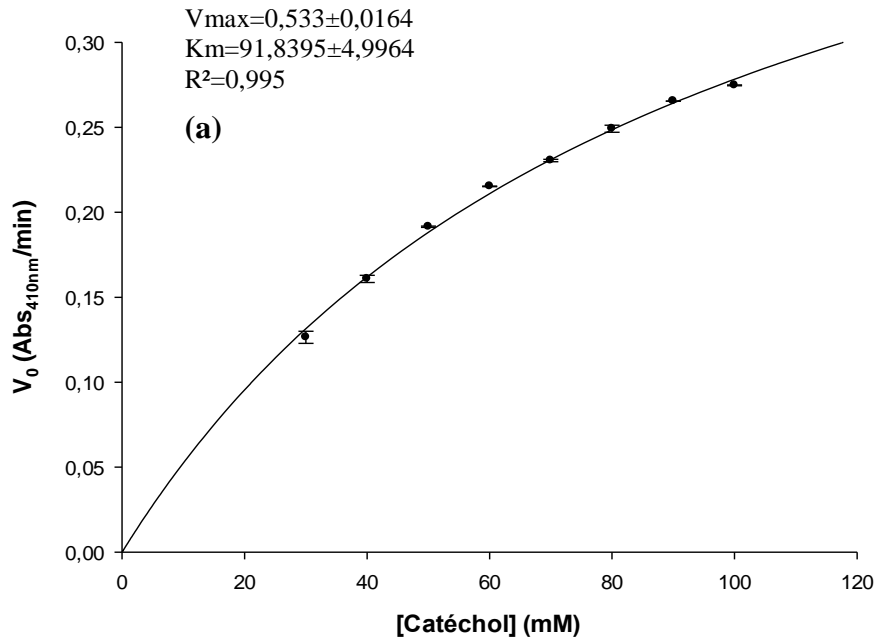
La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) mesure l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat, la faible valeur de ce paramètre signifie que l'enzyme a une forte affinité vis-à-vis de son substrat (Siddiq *et al.*, 1992).

D'après la Figure (13) on observe que lorsque la concentration du catéchol augmente de 20 à 100 mM, l'activité catécholase augmente jusqu'à 100 mM. Au-delà de cette concentration saturante en substrat, l'activité enzymatique diminue en raison du phénomène d'inhibition par excès de substrat (Gouzi et Benmansour, 2007; Mayberry et Mallette, 1962; Palmer, 1963; Duckworth et Coleman, 1970).

Il s'avère que le substrat à des concentrations très élevées, peut empêcher fortement sa propre conversion en produit (Palmer., 1985). Cet effet inhibiteur est souvent attribué à une

forte inhibition de l'enzyme par le produit de la réaction, et parfois à la compétition entre le produit et le substrat (Palmer, 1985 ; Macrae et Duggleby, 1968).

Les valeurs des paramètres cinétiques apparents sont :  $V_{\max} = 0,533 \text{ Abs/min}$ ,  $K_m = 91,8395 \text{ mM}$



**Figure 13:** Effet de la concentration du catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par la catéchol oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L): (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.

On constate que la valeur de la constante de Michaelis-Menten est plus élevée par rapport à celle trouvée pour les PPOs des autres sources végétales. Par conséquent, la PPO de Deglet Nour d'Algérie a une faible affinité pour le pyrocatechol comme substrat.

Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten de la PPO pour le catéchol comme substrat rapportées dans la littérature sont comme suit : 10.7 mM, pour la PPO de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) (Dogan et al., 2005); 2.45 mM pour la PPO de truffe (*Terfezia leonis* L.) (Maache et Bendjeadia ; 2011) ; 5.55 mM, pour la PPO de la poire (*Pyrus communis*) (Ziyan et Pekyardimci, 2004); 5.2 mM pour la PPO de cerise (*Malpighia glabra* L.) (Kumar et al., 2008) ; 2 mM, pour la PPO d'avocat.

La PPO des dattes Deglet nour a une bonne affinité vis-à-vis du catéchol par rapport aux PPOs du chou de Chine (*Brassica rapa* L.) ( $K_m = 682.5$  mM) (Nagai et al., 2001) et de la fleur de Rape (767 mM) (Sun et al., 2012).

Gouzi et Benmansour (2007), Wang et al. (2007) et Önez et al. (2008) ont trouvé des valeurs de  $K_m$  de 0.4 mM, 6.3 mM et 3.65 mM pour le catéchol comme substrat, pour la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), de la PPO de la mangue (*Mangifera indica* L.) et du raisin (*Vitis vinifera* L.) respectivement.

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; Ziyan et Pekyardimci, 2004). Dogan et al., (2005) supposent que le pH affecte aussi les valeurs apparentes du  $K_m$ .

Le tableau suivant résume les valeurs des paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origine végétales avec différents substrats utilisés

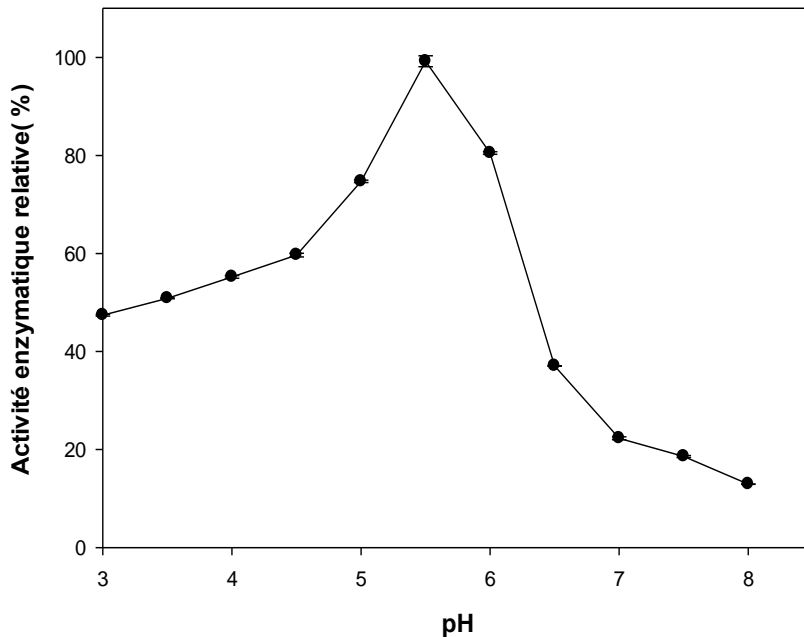
**Tableau 2:** Paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origine végétale

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

### 3.2.1 Effet du pH

L'influence du pH sur l'activité catécholase Deglet Nour (*Phoenix dactylifera L*) a été déterminée ; on mesurant les vitesses initiales d'oxydation du catéchol à différents pH compris entre 3.0 et 8.0, tout en maintenant les autres paramètres expérimentaux constants. Les systèmes tampon utilisés sont : le tampon acétate de sodium (0.05 M ; pH 3.0-6.0), et le tampon phosphate de sodium (0.05 M ; pH 6.0-8.0).

La Figure (14) représente le profil de l'activité catécholase relative en fonction du pH pour l'oxydation de catéchol. L'activité catécholase est maximale à pH 5.6. De part et d'autre de ce pH on assiste à une diminution de l'activité enzymatique qui peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation de la catéchol 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 catéchol.



**Figure 14:** Variation de l'activité enzymatique de la PPO des dattes Deglet Nour en fonction du pH.(en présence de pyrocatechol comme substrat)

Comme l'indique le Tableau (3), la PPO de datte est plus active dans les conditions acides que dans les conditions alcalines, ce qui est nettement différent par rapport à la plus part des PPOs qui montrent une activité PPO maximale dans le domaine de pH neutre ou proche de la neutralité. Le comportement de la PPO de datte Deglet nour vis-à-vis du pH est similaire par rapport à celui des PPOs des autres sources (Tableau 3).

L'activité faible de la PPO à pH 7.0 peut être exploitée, le brunissement enzymatique des dattes durant leur stockage ou leur transformation peut être contrôlée par l'utilisation des solutions neutres.

Le pH optimal de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Mayer et Harel, 1979 ; 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 (Whitaker, 1994 ; Luh et Phithalopol, 1972 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Kolcuoğlu et *al.*, 2006).

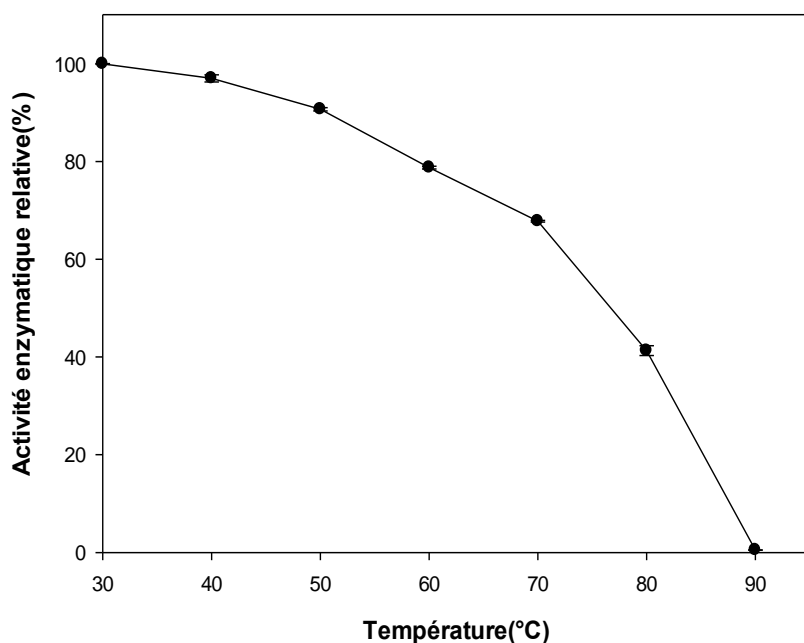
**Tableau 3:** les valeurs de pH optimal de la PPO obtenue à partir de différentes sources végétales.

Source de la PPO	pH optimal	Référence bibliographique
Laitue ( <i>Lactuca sativa</i> var, capitata L.)	5.5	Gawlik-dziki et al. (2007)
Fraise ( <i>Fragaria ananassa</i> )	5.0	Dalmadi et al. (2006)
Banane	6.5	Ünal (2005)
Chou fleur ( <i>Brassica oleracea</i> var, botrytis italica)	5.7	Gawlik-Dziki et al. (2007)
Poire suvage ( <i>Pyrus elaeagnifolia</i> )	6.0	Yerlitürk et al. (2008)
Datte deglet nour ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.)	5.8	Bechrair et Bechrair (2010)
Fleur de viol ( <i>rape flower</i> )	5.5	Sun et al. (2012)
Choux de Chine ( <i>Brassica rapa</i> L.)	5.0	Nagai et Suzuki. (2001)
Raisin de chaunac	6.0	Lee et al. (1983)
Datte (Zahdi et Barhee)	6.8	Sachde et al. (1989)
Trufe ( <i>terfezia leonis</i> Tul)	7.0	Maache et Bendjedia
Datte Deglet nour ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.)	5.6	Notre travail

### 3.2.4 Etude de la stabilité thermique

La Figure (15) représente les résultats de l'étude de la stabilité thermique de l'activité catécholase de la PPO de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L). On constate que l'activité catécholase n'est pas stable thermiquement à des températures supérieures à 40°C et La vitesse d'inactivation thermique est plus grande au-delà de cette température.

Les températures supérieures à 40°C provoquent une diminution progressive de l'activité enzymatique. Après 10 min de traitement à 55, 60 et 70°C, l'activité de la PPO est réduite par 18.1, 20.0 et 32.2 %, respectivement. Une activité catécholase résiduelle non négligeable 40% a été mesurée lorsque l'enzyme est incubée à 80°C. L'enzyme est presque totalement dénaturée à 90°C. Par conséquent, il semble que la PPO des dattes Deglet Nour d'Algérie est plus thermostable par rapport aux PPOs obtenues à partir de la fraise (*Fragaria ananassa*) (Dalmadi et al., 2006), de la mangue (*Mangifera indica* L. CV. "Tainong") (Wang et al., 2007), du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (Gouzi et Benmansour, 2007), du raisin (*Vitis vinifera* ssp. sativa) (Rapeanu et al., 2005). des truffes (*terfezia leonis*) (Maache et Bendjedia., 2011), des fraises (Serradell et al., 2000) ; de la pomme (Eidhin et al., 2006) ; et de la céleri (Yağar, 2004)



**Figure 15:** Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrocatechol comme substrat)

Yağar (2004) a montré que la PPO extraite à partir du céleri (*Apium graveolens* L.) perde environ 70% de son activité initiale à 50°C et environ 85% de son activité à 60°C pendant 30 min du traitement thermique (pH 7 (tampon phosphate 0,05 M), 0.2 ml enzyme, catéchol à 20 mM).

L'étude de la thermostabilité de la PPO du Châtaigne (*Castanea henryi*), montre que l'activité de l'enzyme diminue de 10% lorsqu'elle est incubée pendant 30 min à 40°C (pH 7 (tampon phosphate de potassium à 0,025 M); 20 µl d'enzyme, catéchol à 3.3 mM). Par conséquent cette enzyme demeure thermolabile (Xu et al., 2004).

La diminution de l'activité enzymatique au-dessus de 40°C pourrait être due d'une part aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire et d'autre part de la destruction du site actif de l'enzyme et d'autre part à la présence des formes multiples d'enzyme de la PPO dont, certaines sont extrêmement thermolabiles (Khatun et al., 2001 ; Yemenicioğlu, 2002). Il est également probable qu'un chauffage doux cause la dissociation de quelques formes oligomériques de la PPO en monomères moins actifs (Yemenicioğlu, 2002).

Doğan et al. (2005) suggèrent qu'une diminution du pourcentage de l'activité résiduelle aux températures élevées peut être réellement due au déploiement de la structure tertiaire de l'enzyme pour former une structure secondaire qui est dépourvue d'activité catalytique.

Il est plus notable qu'à des températures relativement élevées plusieurs liaisons faibles qui maintiennent la structure native de l'enzyme sont déstabilisées et solvatées et par conséquent l'enzyme devient inactive (Tuena de Gómez-Puyou et Gómez-Puyou, 1998).

La PPO n'est pas une enzyme extrêmement thermostable (Amiot et *al.*, 1997).

La tolérance thermique des enzymes dépend également de la spécificité de substrat, et au pH optimal, de la température, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et du cultivar (Vámos-Vigyázó, 1981; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003). Elle peut être liée aussi à la maturité de la plante et des formes moléculaires de l'enzyme (Zhou & Feng, 1991). En général, la PPO n'est pas une enzyme très stable à la température par rapport à d'autres enzymes responsables de la dégradation de la qualité alimentaire et son inactivation thermique est une forme d'inhibition (Amiot et *al.*, 1997 ; Mayer et Harel, 1991).

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique montrent que la PPO de datte Deglet nour est une enzyme thermorésistante. Cette grande thermostabilité peut être expliquée par la présence de sucres.

# *Conclusion*

Parmi les effecteurs qui interviennent dans le brunissement du DegletNour(*Phoenix dactylifera* L) et des nombreux autres produits végétaux, la polyphénol oxydase joue un rôle essentiel.

Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de cette thèse c'est focalisé en particulier sur l'activité catécholase d'un extrait de DegletNour(*Phoenix dactylifera* L) Ce qui nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes:

- 1- l'activité catécholase dépend de la concentration de l'enzyme et est directement proportionnelle à sa concentration dans le milieu réactionnel.
- 2- la valeur de la constante de Michaelis-Menten est plus élevée par rapport à celle trouvée pour les PPOs des autres sources végétales. Par conséquent, la PPO de DegletNour d'Algérie a une faible affinité pour le pyrocatechol comme substrat. Les valeurs des paramètres cinétiques apparents sont :  $V_{max} = 0,533 \text{ Abs/min}$ ,  $K_m = 91,8395 \text{ mM}$
- 3- L'activité catécholase est maximale à pH 5.6. Le pH optimal de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Mayer et Harel, 1979 ; Yoruk et Marshall, 2003).
- 4- L'étude de la stabilité thermique de l'activité catécholase de la PPO montre que sa température optimale apparente est comprise entre 30°C et 40°C. Une activité catécholase résiduelle non négligeable 40% a été mesurée lorsque l'enzyme est incubée à 80°C L'enzyme est presque totalement dénaturée à 90°C. Par conséquent, la PPO des dattes DegletNour d'Algérie est plus thermostable.

# *Références bibliographiques*

- **A.-C. Bêchera, M.Maka, 2006.** Ethnobotanique. Les dattes, de la préhistoire à nos jours. *Phytothérapie* Numéro 1 : 43-47
- **Abouzed, A. A., &Baghlef, A. O. 1983.** Utilization of date seeds and cheese whey in production of citric acid by *Candida lipolytica*. *Agricultural Wastes*, 8, 131–142.
- **Abouzed, A. A., Abderrahman, N., &Baghlef, A. O. 1991.** The formation of activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.* 50:111-115
- **Al obaidi, Z. S., & Berry, D. R. 1982.** Saling up of citric acid fermentation using fermenters. *Date Palm Journal*, 2, 19–33.
- **Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., &Shahidi, F. 2005.** Compositional and sensory characteristics of three native sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7586–7591.
- **Al-hooti, S., Sidhu, J. S., Al-otaibi, J., Al-ameeri, H., &Qabazard, H. 1996 a.** Processing of some important date cultivars grown in United Arab Emirates into chutney and date relish. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20, 55–68.
- **Al-hooti, S., Sidhu, J.S. &Qabazard, H. 1996 b.** Objectifcolor measurement of fresh date fruits and processed date products. *Journal of Food Quality*, Vol. 20:257-266.
- **Al-Shahib, W., Marshall, R.J., 2002.** Dietary fibre content of dates from 13 varieties of date palm *Phoenix dactylifera* L. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 719-721.
- **Al-Shahib, W., Marshall, R.J., 2002.** Dietary fibre content of dates from 13 varieties of date palm *Phoenix dactylifera* L. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 719-721.
- **Ameer, Q & Adeloju, S.B. 2009.** Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B*. 140: 5–11
- **Amiot, M. J., Fleuriet, A., Cheynier, V., Nicolas, J. 1997.** Phenolic compounds and oxidative mechanism in fruit and vegetables. In *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*; Tomas-Barberan, F. A., Robins, R.J., Eds.; Oxford Science Publications: London, U.K.

- **Anderson, J.W. 1968.** Extraction of enzyme and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, Vol. 7, pp. 1973.
- **Anon. 1973.** *Enzyme Nomenclature*, Elsevier, Amsterdam.
- **Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I. 1997.** Polyphenol oxidase from *Allium* sp..*Journal of Agricultural and Food Chemistry*.45:2861–2863.
- **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.
- **Atlow, S.C.,Bonadonna-Aparo, L., Klibanov, A.M. 1984.** Dephenolization of Industrial Wastewaters Catalyzed by Polyphenol Oxidase. *BiotechnolBioeng*. 26: 599-603.
- **Barreveld W H. FAO. 1993.** Agricultural Services Bulletin N° 101, Date Palm Products. FAO, Rome, 39p.
- **Bechrair A et Bechrair F. 2010,** Extraction, purification et caractérisation de la polyphénol oxydase de DegletNour (*Phoenix dactylifera* L.). Mémoire d'ingénieur d'état, un, Amar telidji, L'Aghouat.P91.
- **Belarbi, A., Aymard, C., Meot, J.M., Themelin, A., Reynes, M., 2000.** Water desorption
- **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, 205-210.
- **Benchelah A-C;M.Maka ;2006.**Les dattes ,de la préhistoire à nos jours ;EthobotaniquephytothérapieNuméro 1 :43-47
- **Bendjedia N et Maache H.2011,** Etude cinétique de l'inactivation thermique de l'activité o-diphénolase des truffes (*TerfezialesonisTul*). Mémoire d'ingénieur d'état, un, Amar telidji, L'Aghouat.
- **BENNACEUR, C. LANAUD, M. H .CHEVALLIER and N. BOUNAGA .1991.** Genetic Diversity of the Date Palm (*Phoenix dactylifera*L.)from Algeria Revealed by Enzyme Markers;*Research Unit for Arid Zones, Algiers (Algeria);Laboratory for Genome Analysis of Tropical Plants, Montpellier (France)* 107, 56—69

- **Ben-Yosef, V S., Sendovski, M., Fishman, A. 2010.** Directed evolution of tyrosinase for enhanced monophenolase/diphenolase activity ratio *Enzyme and Microbial Technology*. 47:372–376.
- **Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., Drira, N. E., & Attia, H. 2004.** Date seeds: Chemical composition and characteristic profiles of the lipid fraction. *Food Chemistry*, 84, 577–584.
- **Bonner, W.D. 1955.** *Plant Physiol.*, 30, XXX.
- **Bouchilloux, s., mcmachill, p., and mason, h.s. 1963.** The multiple forms of mushroom tyrosinase, purification and molecular properties of the enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 238, no.5, pp. 1699-1706.
- **Bouguederi I., Maanani F., Missaoui M., Bounaga N., Dore J. C., 1994.** Analyse typologique d'une population de palmiers dattiers males (*Phoenix dactylifera L.*) au moyen de différentes approches multiparamétriques. *Amélior. Prod. Agr. Milieu Aride*. 6 : 263-277.
- **Brac de la prière RA. 1995.** le palmier dattier. Alif/Edisud.
- **Buelguedj A., 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.
- **Burton, S.G. 1994.** Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*. 22:459-487.
- **Cheftel J.C., Cheftel H. 1977.** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Ed. Technique et documentation. Lavoisier, Paris, vol. 1, 381 p.
- **Chehma A. et HF. Longo 2001,** Valorisation des Sous-Produits du Palmier Dattier en Vue de leur Utilisation en Alimentation du Bétail, *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 59-64.
- **Cheikh-Rouhou, S., Baklouti, S., Hadj-Taieb, N., Besbes, S., Chaabouni, S., Blecker, C., et al. 2006.** Elaboration d'une boisson à partir d'écart de triage de dattes: Clarification par traitement enzymatique et microfiltration. *Fruit*, 61, 389–399.  
Chemical composition and characteristic profiles of the lipid fraction. *Food Chemistry*, 84, 577–584.
- **Cheng, X.-F., M., 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.

- **ChibaneHayet ,2008**, Thèse de doctorat sur :l'Aptitudes Technologiques de Quelques Variétés Communes de Dattes : Formulation d'un Yaourt Naturellement Sucré et Aromatisé131page
- **Cho, Y.K., Ahn, H.K. 1999a**. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*. 23:577-592.
- **Claus, H &Decker,H. 2006**.Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*,29:13-14.
- **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.
- **Craft CC., Audia, WM. 1962**. Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Bot. Gaz*, 123: 211-219.
- **Cui, Y., Barford, J.P.,Renneberg, R. 2006**.A disposable, screen-printed electrode for the ampero-metric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*. 22 : 1279-1281.
- **Dalmadi,I.,Rapean,G.,Loey,An.,Smout,C.,Hendrickx ,M. 2006**. Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragariaananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. *Journal of Food Biochemistry*,V 30, p 56–76.
- **Dalmadi I, Gabriela R, van loey A, Smout C., and Hendrickx M. 2005**.Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*fragariaananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study,p8.
- **Dawson, C.R., Magee, R.J. 1955**. Plant tyrosinase (polyphenol oxidase). *Methods in enzymology*. 2:817-831.
- **Decker, H., Terwilliger, N. 2000**. COPS AND ROBBERS: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*.203:1777-1782
- **Dicko, M.H.,Hilhorst, R., Gruppen, h., laane, c., van berkel, w.j.h., voragen, a.g.j. 2002**.Note & tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical biochemistry*. 306:336-339.
- **Dixon M.,Webb E.C., 1964**.Dans"enzymes".longman ed.,londres 694-695.
- **Djerbi M, 1994**. Précis de phéniculture, F.A.O, Rome, 191 p.
- **Dogan, M and Dogan, S. 2003**.Determination of kineticproperties of polyphenol oxidase from *Thymus (Thymuslongicaulis*subsp. *Chaubardii*var. *chaubardii*). *J FoodChem*. 39: 1-9.

- **Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H., Arslan, O. 2005.** Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynarascolymus L.*). *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 53(3)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
- **Duckworth, H.W., Coleman, J.E. 1970.** Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 245(7)1613-1625.
- **Duran, N., Esposito, E. 2000.** Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ.* 28: 83–99.
- **Eicken, C., Krebs, B., Sacchettini, J.C. 1999.** Catechol oxidase: structure and activity. *Catalysis and regulation. Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.
- **Eidhin, N., Myrphy, E., O'Beirne, D. 2006.** Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh .cv Bramley' Seedling) purification strategies and characterization. *Journal Of Food Science*. 71(1)51-58.
- **El-Bayoumi, M.A., Frieden, E. 1957.** A Spectrophotometric Method for the Determination of the Catecholase Activity of Tyrosinase and Some of its Applications. 79:4854-4858.
- **Erat, M., Nuri, Y., Gülşah, S.A., Demirkol, A. 2010.** Partial characterization of polyphenol oxidase from a hybridized wheat (*Triticumaestivum L.*) *European Food Research and Technology*. 23,6,899-905.
- **Espiard. (2002)** .introduction à la transformation industrielle des fruits .Ed .Teach et Doc-lavoisier, 147-155 .
- **Espín, J.C., Morales, M., Varón, R. 1995.** A continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple Polyphenol Oxidase. *Analytical Biochemistry*. (231)237-246.
- **Espín, J.C., Varón, R., Tudela, J., Garcia-Cánovas, F. 1997.** Kinetic study of the oxidation OF 4-hydroxyanisole catalyzed by tyrosinase. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 41(6)1265-1276.
- **Es-Safi, N.E., Cheynier, V., Moutounet, M. 2003.** Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *J. Food Compost*. 16:535–553.

- **Estanove P. 1990.** Note technique : Valorisation de la datte. In Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles méditerranéens. Ed. CIHEAM, 301-318.
- **Fan, Y., Flurkey, W.H. 2004.** Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*. 65:671-678.
- **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.
- **formation of citric acid by *Candida lipolytica*. Zentral Microbiology, 148, 213–221.**
- **Frieden, E., Ottesen. 1959.** A Simplified method for the purification of mushroom polyphenol oxidase. *Short Communications*. 34:248-251.
- **Gandía-Herrero., F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F., Escribano, J. 2005.** Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* 386:601-607.
- **Gaillard, F., Richard-Forget, F., Nicolas, J. 1993.** New Spectrophotometry Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry*. 215:59-65.
- **Gawlik-Dziki et al. 2007** .Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food Chemistry* 105 ,1047–1053.
- **Ghazi F., Sahraoui S., 2005.** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantboucht et Hamraïa. Mémoire d'ingénieur .Institut national d'agronomie. Alger, 81 p.
- **Gilles, P., 2000.** Cultiver le palmier dattier .Ed. CIRAS, 110 p.
- **Golbeck, J.H and Cammarata, K. V. 1981.** Spinach Thylakoid Polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67:977-984.
- **Gouzi H., Depagne C., Benmansour, A., Coradin . 2013.** First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis Tul.*) and its thermal behavior. *Eur Food Res Technol* .
- **Gouzi, H., Benmansour, A. 2007.** Partial purification and characterization of Polyphenol Oxidase Extracted from *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbatch. *International Journal Of Chemical Reactor Engineering*. Vol. 5. Article A76.

- **Goyeneche,R., Di Scala,K , Roura. 2013.**Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish(*Raphanussativusvar.sativus*) Food Science and Technology.(54), 57-62
- **Guizani a, Ghalib N , Al-Saidi S , Shafiur M, Rahman a, Bornaz b, Al-Alawi a. 2010.** State diagram of dates: Glass transition, freezing curve and maximal-freeze-concentration condition,journal of food EngineeringVol 99 : 92–97.
- **Haghbeen, K., Saboury, A.A., Karbassi, F. 2004.** Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et BiophysicaActa*. 1675:139-146.
- **Halaouili, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., Lomascolo, A., 2006.** Fungal tryrosinases: new prospects in molecular characteristics,bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 100, 219–232
- **Hannachi S., Khitri D., Benkhalifa A., Brac de Perrière R.A., 1998.** Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. 225 p.
- **Hannachi, S., Khitri, D., Benkhalifa, A., Brac de Perrière, R.A. 1998.** Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. 225 p.
- **HASEGAWA, S. and MAIER, V. P. 1980.** Polyphenol oxidase of dates. *J.Agric. Food Chem.* 28, 891-893
- **Hobani, A. I.1998.** Rheological behaviour of date-water concentrates. *Journal of Food Engineering*, 36, 349–357.
- **Hussein, A. S., Alhadrami, G. A., & Khalil, Y. H. 1998.**The use of dates and date pitsin broiler starter and finisher diets. *Bioresource Technology*, 66, 219–223.
- **Jarrah a. Z., Benjamin N. D. 1982.** Activity of polyphenoloxydase and pectin esterase during different stages of growth and developpement. *Date.Palm.Journal.* vol. 1, n°2.
- **Jimenezatienzar, M., Pedreno, M and Garciacarmona, F. 1991.** Activation of polyphenol Oxidase by Polyamines, *BiochemInt* 25:861.
- **Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998.** Agaricusbisporus browning: a review. *Mycol. Res.*102(12)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.

- **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.
- **Joslyn, M.A and Ponting, J.D. 1951.** Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.* 3:1-44.
- **Kachmoula. T, 1982.** ‘*Etude du Papier Fabriqué des Palmes de Dattier selon la Méthode de Polysulfide*’, 1er Symposium sur le Palmier Dattier, Univ. El hassa, Arabie Saoudite, 23-25 mars1982. (pub-arabe).
- **Keilin, D and Mann, T. 1938.** Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.*125:187-204.
- **Kenten, R.H.1957.** Latent phenolase in extracts of broad-bean (*Vicia faba*L.) leaves. Activation by acid and alkali, *Biochem. J.* 67:300–307.
- **Khatchadourian, H. A., Sawaya, W. N., Khalil, J., & Mashadi, A. S. 1983.** Processing of five major Saudi Arabian date varieties into dates butter and dates in syrup. *Date Palm Journal*, 1, 103–119.
- **Khatun, S., Absar, N., Ashraduzzaman, M.2001.** Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringaoleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 4 (9) 1129-1132.
- **Kim, J.Y., Seo, Y.S., Kim, J.E., Sung, S-K., Song, K.J., An, G., Kim, W.T. 2001.** Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Science.* 161:1145-1152.
- **Klabunde, T., Eicken, C., Sacchetti, J. C., Krebs, B. 1998.**Crystal structure of a plant catecholoxidase containing a dicopper center. *Nat. Struc. Biol.* 12.
- **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, N. 2006.**Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry.*101:778-785.
- **Kubowitz, F. 1938.** Spaltung und resynthese der polyphenoloxydase und des hamocyanins. *Biochem. Z.* 299:32-57.

- **Kuby, S. A.1991.** In a study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding (Volume I), *CRC Press Inc., Boca Raton*. 301–339.
- **Kumar Anil, V. B., Mohan Kishor, T. C., Murugan, A. 2008.** Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barados cherry (*Maipighiaglabra* 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.
- **Laveda, F., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona., F and Sanchez-Ferrer., A. 2001.** Proteolytic activation of latent *Paraguay peach* PPO. Characterization of monophenolase activity. *J. Agric. Food Chem*. 49:1003-8.
- **Lax A.R & Vaughn K. C.1991.** Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol*. 96: 26-31
- **Lee, C., Smith, N.L., Pennesi, A.P. 1983.** Polyphenol oxidase from DeChaunac grapes. *J. Sci. Food Agric*. 34:987-991.
- **Lerch, K. 1981.** Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine  $\beta$ -monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. Marcel Dekker, New York, Basel. 143-186.
- **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.
- **Luh., b.s And Phithalopol, b.1972.** Characteristics of polyphenol oxidase related to browning in Clingstone peaches. *J. Food Sci*. 37, 264.
- **MA/DSAAEE, 2001.** Statistiques agricoles : *Superficies et productions*. Ministère de l'agriculture et du développement rural. Série A, pp 5-6.
- **Macheix J.J., Fleuriet A. et Billot J. 1990.** Phenolic compounds in fruit processing. C.R.C. Press, BOCA\_RATON. Fruit phenolics, pp 295-322.
- **Macrae, A.R and Duggleby R.G. 1968.** Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase. *Phytochemistry*.7:855-861.
- **Mansouri A., Guendez E., Kokkalouc E., et Panagiotis K., 2005.** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry* .89, 411-420.
- **Martinez V.M. & Whitakerj.R.,1995.** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, 6, 195-200.

- **Martínez.C, M., Corzo,N .,Villamiel,M., Del Castillo,M,D. 2012.** chapitre 4 Browning Reactions.Food Biochemistry and Food Processing, Second Edition.
- **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.
- **Matheis, G. 1987a.** Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. Vol. 11, pp. 5-12.
- **Mayberry, J.M and Mallette, M.F. 1962.**Inhibition of thetyrosinaseoxidation of onesubstratebyanother. TheJournal of General Physiology. 45: 1239-1245.
- **Mayer A.M.,2006.** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. *Phytochemistry.*, 67, 2318–2331
- **Mayer, A.M and HAREL, E. 1991.** Phenoloxidasés and their Significance in Fruit and Vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science.
- **Mayer, A.M and Harel, E. 1979.** Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*. 18:193-215.
- **Mayer, A.M., Harel, E., Anden-Shaul, R.1966.** Assay of catechol oxidase– acritical comparaisón of methods. *Phytochemistry*. 5:783-789.
- **Mesquita,V,L,V.,Queiroz,C.2013.**Chapter 10 ;Enzymatic Browning. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*,387-418.
- **Min, K., Yoo, Y.J.2009.**Amperometricdetectionofdopaminebased on tyrosinase– SWNTs–Ppycompositeelectrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.
- **Miranda, M., Zarivi, O., Bonfigli, A., Ragnelli, M., Rocchina, P., Aimola, P., Pacioni, G. 1996.** White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science*. 120:29-36.
- **Mohammed N.A., Nezam deldina.N. 1985.** A study on browning reaction in the major stages maturity of Zahidi date. Dep. Date and palm. Agric. Water. Reso. Res. Cent. Sci. Res. Council, Baghdad, 13 p.
- **Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R. 2010.** A disposableLaccase– Tyrosinasebasedbiosensorforamperometricdetectionofphenoliccompounds in must andwine. *Journal ofMolecularCatalysis B: Enzymatic*. 64: 189–194.

- **Munier P, 1973.** Le palmier dattier, Maison neuve et larose, Paris. 25-28-31-32-40-48-141-142-221-367p.mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate." *Colloid Surface B* 32(2):
- **Nacib, N., Nacib, A., Mostefa, G., Larbi, L., Adimi, L., Remmal, M., et al. 1999.**Use of date products in production of thermophilic dairy starters strain *Streptococcus thermophilus*. *Bioresource Technology*, 67, 291–295.
- **Nagai T and Suzuki N .2001 .** Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage *Brassica rapa* L. *Food Chemistry* 49, 3922-3926
- **Naish-Byfield, S and Riley, P.A.1992.** Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.* 288:63-67.
- **Nelson, R.M and Mason, H.S. 1970.** Tyrosinase (mushroom). In *Methods in Enzymology* (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.).17:626-632. *Academic Press, New York*.
- **Nicolas J.J. et Potus J. 1993.** Phénomènes d'oxydation enzymatique et cooxydation. Exemple du rôle de la lipoxygénase de panification et de la lyoxygénase en technologie des fruits. *Sciences des fruits*, vol. 14, pp 627-642.
- **Njagi J., Chernov ,M.M., Leiter L.C., Andreescu ,S.2010.**Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
- **Noui, Y. 2007.** Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Thèse de Magister spécialité génie alimentaire, Université de Boumerdès. 62 p.
- **Nuñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M. 2005.** Polyphenol oxidase from dominga table grape. *J. Agric. Food Chem.*53:6087–6093.
- **Önez, Z., Karakus, E., Pekyardimci, S. 2008.** Izmir grape Polyphenol Oxidase (*Vitisvinifera*L) partial purification and some kinetic properties.*Journal of FoodBiochemistry*.32:398-414.
- **Palmer, J.K. 1963.** Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology*. pp. 508-513.
- **Palmer, T.1985.** Understanding enzymes. Second Edition. Ellis Horwood Series. British Library. *Chichester, England*. pp. 161-331.

- **Papa, G., Pessione, E., Leone, V., And Giunta, C.1994.**Agaricusbisporustyrosinase– I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215-221.
- **Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., Garcia-Carmona, F. 2001.** Monophenolase activity of latent *Terfeziacloverityrosinase*: Characterization and histochemical localization. *PhysiolygiaPlantarum.* 133:203-209.
- **Polaina, J &Maccabe,A P.2007.**Industrial enzymes: structure, function and applications .Springer, XII, 642 p
- **Quarta,A, Mita ,G., Durante,M., Arlorio,M., De Paolis,A.2013.** Isolation of a polyphenoloxidase (PPO) cDNAfromartichokeandexpressionanalysis in woundedartichokeheads. *Plant PhysiologyandBiochemistry*, Volume 68,Pages 52-60
- **Rapeanu, G., Loey, A.V., Smout, C., Hendrickx, M. 2005.** Thermal and high-pressure inactivation kinetics of polyphenol oxidase in Victoria grape must. *J. Agric. Food Chem.*, 53:2988–2994.
- **Rodriguez C,S &Toca Herrera ,J.L.2006.** Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *BiotechnolAdv* 24 (5):500-13.
- **Rodríguez-López, J.N., Tudela, J., Varón, R., García-Carmona, F., Garcia-Cánovas, F. 1992.** Analysis of a Kinetic Model for Melanin Biosynthesis Pathway. *The Journal of Biological Chemistry.* 267(6)3801-3810.
- **Ros, J.R., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. 1994.** Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et BiophysicaActa*, 1204:33-42.
- **SACHDE, A. G., Al-bakir' A.y and Abdul-Raheem, J. A. K. (1989 a).** polyphenoloxidase from barhee and zahdidates.I.PurificatioJ.FoodBiochem.Vol 12 :227-240.
- **SACHDE, A. G., Al-bakir' A.y and Abdul-Raheem, J. A. K. 1989 b.** polyphenoloxidase from barhee and zahdidates.I.PurificatioJ.FoodBiochem.Vol 12 :227-240.
- **Salunkhe, DK, 1990.** Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Florida: CRC press.Vol 268:4384-4397.
- **Sapers ,G.M. 1993 .**Browing of foods :control by sulfites,antioxidantsand other means .Food Technol.,Vol .47,pp.75-84.

- **Sawaya W N, Khatchadourian H, Khalil J., 1982.** Growth and chemical characterization of three Saudi date cultivars at various stages of development. *Can.inst. Food Sci. Technol.*, 16, 87-91 p. 137-143.
- **Sawaya, W.N., Safi, W.M., Khalil, J.K. & Mashadi, A.S. 1983.** Physical measurements, proximate analyses and nutrient elements content of twenty-five date cultivars grown in Saudi Arabia at the Khalaal (mature colour) and tamr (ripe) stages. In: *Proceedings of the First Symposium on the Date Palm, Saudi Arabia*. Pp. 454–467. King Faisal University.
- **Schoenbein, C.F. 1856.** On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine*. 11:137-141.
- **Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V. S, Adir, N., Fishman, A., 2010.** First Structures of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity. 10.1016/j.jmb..10.048.
- **Seo, S.-Y., Sharma, V.K., Sharma, N., 2003.** Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.
- **Serradell, M.A., Rozenfeld, P.A., Martinez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.R. and Anon, M.C. 2000.** Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv Selva): characterization and partial purification. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1421–1427.
- **Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S. 2004.** Subnanomolar cyanide detection at polyphenoloxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183
- **Shi, C., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y., and Liu, Q. 2001.** The Purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 381a-381h.
- **Siddiq, M., Sinha, N.K., Cash, Y.N. 1992.** Characterization of a polyphenol oxidase from Stanley plums. *Journal of Food Science*, 57: 1177-1179.
- **Siegbahn, P.E.M. 2003.** The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem.* 8:567-576.
- **Simsek, S., & A. Yemencioğlu. 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., Thipyapong, P. 1998.** Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 23-250.
- **Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J. 2010.** Amperometric Catechol Biosensor Based On Polyaniline–Polyphenol Oxidase. *Biosensors And Bioelectronics.* 25: 1681–1687.
- **Thomas, P and Janave, M.T. 1986.** Isoelectric Focusing Evidence for Banana Isoenzymes with Mono and Diphenolase Activity. *Journal of Food Science.* 51(2)384-387.
- **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.
- **Tony C, De Rigal, D, Mbeguie, D, Gaillard, F, Richard-Forgetand, F, Bernard R. 1999.** Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol Oxidase, *Plant Physiology*, vol. 119 no. 4 1261-1270
- **Toutain G, 1979.** *Eléments d'agronomie saharienne et la recherche au développement*, Marrakech, Maroc, 277 p.
- **Trebst, A et Depka, B. 1995.** polyphenol oxydase and photpsynthesis research. *Photosynththesis Research* 46:41-44.
- **Tuena de Gómez-Puyou, M and Gómez-Puyou, A. 1998.** Enzymes in Low Water Systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 33, No. 1, pp. 53-89.
- **Ünal M.Ü. 2007.** Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry.*, 100, 909-913.
- **Valero, E., Varón, R., García-Carmona, F. 2002.** Tyrosinase-Mediated Oxidation of Acetaminophen to 4-Acetamido-o-Benzoquinone. *Biol. Chem.*, 383:1931-1939.
- **Vámos-Vigyázó, L. 1981.** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15:49-127.
- **Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J. 1997.** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry.* 45(7)1309-1323.

- **Vayalil, P.K, 2002.** Antioxidant and antimutagenic properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera*. L. *Arecaceae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 610–617.
- **Vinson, J.A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N. & Proch, J, 2005.** Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 24, 44–50.
- **Virador, V.M., Grajeda, J.P.R., Blanco-Labra, L., Mendiola-Olaya, E., Smith, M, G., Moreno, A., Whitaker, J.R. 2010.** Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. *Agric. Food Chem.*, 58, 1189–1201.
- **Wang, J., Jiang, W., Wang, B., Liu, S., Gong, Z., & Luo, Y. 2007.** Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. “Tainong”) pulp. *Journal of Food Biochemistry*. 31:45–55.
- **Webb KJ1, Cookson A, Allison G, Sullivan ML, Winters AL. 2013.** Gene expression patterns, localization, and substrates of polyphenol oxidase in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 7421 – 7430.
- **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, J. R. 1994.** Principles of enzymology for the food sciences. *In* : New York: Marcel Dekker *braz. J. Food technol.* 8(3)233-242, 2.ed., pp. 625.
- **Whitaker, J.R. 1995.** Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: *Chapman and Hall*. 1995:271-307.
- **Xu, J., Zheng, T., Meguro, S. 2004.** Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). *J Wood Sci.* 50: 260-265.
- **Xu, Y. M., A. H. Stokes, R. Roskoski, And K. E. Vrana. 1998.** Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *Journal of Neuroscience Research* 54 (5):691-697.
- **Yağar, H. 2004.** Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Celery. – Wong, T.C; Luh, B.S; and Whitaker, J.R. 1971. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes of Clingstone Peach. *Plant Physiol.* 48:19-23.
- **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
- **Yemenicioglu, A., Zkan, M., Cemeroglu, B. 1997.** Heat inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510
- **Yoruk, R. and Marshall, M.R. 2003.** Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Biochem.* 27: 361–422.
- **Youssif, A. K., & Alghamdi, A. S. 1999.** Suitability of some date cultivars for jelly macking. *Journal of Food Science & Technology*, 36, 515–518.
- **Youssif, A. K., Abou Ali, M., & Bou Idreese, A. 1990.** Processing, evaluation and storability of date Jelly. *Journal of Food Science and Technology*, 27, 264–267.
- **Youssif, A. K., Alghamdi, A. S., Hamad, A., & Mustafa, A. I. 1996.** Processing and evaluation of a date juice-milk drink. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 24, 277–288.
- **Zarivi, O., Bonfigli, A., Cesare, P., Amicarelli, F., Pacioni, G., Miranda, M. 2003.** Truffle thio- flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters*. 220: 18-88.
- **Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., 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.
- **Zinkernagel V. 1986.** Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremialactuceae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol.* 115, 257-266
- **Ziyan, E & Pekyardimci, S. 2003.** Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem.* 27: 217-225.
- **Ziyan, E and Pekyardimci, S. 2004.** Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.* 28: 547-557.

## Résumé

La polyphénol oxydase a été extraite à partir des dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) et ses conditions optimales ont été déterminées.

La PPO de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) possède une activité catécholase, mesurée par spectrophotométrie à 410 nm en présence de catéchol comme substrat catécholique. L'activité catécholase est optimale à pH 5.6 et à 30°C La concentration de l'enzyme influe sur la vitesse initiale de l'oxydation de catéchol. La cinétique d'oxydation du catéchol par l'enzyme suit parfaitement le modèle de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk.. Les valeurs des paramètres cinétiques obtenus à pH 5.6 et à 30°C sont :  $K_m = 91,8395 \text{ mM}$  et  $V_{\max} = 0,533 \text{ Abs}_{410 \text{ nm}}/\text{min}$ .

**Mots clés :** DegletNour (*Phoenixdactylifera* L.), Polyphénol oxydase, Activité catécholase, les conditions optimales.

## Summary

Polyphenol oxidase was extracted from the Deglet Nour dates (*Phoenixdactylifera* L.) and its optimal conditions were determined. PPO Deglet Nour ( *Phoenix dactylifera* L) has a catecholase activity , measured spectrophotometrically at 410 nm in the presence of catecholic substrate. The catecholase activity is optimal at pH 5.6 and 30 ° C. The concentration of the enzyme influences the initial rate of the oxidation of catechol . The kinetics of oxidation of catechol by the enzyme perfectly follows the model of Michaelis-Menten and Lineweaver - Burk . . The values of the kinetic parameters obtained at pH 5.6 and 30 ° C are :

$K_m = 91.8395 \text{ mM}$  and  $V_{\max} = 0.533 \text{ Abs}_{410 \text{ nm}} / \text{min}$  .

**Keywords:** Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) , Polypheno loxidase activity catecholase , optimal conditions

## ملخص

تم استخراج أوكسيداز البوليفينول من التمور دقلة نور والشروط المثلى تم تحديدها. PPO دقلة نور ( *dactyliferaPhoenix* ) لديه نشاط الكاتيكولازي ، تقاس طيفيا في 410 نانومتر في وجود الركيزة الكاتيكول . حركية أكسدة الكاتيكول بواسطة انزيم يتبع تماما نموذج ميخائيل - مينتن و خطية ل بيرك . النشاط catécholase هو الأمثل في درجة الحموضة 5.6 و 30 درجة مئوية. تركيز انزيم يؤثر على معدل الأولي للأكسدة الكاتيكول .. قيم المعلمات الحركية التي تم الحصول عليها في الرقم الهيدروجيني 5.6 و 30 درجة مئوية هي:  $K_m = 91.8395 \text{ mM}$   $V_{\max} = 0.533 \text{ Abs}_{410} / \text{min}$  نانومتر / دقيقة .

**كلمات البحث:** دقلة نور ، بوليفينول النشاط أوكسيداز catecholase ، الظروف المثلى .