REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعـلـيـــم العـــالـــي و البـحث الـعلـــمـي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جـامعـــة عـمـــار ثـلـيـجـي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلـيـــــة العـلـــــوم
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

Etude de la cinétique de l'inhibition de l'activité o-diphénolase du polyphénol oxidase de Deglet-nour (*Phoenix dactylifera L.*) par l'acide citrique et l'acide ascorbique

Présenté par :
BOUDIA Fatima
MAMMERI Meriem

Devant le jury :

Président : Mr Gouzi Hicham (Maitre-Assistant Classe A)	Université de Laghouat
Promoteur : Mr Benaceur Farouk (Maitre-Assistant Classe B)	Université de Laghouat
Examinateur : Mr Leboukh Mourad (Maitre-Assistant Classe A)	Université de Laghouat

Soutenu publiquement le (*28/05 /2016***)**

Dédicace

A l' 'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A mes **chers parents**

Pour vos encouragements. Je vous offre ce modeste travail en témoignage d'amour et de respect.

J'ai une pensée particulière :

A ma **sœur**

A mes **frères**

A mes **professeurs**

A mes amies **Karima**, **Zahia**, **Reghia**, **Hafida**, **Amina**, **Lina**,**Messaouda**, **Lilia**, **Noura**

Et surtout mon binôme **Meriem**

qui me soutiennent dans tous mes projets et mes études.

Fatima

Dédicace

A la mémoire de mon **cher père**,

Les trois années qui passent ne peuvent plus vous effacer de ma pensée…

A ma **chère mère**,

Tous les mots ne suffiraient pas…Sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutient et votre amour.

A mes **sœur**s,

A mes **frères**,

A mes **nièces** et mes **neveux**,

A toute ma famille,

A mes **amies** et spécialement **Fatima** mon, binôme :

Je vous dédie ce travail en témoignage de votre affection, vos encouragements, votre soutien et votre présence à coté de moi.

Mes sentiments à ceux qui m'ont accompagné et soutenu jusqu'à ce point précis de ma vie.

Meriem

Remerciements

On adresse nos remerciements à notre promoteur ***Mr.Benacer.F*** pour l'encadrement, pour les encouragements, pour la confiance qu'il nos a toujours témoignée, pour ses observations contribuées à l'aboutissement de ce travail, et pour tous ce qu'il nous a fait. Merci.

On tient à remercier ***Docteur GOUZI.H*** pour nous avoir encouragés et soutenus. On le remercie vivement pour le support, la présence, la gentillesse et la patience, et pour tous les conseils qu'il a pu nous fournir, lors des moments les plus difficiles de ce travail.

On remercie également tous ***les membres du jury*** pour avoir accepté d'examiner notre travail, ainsi que pour les remarques enrichissantes soulevées durant la discussion.

Un grand merci à tous nos chers professeurs ***et enseignants,***qu'ils trouvent ici notre haute considération.

Et à tous ceux qui ont contribué un jour à notre éducation ; et tous les personnes qui ont contribué à l'obtention de ce diplôme.

Merci



Liste des abréviations

Abs : Absorbance optique à une longueur d'onde λ=410 nm

DIECA : Le diéthyldithiocarbamate de sodium

EC : Enzyme Commission number

EDTA : L'éthylène diamine tétra-acétique acide

FAO: The Food and Agriculture Organization

I : Concentration d'inhibiteur (mM)

IC_{50} : Concentration d'inhibiteur pour une diminution de l'activité enzymatique de 50%

K_i : Constante de dissociation du complexe EI (mM)

Km : Constante de Michaelis-Menten

PPO : Polyphénol oxydase

PVPP : Polyvinyle (poly) pyrrolidone

R^2 : Coefficient de régression linéaire

V_{max}: La vitesse maximale

V_0 : Vitesse initiale

Liste des Figures

Figure N° 1 : Phoenix Dactylifera L ……...……...…… **3**

Figure N° 2 : Schéma du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) …… **4**

Figure N° 3 : Schéma du dattier, spathe, fleur et fruit (Phoenix dactylifera L.) …… **5**

Figure N° 4 : Schéma datte et son noyau……...…….……...…… **5**

Figure N° 5 : Dattes en stade Khalal…….…….…… **6**

Figure N° 6 : Dattes en stade Blah…….…… **7**

Figure N° 7 : Dattes en stade Bser…….……...…. **7**

Figure N° 8 : Dattes en stade Rotab……...…… **8**

Figure N° 9 : Datte Mech-Degla entière et en coupe ……...……... **9**

Figure N° 10 : Schéma de la réaction catalysée par la PPO ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées……...……... **12**

Figure N° 11 : Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la tyrosinase……. **13**

Figure N° 12 : Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone :gris, l'azote :bleu, soufre :jaune,oxygène : rouge, cuivre:cyann…… **14**

Figure N° 13 : Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) …….…… **15**

Figure N° 14 : L'état *Oxy* du site actifd'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge ……. **15**

Figure N° 15 : Structures de composés phénoliques substrats des PPOs …….. **16**

Figure N° 16 : *Phoenix dactylifera L*, la variété de DegletNour De Tolga…… **23**

Figure N° 17 : Un tube Eppendrof de 2mL Contenant l'extrait enzymatique brut d'une couleur jaune.……...……... **24**

Figure N° 18 : Le protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes…… **24**

Figure 19 : Exemple de calcul de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la PPO de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) …… **25**

Figure N° 20 : L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de Catéchol par la PPO de dattes DegletNour (*Phoenix dactylifera L)*……... **27**

Figure N° 21 : L'effet de la concentration de l'acide ascorbique sur l'oxydation de Catéchol par la PPO de dattes DegletNour (*Phoenix dactylifera L)* ……... **28**
Figure N° 22: Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L)* par l'acide ascorbique..…… **32**
Figure N° 23 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L)* par l'acide citrique. ……. **32**
Figure N° 24 : Représentation de l'inhibition compétitive …… **33**
Figure N°25 : Schéma de type Michaelis Menten de l'inhibition compétitive…… **33**
Figure N°26 : Représentation de l'inhibition non compétitive…… **35**
Figure N°27 : Schéma de type Michaelis Menten de l'inhibition non compétitive…… **35**

Liste des Tableaux

Tableau N° 1 : Composition de la pulpe de datte fraîche *Deglet-Nour* ……..…… **9**

Tableau N° 2 : La composition minérale de la datte sèche …… **10**

Tableau N° 3: Valeur énergétique de quelques fruits en Kcalories pour 100g de pulpe... **10**

Tableau N° 4 : Inhibiteurs du brunissement enzymatique …..……...…… **20**

Tableau N° 5 : Les valeurs d'IC50 de l'acide citrique trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différentes substrats…… **29**

Tableau N° 6 : Les valeurs d'IC50 de l'inhibition de la PPO à partir de différentes sources et différentes substrats par l'acide ascorbique…… **29**

Tableau N° 7: Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de *(Phoenix dactylifera L)* par l'acide citrique…… **30**

Tableau N° 8: Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de *(Phoenix dactylifera L)* par l'acide ascorbique…… **31**

Sommaire

Dédicace ..... **I**

Remerciements..... **II**

Liste des figures..... **III**

Liste des tableaux ..... **IV**

Liste des abréviations ..... **V**

Introduction **1**

Première partie
Étude bibliographique

Chapitre I : Généralité et présentation de *Phoenix dactylifera L.* et de la datte

I.1.Généralité sur le Palmier dattier …….. **3**

I.1.1.Présentation de l'espèce étudiée *(Phoenix dactylifera L.)* ……... **3**

I.1.2. Description de l'espèce étudiée *(Phoenix dactylifera L.)* ……. **4**

I.2.Généralité sur la datte ……... **5**

I.2.1. Description de la datte ……... **5**

I.2.2.Formation et maturation de la datte …… **6**

I.2.3.Composition biochimique de la datte ……..…… **9**

Chapitre II : *Polyphénole oxydase, et brunissement enzymatique*

II.1. Polyphenol oxydase…….. **11**

II.1.1. Définition de Polyphenol oxydase……... **11**

II.1.2. Nomenclature de Polyphenol oxydase……..…….. **11**

II.1.3. Classification de Polyphenol oxydase…… **11**

II.1.4. Caractéristiques réactionnelles de Polyphenol oxydase……... **12**

II.1.5. Mécanismes réactionnelles de la catalyse enzymatique…… **12**

II.1.6. Caractéristiques de site actif……... **13**

II.1.7. Substrats phénoliques et spécificité enzymatique……. 15
II.1.8. Rôle physiologique des Polyphénol oxydase …….. 16
II.2. Brunissement enzymatique…….…… 17
II.2.1. Le brunissement enzymatique des fruits et des légumes …….. 17
II.2.2. Contrôle du brunissement enzymatique…… 18
II.2.2.1. Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique……. 18
II.2.2.1.1. Les traitements thermiques……...……... 18
II.2.2.1.2. La congélation…… 18
II.2.2.2. Moyens chimiques de contrôle du brunissement enzymatique……. 19
II.2.2.2.1. Agent réducteur……. 20
II.2.2.2.2. Agents chélateurs……... 20
II.2.2.2.3. Inhibition ciblant l'enzyme……... 20

Deuxième partie
Étude expérimentale

Matériels et méthodes

1. Matériels…….. 22
1.1. Matériel biologique…… 22
1.2. Produits chimiques…… 22
2. Méthodes …… 22
2.1. Préparation de l'extrait brut de la PPO …… 22
2.2. Mesure de l'activité de PPO…… 24
2.3. Détermination des valeurs d'IC_{50} …….. 25
2.3.1. Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide citrique…… 25
2.4. Analyse des données cinétiques …….. 26

Résultats et discussion

1. Détermination de la valeur d'IC_{50}…….. **26**

2. Mécanisme cinétique d'inhibition …… **29**

Conclusion …… **37**

Références bibliographiques…… **39**

Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude de la cinétique d'inhibition du polyphénol oxydase (PPO) responsable du brunissement enzymatique des dattes Deglet-Nour (*Phoenix dactylifera* L.) Par quelques acides organiques (l'acide citrique, l'acide ascorbique). L'activité de PPO a été mesurée par spectrophotométrie à 410 nm, à pH 5.6 et à 30°C, en présence de la catéchol comme substrat. La valeur d'IC_{50} de l'acide citrique est estimée à 24.44mM et l'acide ascorbique ,0.21 mM.

L'acide ascorbique est utilisé à de faibles concentrations car il est plus puissant que l'acide citrique .La représentation de Lineweaver-Burk obtenue indique que l'acide citrique est un inhibiteur de type non compétitif, et que l'acide ascorbique est un inhibiteur de type compétitif avec des constantes d'inhibitions K_i44,4178et 0,2034 mM, respectivement. . Le degré de l'inhibition dépend de la concentration du l'acide citrique et l'acide ascorbique, du type de substrat et la source d'enzyme.

L'acide citrique et l'acide ascorbique sont des composés organiques naturel dont ils peuvent être utilisés pour le contrôle du brunissement enzymatique des dattes au cours de leur stockage ou de lors de leur transformations.

Mots-clés : Dattes , brunissement enzymatique, l'acide citrique, PPO, L'acide ascorbique , PPO ,mécanisme d'inhibition.

Abstract

The aim of this work is the study of kinetic mechanism of inhibition of polyphenol oxidase PPO enzyme responsible for the browning of DegletNour dates (*Phoenix dactylifera L.*) by organic acids (citric acid, ascorbic acid). The PPO activity was measured by spectrophotometry at 410 nm at pH 5.6 and at 30 ° C in the presence of the catechol substrate.

The IC50 value of the citric acid is estimated at 24.44mM and ascorbic acid, 0.21 mM. ascorbic acid is used at low concentrations since it is more potent than citric acid .The Lineweaver-Burk obtained indicates that the citric acid is a non-competitive inhibitor type, and that the ascorbic acid is competitive type inhibitor. And with constant inhibitions Ki 44.4178 and 0.2034 mM respectively. The degree of inhibition depends on the concentration of the citric acid and ascorbic acid, the type of substrate and the enzyme source.

Citric acid and ascorbic acid are natural organic compounds can be used to control enzymatic browning of dates during their storage or during their processing

Keys words: dates, enzymatic browning, PPO, citric acide , ascorbic acid ,mechanism of inhibition.

ملخص

يهدف هذا العمل الى دراسة آلية تثبيط انزيم البوليفينول أوكسيدازPPO المسؤول عن التشوه الإنزيمي لدقلة نور(*Phoenix dactylifera* L) بواسطة الاحماض العضوية (حمض الستريك وحمض الاسكوربيك).تم قياس نشاط انزيم PPO بواسطة جهازقياس المطياف الضوئي على طول موجة410نانومتر و عند درجة الحموضة 5.6 و 30 درجة م°، في وجود الكاتيكول باعتبارها الركيزة.قيمة IC_{50} لحمض الستريك 24.44 وحمض الاسكوربيك0.21ميليمول.أظهرت بياناتLineweaver-Burk أن حمض الستريك هو مثبط غير تنافسي لنشاط PPO بقيمة وحمض الاسكوربيك هو مثبط تنافسي بقيمة 44.4178و 0.2034ملم على التوالي.درجة التثبيط تعتمد على تركيز حمض الستريكوحمض الاسكوربيك، ونوع الركيزة ومصدر الانزيم.

حمض الستريكوحمض الاسكوربيك مركبات عضوية يمكن استعمالها من أجل مراقبة التشوه الإنزيمي للتمور أثناء تخزينها و تحويلها.

الكلمات المفتاحية : دقلة، التشوه الإنزيمي ،PPO، آلية تثبيط ، حمض الستريك،حمض الاسكوربيك .

Introduction

Introduction

La datte (Phoenix dactylifera L.) est le fruit du palmier dattier, produit dans les régions sahariennes et considéré comme un aliment de grande importance pour la population habitant ces régions. L'Algérie avec son riche et diversifié patrimoine en palmiers dattiers, plus de 13 millions de palmiers et 940 cultivars sont recensés avec une production totale de dattes évaluée à 440 000 tonnes **(Hannachiet *al.*, 1998 ; MA/DSAEE, 2001)**, compte parmi les grands producteurs de datte en occupant le 7^{e} rang mondiale **(FAO, 2004)**.

L'un des problèmes les plus importants des dattes, c'est la réaction de brunissement enzymatique qui se produite au cours de développement des dattes, la récolte, traitement et le stockage. Le brunissement enzymatique est un phénomène largement rencontré chez les fruits et les végétaux, il est le plus souvent une réaction indésirable, provoque la formation d'un pigment brun responsable du changement de couleur, d'odeur et du goût désagréables des dattes **(Martinez et Whitaker, 1995**) et par conséquent diminuant sa qualité nutritionnelle et sa valeur commerciale.

La polyphénol oxydase (PPO) est reconnue comme étant la principale enzyme responsable du brunissement des dattes. La polyphénol oxydase (PPO)est une métalloenzyme ,capable de produire des o-quinones en présence des composés phénoliques et est impliquée dans la formation des pigments, dans le mécanisme de défense contre les agents pathogènes, les insectes et les herbivores**,(Mayer et a*l*.,1987).**

En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme catalyse deux réactions bien distinctes : l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2) qui se polymérisent pour former un pigment brun, rouge ou noir **(Martinez & Whitaker., 1995).**

L'oxydation des substrats phénoliques par la PPO est considérée comme la principale cause de changement de propriétés organoleptiques au cours de la manipulation ,la maturation, , le stockage et le traitement des produits végétaux, il est estimé que plus de 50% des pertes dans les fruits et légumes se produisent à cause de brunissement enzymatique, ce dernier est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréable**(Martinez et Whitaker.,1995 ;Aldo et *al.*, 2011)**,

Au cours de ces dernières années, autant d'études rapportées dans ce contexte avaient comme objectif la mise en place d'une méthode à la fois efficace et non toxique dont plusieurs méthodes physiques et chimiques ont été proposées. Ces dernières fassent généralement appel aux acides organiques tels que l'acide citrique et l'acide ascorbique.

A l'heure actuelle et d'après notre connaissance aucune étude préalable n'a rapporté l'effet de ces deux acides organique sur la PPO des dattes. Ceci nous a suscité pour proposer pour la première fois étude de la cinétique de l'inhibition de ces deux inhibiteurs sur l'enzyme de cette variété nationale

Notre travail sera présenté en quatre parties et est séquencé comme suit. La première partie concerne un rappel bibliographique sur la datte Deglet-Nour, la polyphénol oxydase (PPO) et sur le brunissement enzymatique et sa prévention. Dans la deuxième partie, nous mettrons en évidences les procédures expérimentales. La troisième partie est dédiée à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO, sont regroupées dans la dernière partie.

Première partie
Etude bibliographique

Chapitre I

Généralité et présentation de Phoenix dactylifera L. et de la datte

Chapitre I : *Généralité et présentation de Phoenix dactylifera L. et de la datte*

I.1.Généralité sur le Palmier dattier

Le dattier est un arbre probablement originaire du golfe persique, cultivé dans les régions chaudes et humides. C'est une espèce dioïque c'est-à-dire existe des dattiers males (Dokhar) et des dattiers femelles (Nakhla), monocotylédone arborescente, appartenant à une grande famille d'arbre à palmes et produit des dattes (**Mozoyer, 2002** ; **Gilles, 2000**).

I.1.1.Présentation de l'espèce étudiée (*Phoenix dactylifera L.)*

Phoenix dactylifera L. Phoenix dérive de Phoinix, nom du dattier chez les Grecs de l'antiquité, qui le considéraient comme l'arbre des phoeniciens ; dactylifera vient du latin dactylus dérivant du grec dactulos signifiant doigt, en raison de la forme du fruit (**Munier, 1973**).



Figure N° 1 : *Phoenix Dactylifera L.*

I.1.2. Description de l'espèce étudiée *(Phoenix dactylifera L.)*

Un grand palmier de 15 à 30 m de haut, au stipe (simili-tronc) cylindrique, portant une couronne de feuilles (les palmes). Les feuilles sont pennées, finement divisées et longues de 4 à 7 mètres. L'espèce est dioïque : les fleurs mâles et femelles sont portées par des individus différents. Les inflorescences mâles ou femelles, appelées spadices, sont enveloppées d'une très grande bractée membraneuse, la spathe. Les fleurs femelles ont trois carpelles indépendants, dont un seul se développe pour former la datte. Du fait de la longueur de la phase végétative du palmier, on ne peut connaître le sexe d'un plant qu'après 6 à 8 ans. Les fruits sont appelés dattes et sont groupés en régimes : ce sont des baies, à chair sucrée entourant un « noyau » osseux qui est en fait la graine.

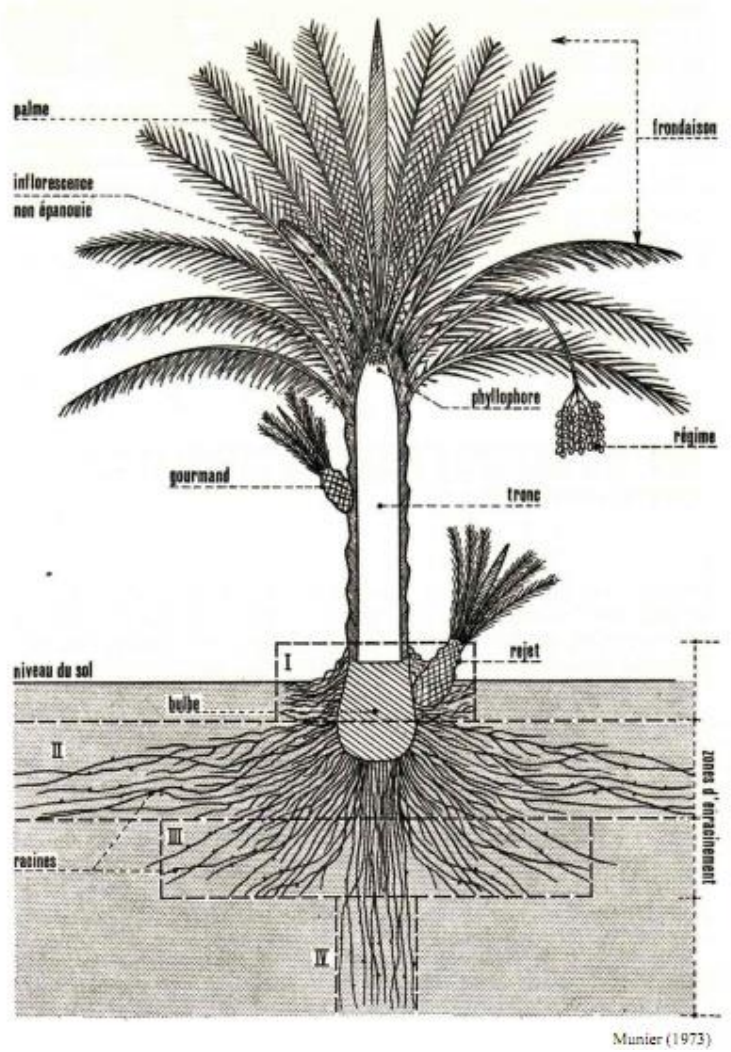


Figure N° 2 : Schéma du palmier dattier *(Phoenix dactylifera L.)* (D'après **Munier, 1973**)

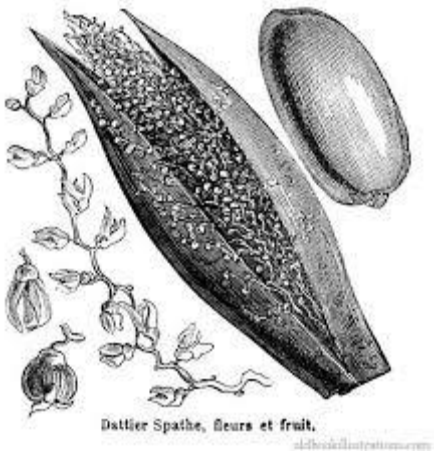


Figure N° 3 : Schéma du dattier, spathe, fleur et fruit *(Phoenix dactylifera L.)*

I.2.Généralité sur la datte

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, ou arrondie. Elle est composée d'un noyau ayant une consistance dure, entouré d'une partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe.

I.2.1. Description de la datte

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 ambres, rouges, brunes plus ou moins foncées (**Djerbi, 1994**).

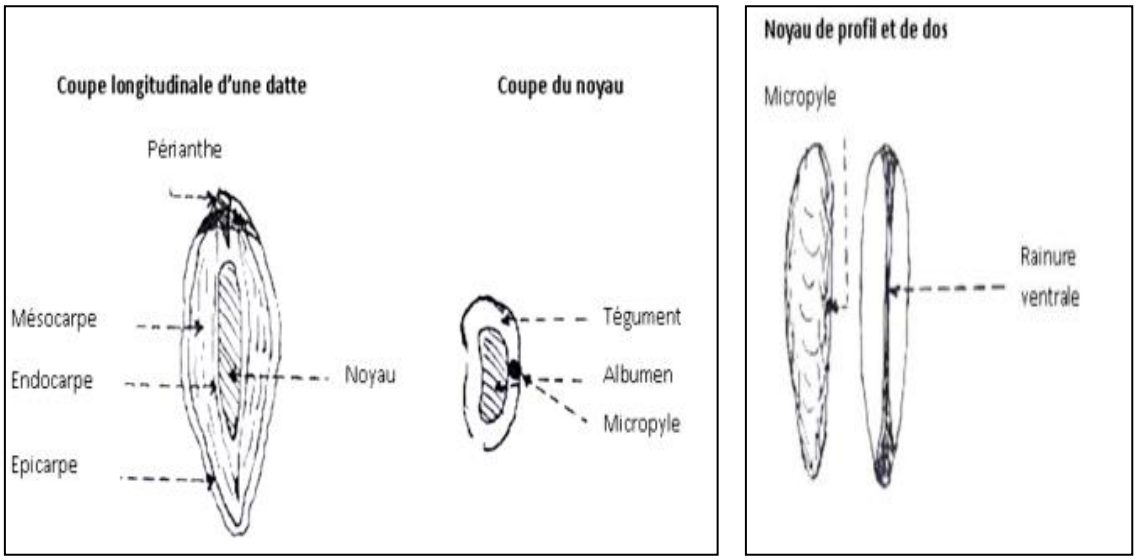


Figure N° 4 : Schéma datte et son noyau (**Belguedj, 2001**)

I.2.2.Formation et maturation de la datte

Chaque stade de maturité correspond à une appellation particulière. Par ailleurs, toutes les références bibliographiques indiquent cinq stades phénologiques. Les cinq stades de maturation phénologique utilisés ultérieurement sont repris dans toute la bibliographie (**Dawson, 1963** ; **Munier, 1973** ; **Akidi, 1987** ; **Barreveld, 1993** ;**Beker, 2002** ;**Belguedj,2002 (b)** ;**IPIGRI, 2005**) et ce sont les suivants : premier stade :**khalal**, deuxième stade :**Blah,** troisième stade :**Bser**, quatrième stade :**Rotab** et le cinquième stade: **Tmar**.

- **Stade Khalal**

C'est le stade qui suit immédiatement la pollinisation. La datte a une forme sphérique, de couleur crème. L'évolution du fruit est très lente. Ce stade dure 4 à 5 semaines après la pollinisation.



Figure N° 5: Dattes en stade Khalal

- **Stade Blah**

A ce stade de maturité du fruit, la datte qui tombe du régime et murit est désignée par le terme arabe romakh, et en mozabite par torchimt. Cette désignation concerne particulièrement la variété DegletNour.La datte commence son développement, grossit et prend une teinte verte (vert pomme).Ce stade s'étend de juin à juillet, il constitue la phase la plus longue de l'évolution de la datte, et dure 4-7 semaines.



Figure N° 6: Dattes en stade Blah

- **Stade Bser**

Selon le descripteur du palmier dattier (**IPIGRI**), c'est le stade de développement de la datte durant lequel, le fruit prend sa forme et sa taille finale, et il passe de sa couleur verte à une couleur généralement jaune ou rouge, rarement verdâtre. La période de ce stade dure de trois à cinq semaines.



Figure N° 7: Dattes en stade Bser

- **Stade Rotab**

La datte passe du stade Bser à ce stade par l'apparition progressive de points d'amollissement. En général, ce changement de texture commence par la partie supérieure du fruit (**Cavell, 1947** ;**Turrell, 1940** ;**Bakkaye, 2006**). Puis, il ya une homogénéisation de la couleur et de la texture. Il existe des variétés où l'amollissement apparaît de façon aléatoire (**Beker, 2002**).La datte devient alors translucide, sa peau passe du jaune de chrome à une couleur presque noire, ou au vert selon les variétés.



Figure N° 8: Dattes en stade Rotab

- **Stade Tmar ou Tamr**

C'est le stade final de maturation de la datte. La consistance du fruit à ce stade est comparable à celle du raisin et des prunes. Dans la plupart des variétés, la peau adhère à la pulpe et se ride à mesure que celle-ci diminue de volume. Toutefois, dans certains cas, la peau très fragile craque lorsque la pulpe se réduit et laisse ainsi exposés des fragments de chair poisseuse qui attirent les insectes ou agglutinent des grains de sable.

La couleur de l'épiderme et de la pulpe fonce progressivement. A ce stade, nous distinguons deux catégories de dattes (**Dawson, 1963**) :

- ✓ **Dattes molles :** la pulpe est d'abord molle, ensuite elle devient de plus en plus ferme tout en restant souple. Exemple : variétés Bent Qbala, Litima (Ghardaia-Algérie).
- ✓ **Dattes sèches :** où il n'y a pas de passage par le stade Rotab. La teneur en eau reste la même que pour la datte molle à ce stade. Cependant, la texture est plus serrée et la couleur à ce stade est claire. Exemple : variétés MechDegla et DeglaBeyda (Biskra - Algérie).Le fruit perd beaucoup d'eau et le rapport sucre/eau reste assez élevé empêchant la fermentation et l'acidification (oxydation).



Figure N° 9: Datte Mech-Degla entière et en coupe

I.2.3. Composition biochimique de la datte

La datte est constituée de la pulpe en chair et d'un noyau. La proportion du noyau par rapport à la datte entière constitue une caractéristique qui dépend non seulement de la variété mais aussi des facteurs climatiques et des conditions de culture. Cette caractéristique est utilisée par les sélectionneurs pour évaluer la qualité d'une variété. Une datte *Deglet-Nour* de qualité, pesant environ 10 g, comporte 10 % de noyau et 90% de pulpe (**Arnaud, 1970**).

Tous les travaux sur l'étude de la composition chimique de la datte, ont montrés que le sucre et l'eau sont les principaux constituants de la chair.

En effet, la stabilité de la datte dépend du rapport sucres/eau qui doit être d'environ de 2 (**Husson, 1931** et **Matallah, 1970**).

Tableau N° 1 : Composition de la pulpe de datte fraîche *Deglet-Nour* **(Devshony et *al.*, 1992)**

Constituants	(%) du poids à l'état frais
Eau	23
Protéines	1.5
Sucres totaux	72
Saccharose	36.1
Glucose	10.4
Fructose	9.6
Cellulose	7.20
Lipides	0.05
Cendres	1.9

La datte ne contient pas seulement des sucres et des protéines. Il y a aussi des vitamines à des quantités appréciables tel que : la vitamine B6 et la vitamine C.

La datte est une source appréciable d'éléments minéraux (**Tableau N° 2**).

Tableau N° 2 : La composition minérale de la datte sèche (**Devshony *et al.*, 1992**)

Eléments minéraux	Pour 100g de datte sèche
Sodium	0.017
Potassium	0.3
Magnésium	0.036
Phosphore	0.07
Calcium	0.1
Fer	0.016

Les résultats sont exprimés en g /100g de matière sèche.

La forte teneur en sucre de la pulpe de datte confère à ce fruit une grande valeur énergétique soit : 275 Kcalories pour 100g de pulpe de datte *Deglet-Nour* (**Randouin, 1961** et **Ben Lambiote, 1983**).

Tableau N° 3 : Valeur énergétique de quelques fruits en Kcalories pour 100g de pulpe. (**Randouin, 1961**)

Fruit	Valeur énergétique (Kcal)
Tomate	22
Fraise	40
Citron	43
Orange	48
Abricot	52
Pêche	52
Poire	61
Cerise	77
Figue fraîche	80
Raisin	81
Banane	97
Datte	275

Chapitre II

Polyphénole

et brunissement enzymatique

Chapitre II : *Polyphénole oxydase, et brunissement enzymatique*

II.1. Polyphenol oxydase

II.1.1.Définition de la Polyphénole oxydase

La polyphénoloxydase (PPO) est une métalloprotéine à cuivre, présente dans l'ensemble du règne du vivant, des végétaux aux animaux en passant par les champignons. Leur étude a débuté il y a plus d'un siècle chez les champignons (**Bertrand, 1896**).

Les polyphénoloxydases (PPO, EC 1.10.3.1) représentent un groupe d'enzymes qui catalysent l'oxydation de composés phénoliques, en faisant intervenir l'oxygène moléculaire, en quinones, qui par la suite se polymérisent spontanément pour former des polymères bruns, responsables de la coloration brune, le plus souvent indésirable, observée sur les fruits et légumes endommagés (**Cheftel** et **Cheftel, 1976**).

II.1.2. Nomenclature de la Polyphénole oxydase

Plusieurs noms ont été associés à la PPO dont la tyrosinase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, le phénol oxydase, l'*o*-diphénol oxydase et l'acideChlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est le nom « polyphénol oxydase » qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des *o*-quinones dans les deux cas. Les noms «tyrosinase», «phénol oxydase» et «polyphénolase» sont aussi généralement employés interchangeablement avec « le polyphénol oxydase» (**Zawistowski*et*al., 1991** ; **Burton, 1994**; **Rivas** et **Whitaker, 1973**).

II.1.3. Classification de la Polyphénole oxydase

L'enzyme PPO est une oxygénase oxydoréductase (**Papa *et*al., 1994**). La classification et la spécificité de cette enzyme demeure confuse et sont quelque peu ambiguës (**Burton, 1994 ; Eicken *et* al., 1999**).

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB), a mis à jour la nomenclature et a placé la PPO dans deux catégories principales comme EC 1.14.18. 1-monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase. Cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 o-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 p-diphénol oxydase ou laccase, et aussi EC, 1.10.3.2 o-diphénol: 02 oxydoréductase.

Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (**Mayer, 1987** ; **Zawistowski *et*al., 1991**).

II.1.4. Caractéristiques réactionnelles des polyphénol-oxydases

La classe des polyphénoloxydases est divisée en deux sous-groupes en fonction du substrat dont elles catalysent l'oxydation :

- hydroxylation en position ortho d'un substrat monophénolique (activité monophénoloxydase, crésolase ou tyrosinase) (réaction1)
- oxydation d'un diphénol en benzoquinone (activité diphénoloxydase, également appelée laccase, et spécifiquement catécholase lorsqu'il s'agit *o*-diphénol). (réaction2)

Ces deux réactions utilisent l'oxygène moléculaire comme co-substrat. Lorsque ces deux activités enzymatiques sont simultanément observées dans les plantes, le ratio activité monophénoloxydase sur diphénoloxydase est généralement de 1/10 et peut aller jusqu'à 1/40 (**Nicolas** *et* ***al.*****, 1994**). Les différentes affinités relatives pour les substrats mono- et di-phénoliques observées pour une même enzyme sont attribué à l'existence de sous-unités dont les propriétés chimiques, physiques et cinétiques varient et peuvent ainsi conférer à une même enzyme des activités mono- et diphénoloxydase.

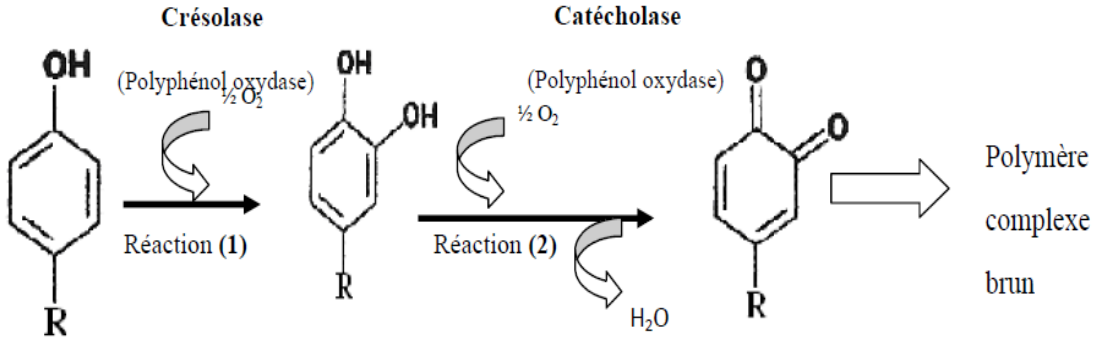


Figure N° 10: Schéma de la réaction catalysée par la PPO ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (**Burton, S.G. 1994** ; **Van Gelder***et***al., 1997**)

II.1.5. Mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les tyrosinases d'origines fongiques. D'après **Sanchez-Ferrer** *et* ***al.*** **(1995)**, le site actif des tyrosinases peut exister sous trois formes selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* (CuI-CuI), *oxy* (CuII-O2-CuII) et *met* (CuII-CuII). La forme *met* est convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy*

résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy* (**Figure N° 11**)

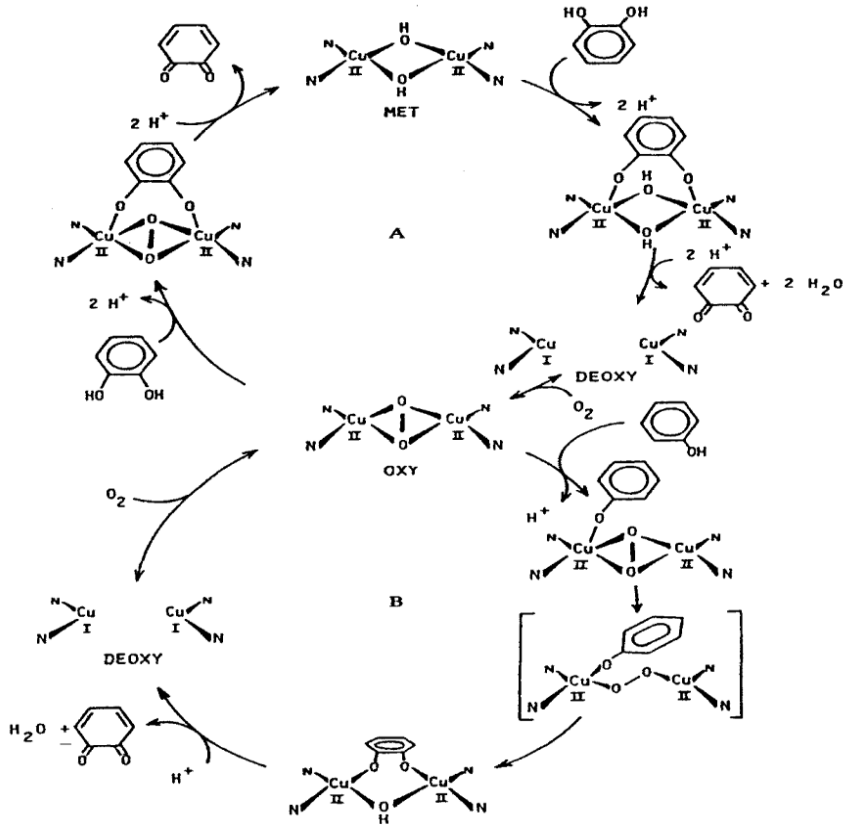


Figure N° 11 : Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la tyrosinase (d'après **Lerch, 1995**)

L'activité catécholase implique l'oxydation de deux o-diphénols en deux quinones, avec la réduction concomitante de 4e- de l'oxygène moléculaire, qui produisent deux molécules d'eau. Cette activité est initiée par la fixation d'un o-diphénol de la forme *met* de l'enzyme, suivie de la réduction du faisceau bi cuivrique, menant à la formation du *deoxy*PPO et au dégagement d'o-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'*oxy*PPO est formée et une deuxième *o*-diphénol est liée, réduisant ainsi le peroxyde avec production d'eau et formation d'une autre o-quinone.

II.1.6. Caractéristiques du site actif

La PPO est une métallo enzyme vraie 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 (**Mayer** et **Harel, 1991** ; **Turner, 1974** ; **Rodakiewicz-Nowak** et **Ito, 2003** ; **Baldwin** *et* ***al.*, 1992**).

La structure secondaire de la PPO est principalement α- hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α (α2, α3, α6 et α7), (**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 du cuivre.

Il est entouré par les hélices, α1 et α4, et de plusieurs coudes β. Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50), à l'hélice α2 (**Figure N° 12**). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α (**Figure N° 13**). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice α2, tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice α3. 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 α6 et α7 (**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 (**Figure N° 14**) (**Van Gelder** *et* ***al.,*** **1997**).

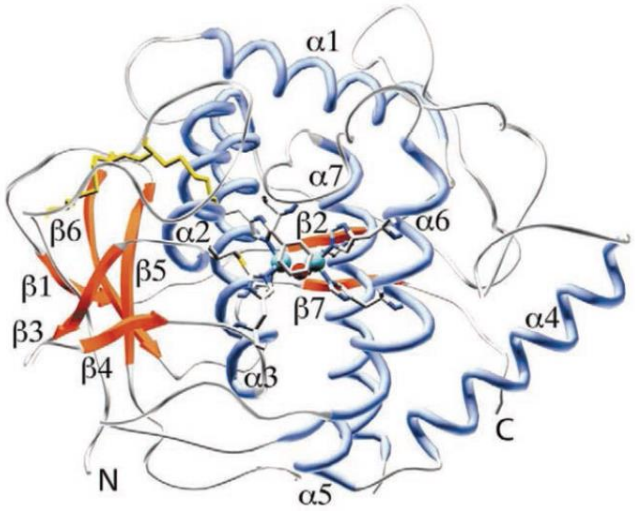


Figure N° 12: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (**Eicken** *et* ***al.,*** **1999**).

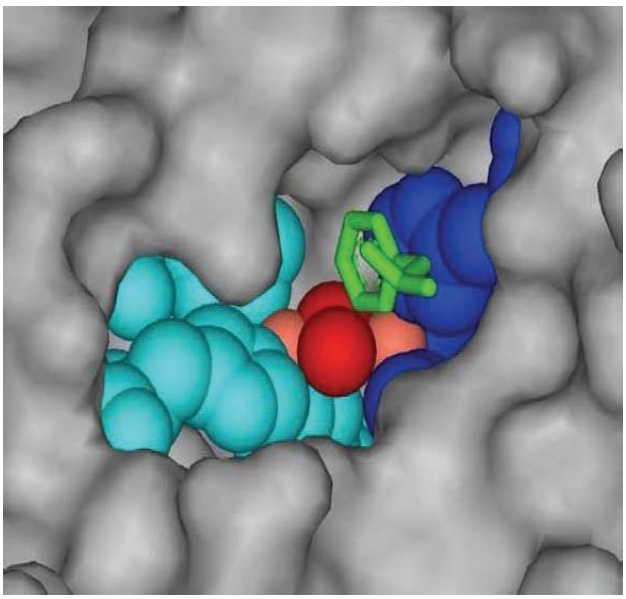


Figure N° 13: Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (**Decker** et **Jaenicke, 2004**).

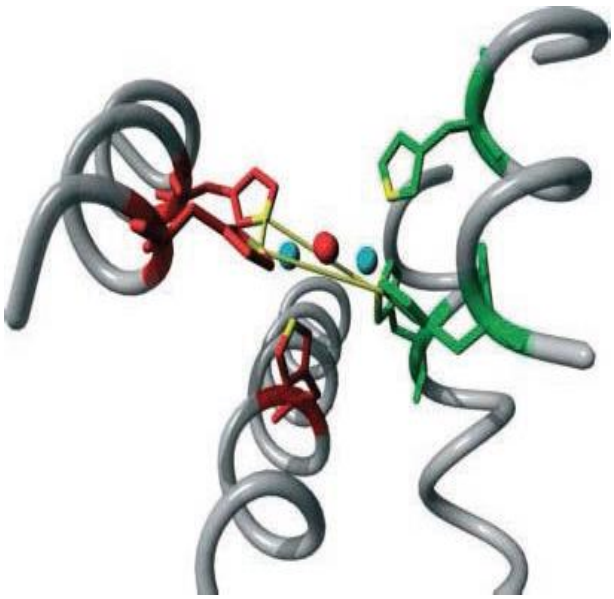


Figure N°14: L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (**Decker, 2005**).

II.1.7. Substrats phénoliques et spécificité enzymatique

Les substrats phénoliques qui participent à la couleur, l'astringence, l'amertume et au goût des fruits et légumes, comportent un noyau aromatique porteur d'un ou plusieurs groupe(s) hydroxyle. La composition en polyphénols dans les végétaux varie selon l'espèce, le cultivar, la maturité, les conditions de culture et de stockage. La **Figure N° 15** présente les structures des composés phénoliques substrats les plus courants des PPO. Les dérivés de l'acide caféique, tels que l'acide chlorogénique, sont souvent cités comme étant les composés *o*-diphénols majoritaires dans les végétaux où ils sont présents sous forme glycosylés. Il faut alors noté que les monophénols tels que l'acide sinapique ou l'acide syringique forment alors des semi-quinones. (**Crumiére., 2000**).

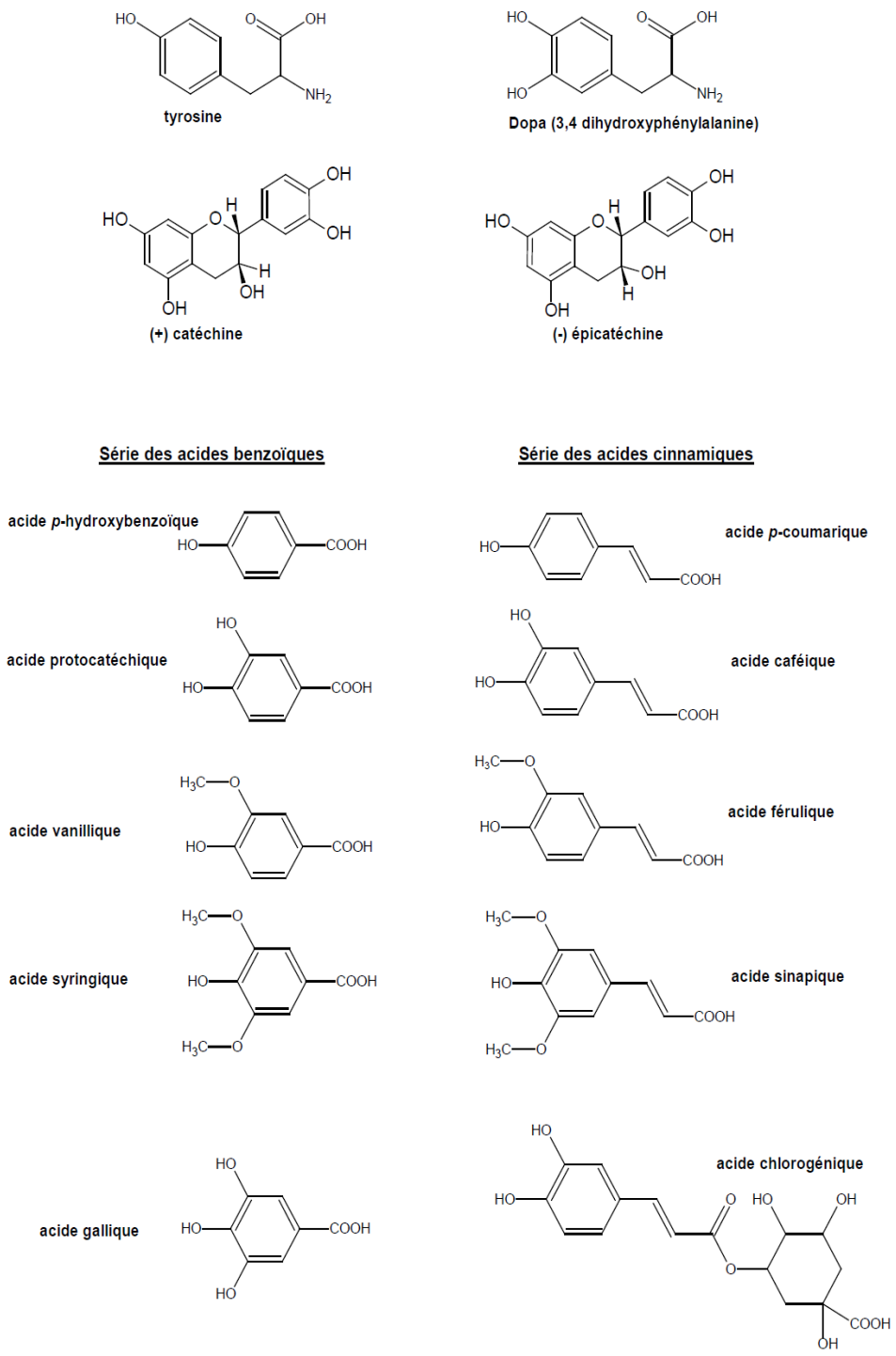


Figure N° 15: Structures de composés phénoliques substrats des PPOs (**Crumiére, 2000**)

II.1.8.Rôle physiologique des polyphénoloxydases (PPO)

Les PPO ont été découvertes dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles sont majoritairement présentes dans les plastides des plantes, mais il y en a également abondamment dans le cytoplasme des fruits murs (**Vaughn** et **Duke, 1984**). Selon **Walker** et **Ferrar (1995)**, la localisation spécifique des formes actives des PPO laisse

supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et / ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (**Kuwabara** et **Katoh, 1999**). En support à cette hypothèse, **Lax** et **Vaughn (1991)** ont montré que la PPO était structuralement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*).

Dans les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (**Martinez** et **Whitaker, 1995**). Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPO sont cependant largement controversés (**Vaughn** *et* ***al.*****, 1988 ; Mayer** et**Harel, 1991 ; Walker** et **Ferrar, 1998**) et plusieurs hypothèses sont émises. Les polyphénols, ont des propriétés antifongiques (**Friedman, 1997**). La polyphénoloxydase catalyse l'oxydation de ces composés phénoliques en quinones, elles-mêmes bactéricides et fongicides (**Zinkernagel, 1986**), qui se polymérisent ensuite pour former des polymères bruns insolubles. Ces derniers forment une barrière, et grâce à leurs propriétés antimicrobiennes, limitent la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante (**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.

II.2. Brunissement enzymatique

II.2.1.Le brunissement enzymatique des fruits et des légumes

Parmi les caractéristiques organoleptiques des aliments, la couleur est l'une des propriétés principales pour évaluer la qualité des aliments par les consommateurs. Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte le plus la couleur des fruits et des légumes. Mais ce phénomène peut également se produire lors de la transformation et le stockage de certains fruits de mer. Il ne sera ici question que du brunissement enzymatique des fruits et légumes catalysé par la polyphénoloxydase (1,2 benzènediol ; oxygène oxydoréductase, EC.1.10.3.1) notée PPO. Cette appellation regroupe également les termes de phénoloxydase, phénolase, monophénoloxydase, diphénoloxydase et tyrosinase. . (**Ensminger et** ***al.*****, 1995**).

Le brunissement enzymatique peut parfois être très bénéfique à l'acceptabilité du produit par le consommateur. En effet, que ce soit pour le thé noir, oblong ou vert, le brunissement enzymatique est nécessaire au développement de leur couleur et flaveur au cours du procédé de fabrication. De même, l'apparition de la couleur du cacao est facilitée par le brunissement enzymatique lors de la fermentation et le séchage des fèves. Les polyphénols oxydases sont par ailleurs responsables de la couleur dorée caractéristique des fruits secs (raisins, prunes, dates et figues). Or, le thé, le café et le chocolat sont des marchandises

essentielles à l'économie de certains pays émergeants tels que l'Inde, la Chine, le Sri Lanka ou le Kenya (**Ensminger** *et* ***al.*, 1995**).

Cependant, le brunissement enzymatique est aussi une réaction très néfaste pour le marché des fruits et légumes. Mal contrôlé, ce phénomène est responsable de plus de la moitié des pertes économiques dans ce secteur (**Whitaker** et **Lee, 1995**). Ces lourdes pertes ont suscité un intérêt considérable dans la compréhension et le contrôle de l'activité polyphénoloxydase dans les aliments. Les salades et autres légumes feuillus, les pommes de terres et autres tubercules riches en amidon tels que les patates douces, l'igname, de même que les champignons, les pommes, les bananes, les pêches les dattes et encore beaucoup d'autres. **(Jolivet et *al.*, 1998)**

II.2.2. Contrôle du brunissement enzymatique

Le contrôle de l'activité de la PPO, est important pour la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux et fruits **(Jolivet** *et* ***al.*, 1998; Qiu** *et* ***al.*, 2009).**

Beaucoup d'études ont eu pour but d'inhiber le brunissement enzymatique et plusieurs techniques essayant d'éliminer les composés responsables de ce brunissement (oxygène, enzyme, cuivre, substrat), ont été développées parmi ces techniques les traitements physico-chimiques.

II.2.2.1. Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique

II.2.2.1.1. Les traitements thermiques

Les traitements thermiques sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique. Cependant, cette méthode ne peut être utilisée dans les procédés de transformation des fruits et légumes frais. **(Vámos-Vigyázó., 1981)**.

Les températures appliquées lors du blanchiment varient considérablement en fonction du végétal à traiter et des enzymes à inactiver. En général, une exposition des PPO à des températures de l'ordre de 70-90°C entraîne la destruction de leur activité catalytique **(Vámos-Vigyázó, 1981)**.

II.2.2.1.2. La congélation

Des températures inférieures à – 18°C sont utilisées pour la conservation longue durée des aliments. Les mécanismes d'inactivation des enzymes par la congélation peuvent être

expliqués par différentes hypothèses : augmentation de la concentration en inhibiteurs du fait de la diminution de la quantité d'eau disponible à l'état liquide (**Tappel, 1966**), de modifications du pH ou encore des groupements thiols (**Fennema, 1975**).

De la même façon que pour l'inactivation des enzymes par chauffage, ce procédé présente des inconvénients et provoque notamment des changements de texture. De plus, la congélation fragilise les structures membranaires des cellules et facilite ainsi le brunissement enzymatique lors de la décongélation des produits. **(Vámos-Vigyázó., 1981)**.

II.2.2.2. Moyens chimiques de contrôle du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique peut être inhibé en ciblant l'enzyme, les substrats (oxygène et polyphénols) ou les produits de la réaction. L'utilisation d'inhibiteurs du brunissement enzymatique ne peut se concevoir que s'ils n'ont aucun effet toxique et ne modifient pas le goût ni la couleur des produits, et évidemment si le surcoût économique est supportable.

Mc Evily *et al*. (1992) classent les inhibiteurs de la PPO en six catégories (**Tableau N° 4**) : les agents réducteurs, les acidifiants, les agents chélateurs, les agents complexants, les inhibiteurs d'enzyme, les traitements enzymatiques.

Tableau N° 4: Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de **McEvily*et al.*, 1992**)

Agents réducteurs	**Sulfites et dérivés** **Acide ascorbique et analogues** **Cystéine et glutathion**
Agents chélateurs	Phosphates EDTA Acides organiques
Acidifiants	Acide citrique Acide phosphorique
Inhibiteurs d'enzyme	Acides carboxyliques aromatiques Alcools aliphatiques Anions Peptides Résorcinols substitués
Traitements enzymatiques	Oxygénases *o*-méthyltransférase Protéases
Agents complexants	Cyclodextrines

Ces techniques sont le plus utilisées, mais elles présentent cependant des limites organoleptiques. Tel est le cas de l'emploi d'acide citrique (acidification), du bicarbonate de sodium (alcalinisation) ou encore des thiols (cystéine et glutathion), ces derniers interagissant avec les produits de la réaction pour former des produits d'addition incolores ; toutefois, ces composés d'addition peuvent également entrer dans des réactions d'oxydations couplées avec les *o*-quinones en excès conduisant, d'une part au phénol parental et d'autre part à la formation de produits fortement colorés (**Richard-Forget** *et* ***al*., 1992**).

Selon **Nappi** et **Vass(1994)**, la cystéine serait capable d'inhiber l'activité monophénolasique de la tyrosinase de champignon.

II.2.2.2.1. Agent réducteur

L'acide ascorbique est un agent réducteur largement utilisé dans l'industrie pour contrôler cephénomène. Cet antioxydant naturel régénère les *o*-diphénols enréduisant les *o*-quinones formées (**Varoquaux** et **Sarris, 1979** ; **Nicolas***et* ***al.*, 1994** ; **Walker** et**Ferrar,1995** ; **Martinez** et **Whitaker,1995**).

Cependant, son effet anti-brunissement n'est que temporaire (**Varoquaux** et **Sarris, 1979** ; **Golan-Goldhirsh** et **Whitaker, 1984**).

Les travaux de Golan-**Goldhirsh** et **Whitaker(1984)** montrent les effets inhibiteurs de l'acide ascorbique, du bisulfite de sodium et des composés thiols sur l'activité de la tyrosinase de champignon.

II.2.2.2.2. Agents chélateurs

Puisque la PPO est une métalloprotéine, elle peut être inhibée par des agents chélateurs de métal tels que le cyanure, le monoxyde de carbone, le diéthyldithiocarbamate de sodium(DIECA), l'éthylène diamine tétra-acétique acide (EDTA), le 2-mercapto benzothiazole,l'azide, le méthyle xanthate de potassium, l'acide kojique, L-mimosine et le tropolone **(Vámos-Vigyázó, 1981; Jolivet et *al*., 1998; Anderson et Morris, 2001 ; Gasowska et *al*.,2002 ; Mayer et Harel, 1979).**

II.2.2.2.3. Inhibition ciblant l'enzyme

Mayer et **Harrel (1979)** ont classé les inhibiteurs qui agissent directement sur la PPO en deux groupes :

- **Le premier groupe** est celui des agents chélateurs de métaux, tels que les ions azoture, cyanure, halogénés et latropolone. Le chlore (Cl-) est un inhibiteur non compétitif de la PPO.
- **Le second groupe** d'inhibiteurs consiste en analogues de substrats : ces acides carboxyliques de la série des acides benzoïque et cinnamique sont des inhibiteurs compétitifs de la PPO (**Janovitz-Klapp** ***et al.*****, 1990**).

Deuxième partie
Etude expérimentale

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Matériel biologique

Les dattes de la variété (Deglet –Nour) de Tolga utilisée dans notre étude a été achetée à maturité du marché local de la wilaya de Laghouat, sont d'origine de Biskra qui est située au Sud-est du pays, et plus exactement au sud des Aurès. Les dattes sont utilisées comme une source de l'enzyme Polyphenol oxydase (PPO).Les dattes sont lavées avec de l'eau distillée, séchées et conserver à 4°C.



Figure N° 16: *Phoenix dactylifera L*, la variété de DegletNour DeTolga

(Wilaya de Biskra, 2015)

1.2.Produits chimiques

Le phosphate de potassium(KH2PO4), (KH2PO4), l'acétate de sodium, le catéchol, l'acide citrique ($C_6H_8O_7$) l'acide ascorbique ($C_6H_8O_6$) et le polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP) sont fournis par Fluka tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'extrait brut de la PPO

La PPO a était isolée à partir des dattes de la variété (Deglet-Nour) selon le protocole d'extraction développé par (**Hasegawa et Maier., 1980).**

Les dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre 150g de chair de dattes refroidie préalablement à -10°C sont Dénoyés et découpés et broyer pendant 3min à l'aide d'un mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E) dans 300 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de potassium 0.05M à pH 7.0 contenant 5g de polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP).

Le broyat est ensuite filtré à travers quatre couches de gaz (4 compresses). Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min dans une centrifugeuse (Sigma Fischer Bioblock Scientific). Le surnageant récupéré de couleur jaunâtre, représente l'extrait enzymatique brut qui divisé dans des tubes Eppendrof de 2ml qui seront conservés à -10°C.



Figure N° 17: Un tube Eppendrof de 2mL Contenant l'extrait enzymatique brut d'une couleur jaune.

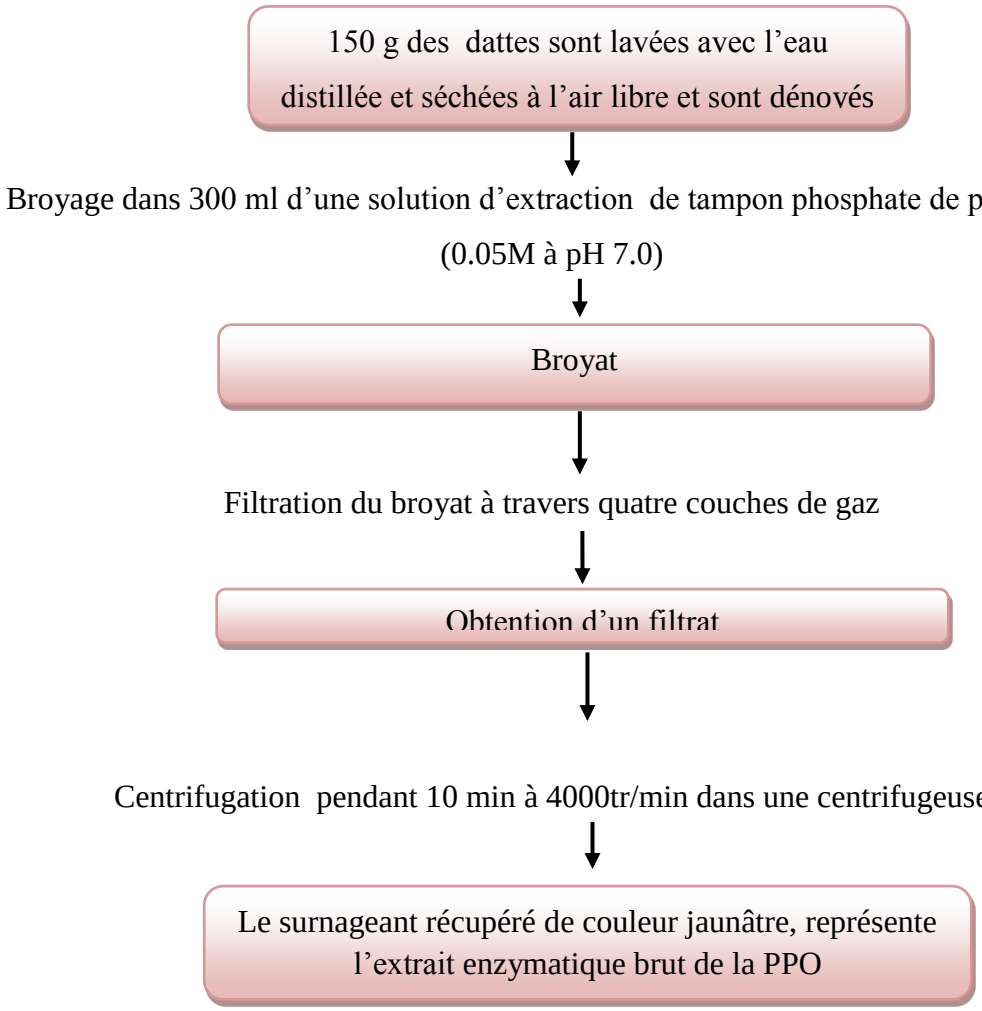


Figure N°18: Le protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera L*)

2.2. Mesure de l'activité de 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 HeλlOS γ) en présence oxygène/aire **(Espín et *al*., 1995 ;Fan et Flurkey, 2004).**

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 µl 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 (19) (Ünal, 2007).**

Une unité internationale (1 UI) est définie comme la quantité d'enzyme qui forme 1 µmole d'*o*-benzoquinone par minute **(Zheng et *al*., 2004; Erat et *al*., 2005 ; Gawlik-Dziki et *al*., 2007; Kumar et *al*., 2008).**

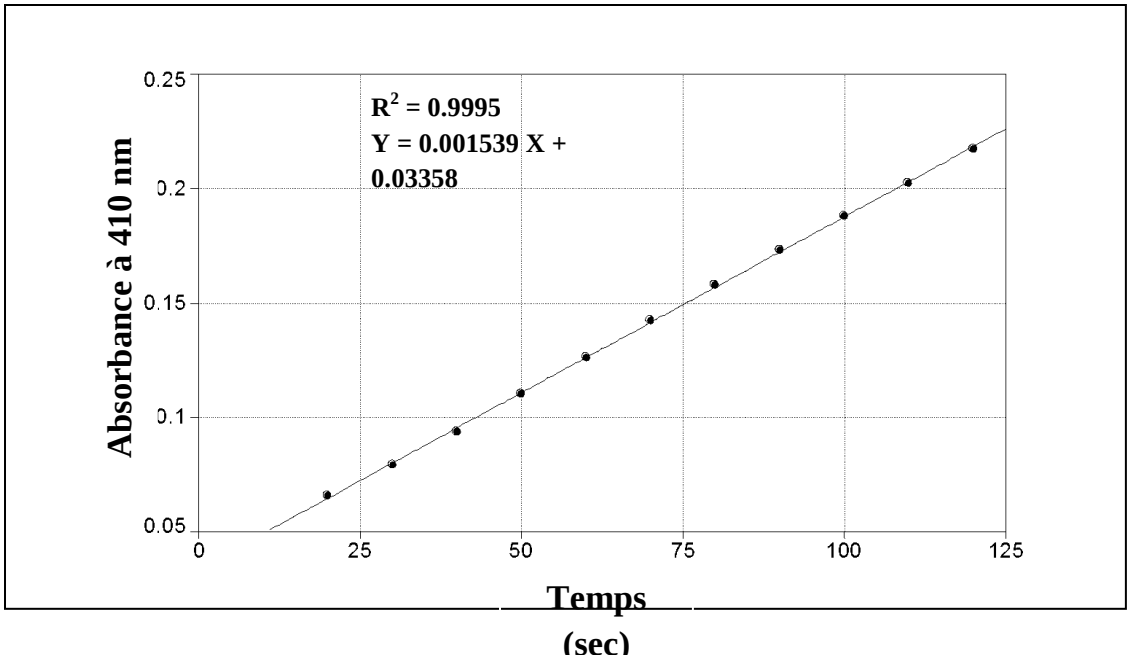


Figure 19 : Exemple de calcul de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la PPO de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) (pH 5.6-0.05 M tampon acétate de sodium ; catéchol 40 mM ; 30°C, extrait enzymatique 20 µl).

2.3. Détermination des valeurs d'IC_{50}

L'IC_{50} est la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50%. La mesure de l'activité de la PPO est effectuée à 30°C dans un tampon d'acétate de sodium à pH =5,6 en absence et en présence de différentes concentrations d'acide citrique comprises entre 0,1 et 0,5 mM et d'acide ascorbique comprises entre 5 et 35 mM et avec une concentration constante de substrat (Catéchol).

Les valeurs d'IC50 ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (acide citrique et acide ascorbique) **(Chen et *al*, 1998)**.

Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'activité de l'inhibiteur (A_0) **(Dogan et *al.*, 2005)** selon l'équation suivante :

$$AR(\%) = \left(\frac{A1}{A0}\right) \times 100$$

Avec :

A_0 : est l'activité diphénolase en absence d'inhibiteur

A_1 : est l'activité diphénolase en présence d'inhibiteur

Toutes les expériences ont été réalisées 2 fois.

2.3.1. Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide citrique et ascorbique

L'activité enzymatique de la PPO est mesurée dans un milieu réactionnel en absence et en présence de deux concentrations constantes d'inhibiteur 15 et 30 mM pour l'acide citrique tandis que pour l'acide ascorbique des concentrations valant 0,1 et 0,3Mm ont été utilisées et à différentes concentrations croissantes de la catéchol comprises entre 30 et 80 mM.

Les types d'inhibition ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat pour chaque inhibiteur **(Arslan et Doğan, 2005).**

2.4. Analyse des données cinétiques

Toutes les analyses de ce travail ont été effectuées trois fois et la moyenne des résultats est présentée. La barre d'erreur représente l'erreur standard. L'analyse des données cinétiques observées a été effectué par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2DTM (Jandel ScientificWindows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). EnzymeKinetics ProTM Version 2.36, SigmaPlot 2004 (Windows Version 9.01) et Origin 6.0 (Microcal(TM) Origin Version 6.0, Copyright © 1991-1999 Microcal Software, Inc.).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Détermination de la valeur d'IC_{50} :

L'effet de différentes concentrations d'acide citrique et/ou l'acide acorbique sur l'oxydation de la catéchol par la polphénol oxydase de la variété de Deglet Nour *Phoenix dactylifera L*.

Les résultats trouvés, montre que la concentration de ces deux inhibiteurs dans le milieu réactionnel provoque une diminution significative sur l'activité de la PPO.

La valeur d'IC_{50} est définie comme étant la concentration de l'inhibiteur d'acide citrique et/ou ascorbique qui provoque une diminution de l'activité enzymatique de la PPO par 50% **(Chen et *al*., 1998).** On a obtenu une valeur d'IC50=24,44mM ±0,79. et IC50=0,21mM ±0,32 en présence d'acide citrique et ascorbique, respectivement.

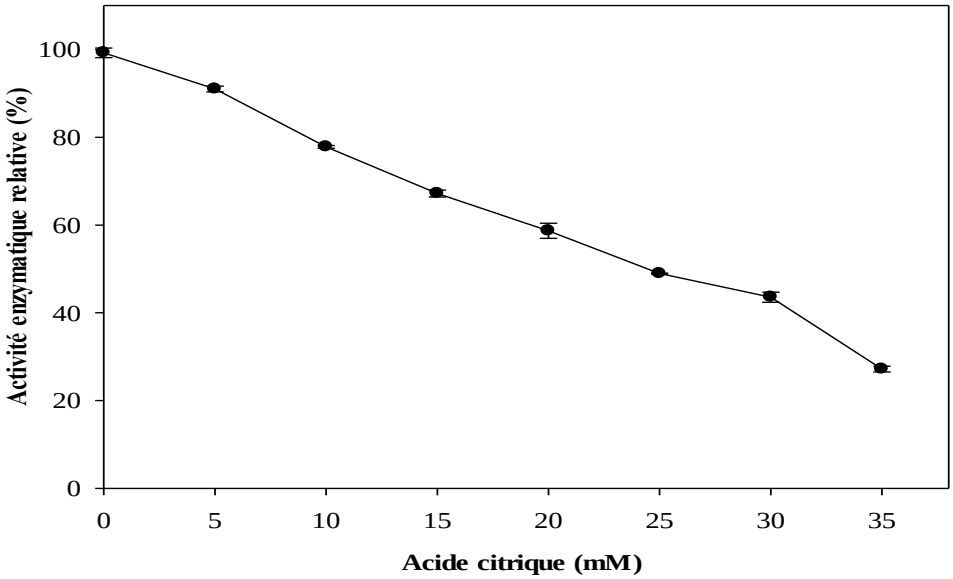


Figure N° 20: L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de Catéchol par la PPO de dattes DegletNour (*Phoenix dactylifera L)*. Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5,6).

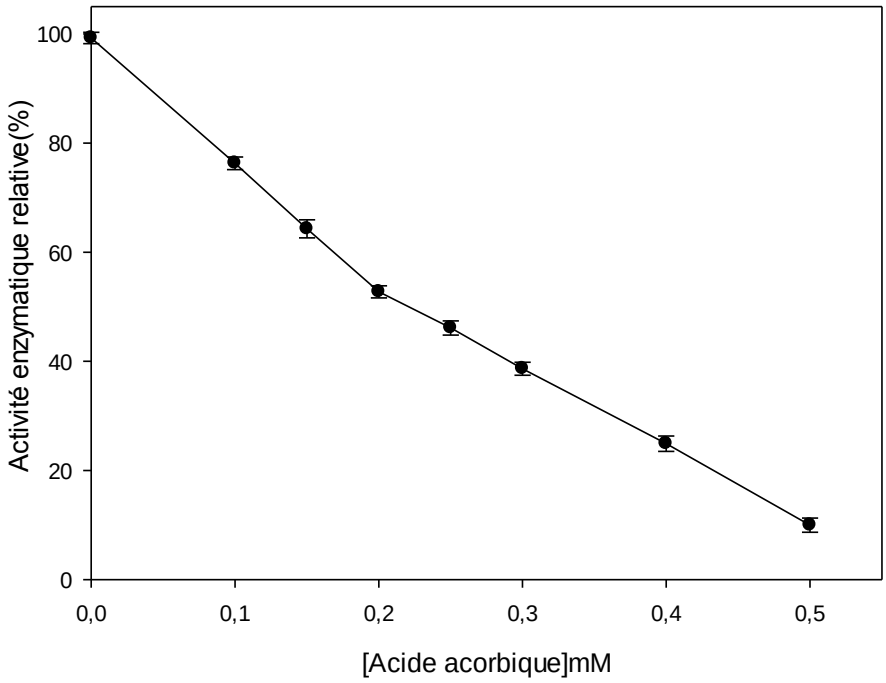


Figure N° 21 : L'effet de la concentration de l'acide ascorbique sur l'oxydation de Catéchol par la PPO de dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera L).* Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5,6). Chaque valeur représente la moyenne de 2 essais.

Pour mieux comparer l'effet de l'acide citrique sur les PPOs d'origine végétale et celle de datte Deglet-Nour,les valeurs d'IC_{50} de l'acide citrique ainsi que l'acide ascorbique trouvées pour la PPO obtenues à partir de différentes sources végétales sont indiquées dans le Tableau (5 et 6) respectivement

La valeur IC_{50}était calculée, qui est définie comme étant la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50%.Une valeur faible d'IC_{50} indique que l'inhibiteur est puissant.

D'après les résultats obtenus on constate que le pouvoir inhibiteur de ces deux inhibiteurs et leurs valeurs d'IC_{50} dépendent de plusieurs facteurs y compris premièrement la source d'enzyme dont les valeurs varient entre les dattes par exemple et les truffes ,et deuxièmes selon le type de substrat monophénolique, diphénolique comme le catéchol et/ou triphénolique comme le pyrogallol choisi

dont une valeur double d'IC50 est obtenu en présence de pyrogallol par rapport au cas de catéchol et ceci pour la même enzyme et/ou source.

Tableau N° 5 : Les valeurs d'IC50 de l'acide citrique trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différentes substrats

Sources	Type de substrat	IC_{50} mM	Références
Deglet – Nour***Phoenix dactylifera L***	Catéchol	24,44±0,79	**Notre étude**
Deglet – Nour***Phoenix dactylifera L***	Pyrogallol	50,08	**Bouchareb et Taouti 2013**
Truffe ***TerfezialeonisTul***	L-tyrosine	9,46	**Harrouz, Sahraoui, 2014**
Champignon de Paris ***Agaricusbisporus***	Catéchol	150	**SON** et ***al*., 2000**

Tableau N° 6: Les valeurs d'IC50 de l'inhibition de la PPO à partir de différentes sources et différentes substrats par l'acide ascorbique

Sources	Type de substrat	IC_{50} mM	Références
Deglet –Nour ***Phoenix dactylifera L***	Catéchol	0,21 ±0,32	**Notre étude**
Blé ***Triticumaestivum L.***	Catéchol	11.18	**Erat** et ***al*.,2010**
Truffe ***Terfezialeonis Tul***	L.Tyrosine	0.151	**Hafes, Saadi, 2014**
Champignon de Paris ***Agaricusbisporus***	Catéchol	0.24	**Goldrish et Witaker, 1984**

En utilisant l'acide ascorbique comme inhibiteur, nous avons obtenu une valeur d'IC 50 très appréciable reflétant entre autres l'efficacité de cet inhibiteur dont un

facteur de 100 fois plus est estimé en comparant cette valeur avec celle obtenue en présence d'acide citrique.

En analysant le **Tableau N° 6**, on remarque que l'affinité de la PPO de Champignon de Paris **(***Agaricusbisporus)* et de notre source Deglet–Nour (*Phoenix dactylifera L)* vis-à-vis de l'acide ascorbique est relativement similaire, par contre la PPO de Truffe **(***TerfezialeonisTul)* est très sensible en présence de cet agent chimique. La PPO de Blé (*Triticumaestivum L.)* est peu sensible à l'acide ascorbique.

2. Mécanisme cinétique d'inhibition

L'effet inhibiteur de l'acide citrique et/ou de l'acide ascorbique sur l'activité enzymatique de l'extrait brut de la PPO des dattes Deglet-Nour est étudié en utilisant le catéchol comme substrat.

Les résultats trouvés, montrent que ces deux inhibiteurs provoquent une diminution significative de l'activité enzymatique de la PPO et que leur pouvoir inhibiteur, dépend non seulement de sa concentration dans le milieu réactionnel, mais aussi de la concentration du substrat utilisé.

Les coefficients de régressions linéaires (R^2) des représentations de Lineweaver-Burk en absence et en présence de l'acide citrique et/ ou de l'acide ascorbique pour le substrat utilisé (catéchol) sont indiqués dans le tableau (8) et (9).

Leurs valeurs de R^2 comprises entre (0.989 et 0.994) indiquent bien que les données expérimentales ont été parfaitement ajustées par le modèle cinétique de l'inhibition choisi.

Tableau N° 7: Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de *(Phoenix dactylifera L)* par l'acide citrique

[acide citrique] (mM)	**K_i (mM)**	**K_m (mM)**	**V_{max} (Abs/min)**	**R^2**	**Type d'inhibition**
0			0,4133±0,023		
15	44,417±1,477	112,780±9,947	0,3133±0,017	0,989	Non compétitive
30			0 ,2351±0,015		

Tableau N° 8 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de *(Phoenix dactylifera L)* par l'acide ascorbique

[acide ascorbique] mM	K_i (mM)	K_m (mM)	V_{max} (mM)	R^2	Type d'inhibition
0		140,08±13,27	0,73±0,48		
0,1	0,203±0,007	208,42±15,55		0,994	compétitive
0,3		346,38±18,96			

Avec

K_i : Constante de dissociation du complexe EI (mM)

[I] : Concentration d'inhibiteur (mM)

K_m : Constante de Michaelis-Menten

V_{max} : La vitesse maximale

R^2 : Coefficient de régression linéaire

Les valeurs de K_{IS} indiquées dans les Tableaux (8 et 9) suggèrent que l'acide citrique et/ou l'acide ascorbique inhibent efficacement l'activité de la PPO des dattes Deglet-Nour en présence de catéchol, de même ces tableaux montrent que les représentations graphiques de $1/v_0$ en fonction de 1/[S], est une série de courbes parallèles, avec une diminution de la valeur V_{max} et pareillement, augmentation du K_m.

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de catéchol par la PPO des dattes, suit une cinétique de Michaelis-Menten. La cinétique d'inhibition de l'acide citrique et/ou l'acide ascorbique agissant sur l'enzyme a été déterminée par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk. Les résultats trouvés en présence de l'acide citrique et/ou l'acide ascorbique sont représentés dans les figures (22) et (23) respectivement.

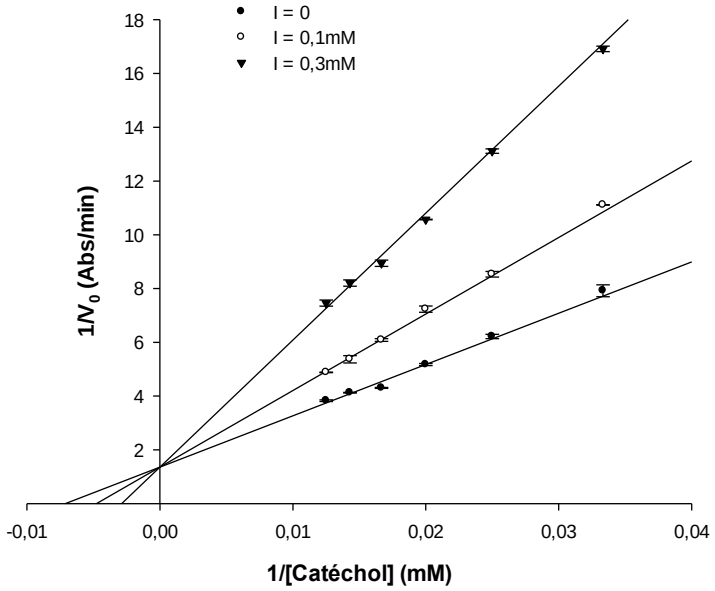


Figure N° 22 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L)* par l'acide ascorbique. Les concentrations d'acide ascorbique sont : 0 (●), 0,1(○), et 0,3(▼)

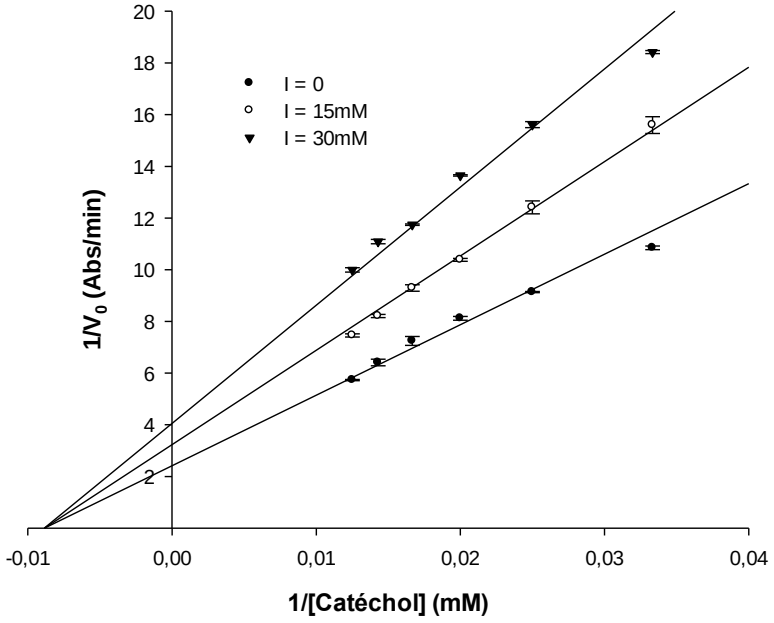


Figure N° 23 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L)* par l'acide citrique. Les concentrations d'acide citrique sont : 0 (●), 15(0), et 30(▼)

En présence d'acide ascorbique la représentation graphique de $1/V_o$ en fonction de 1/[S] est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, et qui se croisent l'une sur l'autre sur l'axe des ordonnées. La valeur de V_{max} demeure constante tandis que, la valeur de K_m augmente avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur.

En revanche et en présence de l'acide citrique la figure 23 montre une série de courbes linéaires ayant le même point d'intersection sur l'axe des abscisses (*1/[S]*) mais de différentes pente. Ceci indique que le type d'inhibiteur compétitif et non compétitif pour l'acide ascorbique et l'acide citrique, respectivement.

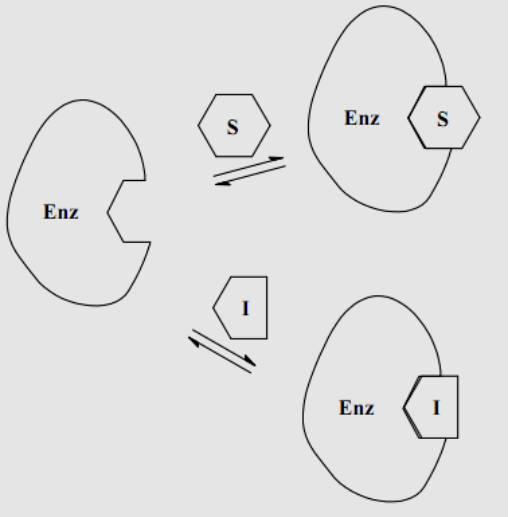


Figure N° 24: Représentation de l'inhibition compétitive (**Keillor, 2004**)

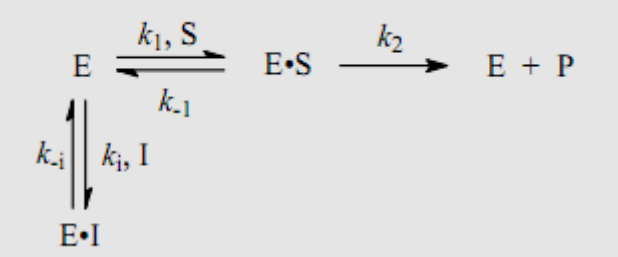


Figure N° 25 : schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitive (**Keillor, 2004**)

L'équation de Lineweaver-Burk pour l'inhibition compétitive s'écrit comme suit:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{max}}\right).\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Avec :

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

K_I : constante de dissociation du complexe EI (mM) ;

[I] : concentration d'inhibiteur (mM).

L'acide ascorbique se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

La constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_I, est obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (Km) en fonction de la concentration de l'acide ascorbique Comme c'est indiqué dans les Tableau (8) et 9, le constante d'inhibition (K_I) pour l'acide ascorbique et l'acide citrique, utilisant le catéchol comme substrat est respectivement, 44,417 Mm, 0,203 Mm.

Pour l'acide ascorbique nos résultats sont similaires avec ceux trouvés pour la PPO extraite d'artichauts (*Cynara scolymus L.)***(Tülin, 2003),** cependant, ils sont en désaccord avec ceux obtenus pour la PPO extraite de blé *(Triticum aestivum L.)* où l'effet de l'acide ascorbique a été décrit comme non compétitif avec le catéchol comme substrat **(Erat et *al*., 2010).** Ce qui indique que le type d'inhibition peut dépendre de l'origine de la PPO étudiée.

L'acide ascorbique est le composé chimique le plus fréquemment utilisé pour la réduction chimique des o-quinones en composés o-diphénoliques pour le contrôle du brunissement des fruits et légumes. Mais, son effet est temporaire **(Nicolas et *al*., 1994)** il empêche le brunissement tant qu'il est présent sous forme réduite **(Schwartz et *al*., 2001).**

Son caractère inhibiteur est lié à son action comme un antioxydant plutôt qu'un inhibiteur de l'enzyme puisqu'il réduit la quinone formée par l'enzyme en diphénol initial avant qu'elle entame les réactions secondaires qui mènent au brunissement **(Golan et *al*., 1984).**

L'équation de Lineweaver-Burk pour l'inhibition non compétitive s'écrit comme suit:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{max}}\right).\frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

Avec :

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_{IS}}$$

$K_I = K_{IS}$

K_I : constante de dissociation du complexe EI (mM) ;

K_{IS} : constante de dissociation du complexe ESI (mM) ;

[I] : concentration d'inhibiteur (mM).

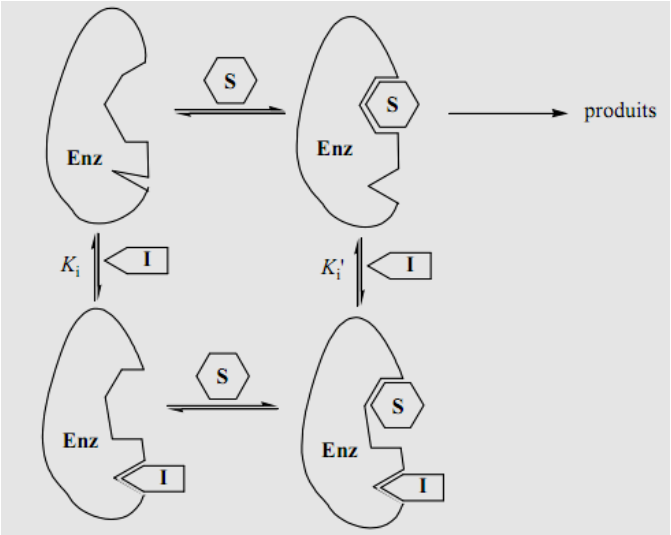


Figure N° 26: Représentation de l'inhibition non compétitive

(**Keillor, 2004**)

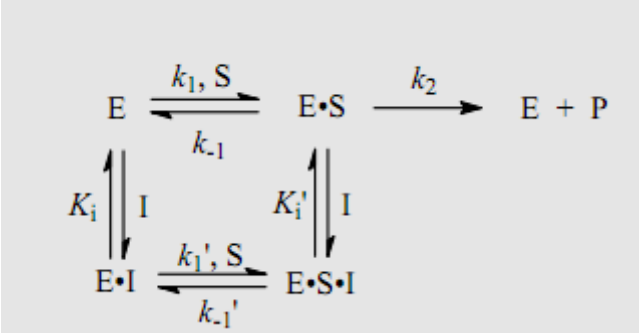


Figure N° 27 : Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive

(**Keillor, 2004**)

Urszul et *al*. (2007) ont trouvé que l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de la PPO de brocoli (*Brassica oleracea var. botrytis italica*) lorsque le catéchol est utilisé comme substrat. Par contre la PPO de céleri (*Apium graveolens L.)* présente une inhibition de type compétitif **(Tulin et Gulay, 2006).**

L'inhibition de la PPO par l'acide citrique peut être expliquée par son effet chélateur avec le cuivre du site actif de l'enzyme, et aussi par son pouvoir acidulant en abaissant le pH du produit afin de minimiser l'activité de la PPO, à des valeurs de pH inferieures de 4, l'enzyme a peu d'activité en raison de la perte de cuivre du site actif **(Suttirak et Manurakchinakorn, 2010).**

En effet, l’acide citrique est un acide organique retrouvé largement dans les fruits et les légumes, et ont été souvent signalé pour leur activité anti-brunissement dans l’industrie agro-alimentaire, cette activité est liée à la concentration d’agent anti-brunissement.

D'autre part, l'efficacité de l’acide citrique de retarder le brunissement peut être améliorée par l'addition d'un agent anti-brunissement possédant un mécanisme d'inhibition différent et / ou une meilleure stabilité.

Conclusion

Conclusion

Les dattes Deglet-Nour *Phœnix dactylifera* L.est un fruit de grande valeur nutritionnelle est commerciale. L'un des problèmes les plus importants des dattes, c'est la réaction de brunissement enzymatique causé par la polyphénol oxydase.

La polyphénol oxydase de datte Deglet-Nour a était extraite en milieu aqueux en présence de (PVPP). L'extrait enzymatique brut montre que la PPO des dattes est une diphénolase. La PPO de datte capable d'oxyder le catéchol comme substrat.

L'application de l'acide citrique et/ou l'acide ascorbique comme des inhibiteurs pour réduire le brunissement dû à l'enzyme PPO des dattes *Phœnix dactylifera* L. est ainsi rapportée pour la première fois.

D'après les résultats obtenus à partir de ce travail, on conclue que, l'acide ascorbique et/ou l'acide citrique présentent un mécanisme compétitif et non compétitif respectivement.

L'acide citrique inhibe la PPO en se fixant sur le complexe enzyme-substrat (ES), qui se comporte comme étant un inhibiteur non compétitif vis-à-vis du catéchol comme substrat et d'une manière réversible alors que l'acide ascorbique se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat

D'après les valeurs d'IC_{50}, nous pouvons déduire que l'acide ascorbique est 100 fois plus puissant que l'acide citrique

Ces deux acides organiques sont non toxiques et peu couteux ce qui rend leur utilisation comme étant des agents anti-brunissement très appropriée.

Afin d'améliorer le pouvoir inhibiteur des acides organiques, il est envisageable de le associer avec d'autre agents d'anti brunissement tel que l'acide ascorbique ou carrément avec un autre moyen physique comme l'inactivation thermique. Comme perspectives, il serait plus intéressant d'étudier l'effet de ces deux inhibiteurs sur les propriétés cinétiques et thermodynamiques de la PPO

Le brunissement enzymatique est une réaction indésirable, responsable du changement des qualités organoleptiques des fruits et des légumes. La Polyphénol Oxydase semble être impliquée directement dans ce phénomène

L'inhibition de cette enzyme par les agents chimiques constitue un moyen efficace contre les conséquences et/ou les dégâts de brunissement des dattes lors de stockage.

L'objectif de notre travail est d'inhiber l'enzyme Polyphénol Oxydase d'une manière réversible par deux acides organiques (l'acide citrique, l'acide ascorbique) par l'étude des mécanismes mis en jeu lors de l'inhibition du brunissement enzymatiques.

Nos résultats montrent que l'acide citrique est un inhibiteur de type non compétitif, et que l'acide ascorbique est un inhibiteur de type compétitif. Il était signalé que l'acide ascorbique est utilisé à de faibles concentrations car il est plus puissant que l'acide citrique.

Il serait donc possible d'utiliser ces deux acides comme des agents naturels de contrôle du brunissement des dattes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Aldo Todaro,Rosalinda Cavallaro,sergio Argento ,Ferdinando Brancand Giovanni Spagna.**(2011).**Study and Characterization of Polyphenol Oxidase from Eggplant (solanum melongena L.) *.J. Agric. Food Chem,59* (20), pp 11244–11248.

Altunkaya A., Gökmen V., 2011. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from durum wheat (*Triticum durum* L.).Journal of Cereal Science,55 :300-304.

Anderson, JV. and Morris, CF. 2001. An improved Whole-Seed Assay for Screening Wheat Germplasm for Polyphenol oxidase activity. Crop Science. 41: 1697-1705.

Arslan O., Dogan S., 2005. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2, 3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.85:1499-1504.

B

Bakkaye S., 2006. Lexique phoenicicole en arabe eT en mozabite. CWANA, HCA et RAB98/G31. P14-16, 24-25, 31.

Baldwin, MJ., Root, DE., Pate, JE., Fujisawa, K., Kitajima, N., Solomon, EI. 1992. Spectroscopic studies of side-on peroxide-bridged binuclear copper (II) model complexes of relevance to oxyhemocyanin and oxytyrosinase. Journal of the American Chemical Society, 114: 10421- 10431.

Belguedj M., 2002. Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud-Est. Algérien, Ed. 3D.Alger, 289 p.

Bertrand, G., 1896. Simultaneous occurence of laccase and tyrosinase in the juice of some mushrooms.Compte rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences 123, 463-465.

Bouchareb N., Taouti M. ,2013. Etude d'inhibition du polyphénol oxydase des dattes Deglet-Nour (*Phœnix dactylifera* L.) par l'acide citrique**.** Mémoire d'Ingénieur d'Etat en Biologie, Génie biologique.

Burton, SG. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. CatalysisToday, 22: 459-487.

C

Cavell A.J., 1947. Basra dates. Relationship between ripening and sugar content of twelve varieties. J. Soc. Cheem. Ind. London, 66.

Cheftel J.C., Cheftel H. (1976). Le brunissement enzymatique. In Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Tec. Doc., Lavoisier, 353-363.

Chen L., Mehta A., Berenbaum M., Engeseth N., 1998. The potential use of honey as an inhibitor of enzymatic browning. Presented at Annual Meeting, Institute of Food Technologists, Atlanta, GA.

Claus, H. and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. Systematic and Applied Microbiology, 29: 13-14.

Craft C. C., Audia W. M. (1962). Phenolic substances associated with wound-barried formation in vegetables. Bot. Gaz. 123: 211-219.

Crumière F., 2000. Inhibition of enzymatic browning in food products using bio-ingredients, A thesis of the requirements of the degree of Master of Science, Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University Montreal, Québec. P92.

D

Dawson V H W., 1963. Récolte et conditionnement des dattes. FAO ROME.

Decker, H. 2005. Copper proteins with dinuclear active sites. In: King, B. (Ed.), Encyclopedia of Inorganic Chemistry. John Wiley & Sons, II: 1159–1173.

Decker H., Terwilliger N., 2000. Cops and robbers : putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.*,203, 1777-1782.

Devshony, S., E. Eteshola et A. Shani., 1992. Characteristics and some potential applications of date palm (phoenix dactilifera L) seeds and seed oil. Journal of the American oil chemists' society (JAOCS), 69.595-597.

Djerbi, 1994. Précise de phoéniciculture.FAO, 192p.

DJOUDI, Imene, 2013. Contribution à l'identification et à la caractérisation de quelques accessions du palmier dattier (Phoenix Dactylifera.l) dans la région de Biskra, (1, 6, 9, 12, 13, 14, 15) p.

Doğan, S; Turan, P; Doğan, M; Arslan, O; and Alkan, M. 2005a. purification and characterization of *Ocimum bacilicum* L. Polyphenol Oxidase. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 53, No. 26, pp. 10224-10230.

Doğan, S; Turan, Y; Ertürk, H; and Arslan, O. 2005b. Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). J. Agric. Food Chem,

E

Eicken C., Krebs B., Sacchettini J.C., 1999. Catechol oxidase – structure and activity.*Current Op. Structural Biol*., 9, 677-683.

Ensminger A. H., Ensminger M. E., Konlande J. E., Robson J. R. K. (1995). The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition. Second edition, Boca Raton, CRC Press.1178p**.**

Erat, M.,yaser, N;Gulsah,A.(2010) . Partial characterisation of polyphenol oxidase hybridized wheat (triticum.aestivum). Foodtechnology. 899.905.

F

Fan Y., Flurkey W.H., 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms.*Phytochemistry*., 65, 671-678.

Fennema O. R. (1975). Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems.in Water relations of foods. R. B. Duckworth (Ed.). New York, Academic Press: 397-413.

Friedman M. (1997). Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols.A review. J. Agric. Food Chem. 45: 1523-1540

G

Gawlik-Dziki, U; Szymanowska, U; Baraniak, B. 2007. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. botrytis italica) florets. *Food Chemistry*, Vol. 105, pp. 1047-1053.

Gasowska, B., Wojtasek, H., Hurek, J., Drag, M., Nowak, K., Kafarski, P. 2002. Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl)methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase. Eur. J. Biochem. 269: 4098-4104.

Gilles, P., 2000. Cultiver le palmier dattier .Ed. CIRAS, 110 p.

Golan-Goldhirsh A., Whitaker J.R. (1984). Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem., 38, 1003-1009.

H

Haghbeen, K., Saboury, AA.,Karbassi, F. 2004. Substrate share in the suicide inactivation of mushroomtyrosinase. Biochimica et Biophysica Acta. 1675: 139-146.

Hanachi, 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

Husson, 1931 et **Matallah, 1970.** Contribution à la valorisation de la datte algérienne. Mémoire d'Ingénieur agronome, INA. El-Harrach, Alger, 113 p.

J

Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Goupy P. M., Nicolas J. J. (1990). Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem. 38: 926-931

Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998.Agaricusbisporus browning: a review. Mycol. Res. 102 : 1459-1483.

K

Keillor.jeffrey w 2004.inhbition des réactions enzymatiques BCM 2504**.**

Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C and Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. Nature Structural Biology. 5: 1084-1090**.**

Kumar Anil, V.B; Mohane Kishor, T. C; Murugan. K. 2008. Purification and kinetic characterization of Polyphenol Oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra* L.) *Food Chemistry*. Vol.110, pp. 328-333.

Kuwabara T., Katoh Y. (1999). Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. Plant Cell Physiol. 40: 1029-1035.

L

Lax A. R., Vaughn K. C. (1991). Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins.Plant Physiol. 96: 26-31

Lerch K. (1995). Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. in Enzymatic Browning and Its Prevention. C. Y. Lee,J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society: 64-80**.**

M

MA/DSAEE., 2001- Statistiques agricoles : Superficies et productions. Ministère de l'agriculture et du développement rural. Série A, 5-6 pp.

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.

Martinez M. V., Whitaker J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends Food Sci. Technol. 6: 195-200.

Mayer, AM., Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants.Phytochemistry. 18: 193-215.

Mayer, A.M. 1987. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants-Recent progress. Phytochemistry, 26, 11– 20.

Mayer, A.M., Harel, E. 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science. 373-398.

McEvily A. J., Iyengar R., Otwell W. S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. Crit. Rev. Food Sci.Nutr. 32: 253-273

Mozoyer M, 2002 ; Larousse agricole, le monde agricole au XXI^{ème} siècle. Ed. MATHILDE MAJOREL, p224**.**

Munier, 1973.Le palmier dattier. Ed. Maison neuve, Paris, 221p.

N

Naoui Y, 2006. Caractérisation physico-chimique comparative des deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Mémoire de Magister. Faculté des sciences de l'ingénieur. BOUMERDES, (2, 5,6) p.

Nappi A.J., Vass E. (1994). Chromatographic analyses of the effects of glutathione, cysteine and ascorbic acid on the monophenol and diphenol oxidase activities of tyrosinase. J. Liquid Chromatogr., 17, 793-815.

Nicolas J., Richard-Forget F., Goupy P.M., M.J.Amiot, Aubert S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 34, 109-157.

P

Papa, G; Pessione, E; Leone, V; and Giunta, C. 1994a.*AGARICUS BISPORUS* TYROSINASE–I. Progress Made In Preparative Methods. *Int. J. Biochem.*Vol. 26. No. 2, pp. 215-221.

Papa, G; Pessione, E; Leone, V; and Giunta, C. 1994b. *Agaricusbisporus*Tyrosinase II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities. *Int. J. Biochem*. Vol. 26, No. 2, pp. 223-228. progress. Phytochemistry. 26: 11-20.

Q

Qiu, L., Chen, QH., Zhuang, JX., Zhong, X., Zhou, J.J., Guo, YJ., Chen, QX. 2009. Inhibitory effects of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. Food Chemistry. 112: 609-613.

R

Richard-Forget F.C., Goupy P.M., Nicolas J.J. (1992). Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. Kinetic studies. J. Agric. Food Chem., 40, 2108-2113.

Rivas, NDJ, Whitaker, JR. 1973. Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. Plant Physiol. 52: 501-507.

Rodakiewicz-Nowak, J., Ito, M. 2003. Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent ResistantTyrosinase from Streptomyces sp. REN-21. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 78: 809-816.

Ros, JR., Rodríguez-López, JN., García-Cánovas, F. 1994.Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. BiochimicaetBiophysicaActa, 1204: 33-42.

S

Sanchez-Ferrer A., Rodríguez-López J.N., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F.,1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim.Biophys.Acta*., 1247, 1-11.

Sapers G.M., (1993). Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. Food Technol., 47, 75-83.

Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y., 2001. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. Food Chem., 73, 23-30.

Suttirak w., Manurakchinakorn s.(2010). Potential application of ascorbic acid, citric acid and oxalic acid for browning inhibition in fresh-cut fruits and vegetables. Walailak . J. Sci. Tech.,7(1), 5-14.

T

Tappel A. L. (1966). Effects of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems.in Cryobiology. H. T. Meryman (Ed.). New York, Academic Press: 163-177.

Tulin, A. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (Cynara scolymus L.). *heads Food Chemistry* 87:59–67.

Turner, EM. 1974. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, Agaricusbisporus. Transactions of the British Mycological Society. 63: 541-547.

Turrell F.M., 1940. Structural and chemical factors in relation to fungus spoilage of dates. Annual report. Date Growers Institute, 17.5- 11.

U

Ünal M.Ü., 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*).*FoodChemistry*., 100, 909-913.

Urszula g ., Urszula z., Michal w.(2007). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (lactuca sativa var. Capitata l.) Food chem., 8, 20-704.

V

Vamos-Vigyazo L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 15, 49-127.

Van Gelder, CWG.,Flurkey, WH., Wichers, HJ. 1997. Sequence and structural features of plant and fungaltyrosinases. Phytochemistry.45: 1309-1323.

Varoquaux P., Sarris J. (1979). Influence de l'acide ascorbique sur la cinétique de l'o-diphénolase (EC 1.14.18.1) du champignon de Paris (Agaricusbisporus). Lebensm.Wissen. Technol., 12, 318-320.

Vaughn K. C., Duke S. O. (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. Physiol. Plant. 60: 106-112

Vaughn K. C., Lax A. R., Duke S. O. (1988). Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. Physiol. Plant. 72: 659-665.

W

Walker J. R. L., Ferrar P. H. (1995). The control of enzymic browning in foods. Chem. Ind., 836-839.

Walker J. R. L., Ferrar P. H. (1998). Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. Biotech. Gen. Eng. Rev. 15: 457-498

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.

Z

Zawistowski, J., Biliaderis, CG.,Eskin, NAM. 1991. Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.

Zheng ,Xu, J;, T; Meguro, S. 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Catanea henryi*). J Wood Sci 50: 260-265.

Zinkernagel V. (1986). UnterchungenzurAnfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (Lactuca sativa) gegenfalschenMehltan (Bremialactucae). III. Peroxidase, peroxidatischeKatalaseund polyphenoloxydaseAktivitäten. J. Phytopathol 115: 257-266.

المراجع العربية

سليمان بن سعيد بكاي'2006."الفاظ النخلة بالعربية والميزابية" .الدار العربية للموسوعات-بغداد-1084ص

Université Amar Télidji Laghouat / Département de Biologie
BP 37G Route de Ghardaïa / 03000 Laghouat - Algérie - Tel : +213 29.93.26.98 poste : 242.
E-mail: dep.agro@mail.lagh-univ.dz / web: www.lagh-univ.dz