



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : M^{lle}. CHOUIREB KAOUTHAR

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : AGROALIMENTAIRE ET CONTROLE DE QUALITE

Thème

Étude de l'inhibition du Poly phénol oxydase de *Phoenixactylifera.L* par l'acide benzoïque et l'acide oxalique et en utilise le catéchol comme substrat

Nom et Prénom	Grade	qualité
M ^{me} LEBOUKH Saida		Président
M ^{me} Gouzi Hicham		Examineur1
M ^{me} Benàceur Farouk		Rapporteur

Promotion : juin - 2016

Remerciments

En premier lieu, je tente à remercier DIEU Miséricordieux le tout puissant qui il a donné la force, la volonté et le savoir pour poursuivre études et réalisé ce travail.

En deuxième lieu, J'adresse mes plus vifs remerciements à mon encadreur M. Benaser Farouk *mes plus chaleureux remerciements à ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre à réaliser ce travail.*

Je remercie, j'adresse mes remerciements aux membres du jury qui ont acceptés d'examiner mon travail.

KAWTHAR



DÉDICACES

Je dédie ce modeste mémoire qui est l'accomplissement de longues années d'études, en premier lieu :

La lumière de ma vie, mes très chers parents qui ont toujours été à mes côtés, qui m'ont soutenu et encouragé et qui, sans leurs amours, leurs compréhensions, leurs conseils et leurs tolérances je n'aurais jamais pu atteindre mes objectifs.

A mes chères sœurs

Siham ; aicha ; Keira

Qui m'ont accompagné et Pour l'affection et l'amour que je leur porte.

*A toute ma famille : **chouireb***

A tous mes meilleurs amis.

A tous ces moments merveilleux durant nos années d'étude.

A mes collègues et mes amis de la promotion.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A tous ceux qui m'ont assistée et encouragée.

A tous ceux qui me sont chers.

Kawthar



Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Sommaire	I
Listes des figures.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Liste des abréviations.....	IIV
Résumé	IIIV
Introduction.....	01

Chapitre I : synthèse bibliographies

1 .Le palmier dattier :	04
1. 1Le palmier dattier d'Algérie : répartition géographique et production.....	04
1.2 La datte Deglet Nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	05
1.2.1 Définition	05
1.2.2 Classification botanique	06
1.2.3 Evolution physiologique.....	07
1.2.4. Caractéristiques morphologiques.....	07
1.2.5 Composition biochimiques et valeur nutritionnelle.....	07
1.2.5.1 Composition biochimique.....	07
1.2.5.2 Valeur nutritionnelle	09
1.2.6 Le brunissement enzymatique des dattes.....	09
2 Le poly phénol oxydase	12
2.1 Historique.....	
2.2Nomenclature.....	12
2.3Définition	12
2.4 Classification	12
2.5 Source et localisation.....	13
2.6 Caractéristiques réactionnelles.....	13
2.7 Structure.....	14
2.8 Le site actif.....	17
2.9 Mécanisme réactionnel de l'activité catécholase.....	17
2.10 Méthodes de mesure de l'activité enzymatique.....	19
2.11 Spécificité de substrat.....	20
2.12 Effet du pH.....	20
2.13 Effet de la température.....	21
2.14 Effet des effecteurs.....	21
2.15 Applications.....	24

Matériels et méthodes

I. Matériels	26
I.1. Matériel biologique	26
I.2. Produits chimiques	26

II. Méthodes.....	26
II.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO.....	26
II.2 Mesure de l'activité de la PPO.....	27
II.3 Détermination del'IC ₅₀	28
II.4 Étude cinétique d'inhibition de la PPO des dattes Deglet-nour par l'acide Benzoïque.....	28
II.5 Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide oxalique	29

Résultats et discussion

I. L'effet de l'acide benzoïque et l'acide oxalique sur l'activité enzymatique de la PPO et la détermination de la valeur d'IC ₅₀	31
II. Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du polyphénol oxydase des dattes par l'acide benzoïque etl' acide oxalique	34
Conclusion générale.....	41

Références bibliographiques

Références bibliographiques.....	43
----------------------------------	----

Liste des Figures

N°	Figure	Page
Figure N° (1) :	Fruit et graine du dattier	05
Figure N°(2) :	Coupe longitudinale d'une datte	06
Figure N° (3) :	Réactions catalysées par le polyphénol oxydase	14
Figure N° (4):	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	16
Figure N° (5):	Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> . Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé)	16
Figure N°(6):	L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> . Les trois résidus histidines liés au CuA sont 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	16
Figure(7):	Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ; Deoxyet Oxy PPO	18
Figure(8):	Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO	18
Figure N° (9) :	<i>Phoenix dactylifera L</i> , la variété de DegletNour D'Algérie	26
Figure N° (10) :	spectrophotomètre (Thermo Scientific HeLIOS γ Spectrophotometer, England)	27
Figure N° (11) :	L'activité enzymatique relative de l'enzyme PPO des dattes et l'effet de différentes concentrations de l'acide benzoïque de <i>Phoenix dactylifera</i> . 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....	31
Figure N° (12) :	L'activité enzymatique relative de l'enzyme PPO des dattes et l'effet de différentes concentrations de l'acide oxalique de <i>Phoenix dactylifera</i> . 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	32
Figure N° (13):	Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenixdactylifera L</i>) par l'acide benzoïque.	35
Figure N° (14) :	Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenixdactylifera L</i>) par l'acide benzoïque	36
Figure N°(15) :	Représentation de l'inhibition compétitive	38
Figure N° (16):	Représentation de l'inhibition non compétitive	39

Liste des Tableaux

<i>N°</i>	<i>Tableau</i>	<i>Page</i>
Tableau N° (1) :	Les valeurs d'IC50 de l'acide benzoïque comme inhibiteur trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différentes substrats	33
Tableau N°(2) :	Les valeurs d'IC50 de l'acide oxalique comme inhibiteur trouvée à partir Différentes sources de PPO et le catéchol comme substrats	33
Tableau N° (3) :	type inhibition k_i et k_m de la PPO de datte (<i>Phoenix dactylifera</i>) avec Catéchol comme substrat	34
Tableau N°(4) :	type inhibition k_i et k_m de la PPO de datte (<i>Phoenix dactylifera</i>) avec Catéchol comme substrat	34

Liste des abréviations

PPO :	Polyphénol oxydase
PVPP :	Poly (vinyle) polypyrrolidone
Abs :	Absorbance optique à une longueur d'onde $\lambda=475$ nm
IC₅₀ :	Concentration d'inhibiteur pour une diminution de l'activité enzymatique de 50%
K_m :	Constante de Michaelis
K_{IS} :	Constante de dissociation
V₀ :	Vitesse initiale
V_{max} :	Vitesse maximale
R² :	Coefficient de régression linéaire
E :	Concentration d'enzyme
S :	Concentration de substrat
I :	Concentration d'inhibiteur

INTRODUCTION

La datte et plus particulièrement la variété Deglet-Nour, est le fruit du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. produit dans les régions sahariennes considéré comme un aliment de grande importance pour la population habitant ces régions. Dans le sud Algérien, les dattes constituent un aliment fondamental pour les musulmans durant toutes les saisons et particulièrement pendant le mois sacré de Ramadhan.

La datte est un aliment historique de grande valeur énergétique car elle est une source riche en glucides, en fibres alimentaires, en composés phénoliques, en vitamines et en macroéléments faisant d'elle un aliment naturel nutritif pour l'humanité (Kulkarni et *al.*, 2008 ; Dowson et *al.*, 1963). Elle est très appréciée aussi bien sur le plan national qu'international.

L'un des problèmes les plus importants des dattes, c'est la réaction de brunissement enzymatique qui se produit 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. Le polyphénol oxydase (PPO) est reconnue comme étant la principale enzyme responsable du brunissement des dattes.

La PPO est une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (Bertrand, 1896 ; Martinez et Whitaker, 1995 ; Mayer et Harel, 1979) et (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Casañola-Martín et *al.* 2006). 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 colorant brun ou noir appelé mélanine (Varoquaux, 1978).

L'inactivation de la PPO par les inhibiteurs chimiques est l'une des méthodes de contrôle la plus efficace pour la prévention du brunissement enzymatique. Cependant, leur utilisation ne peut être possible que s'ils n'ont aucun effet toxique, ne modifient ni le goût ni la couleur des produits et le traitement n'est pas coûteux (McEvily et *al.*, 1992; Sapers, 1993).

Au cours des dix dernières années, certains rapports ont été consacrés sur l'étude de l'inhibition de la PPO de différentes sources par l'acide citrique comme un anti-brunissement dans l'industrie alimentaire (Queiroz et *al.*, 2011). Par contre, l'inhibition de la PPO de datte n'a pas suscité l'attention similaire. Pour cela, l'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur d'acide benzoïque et acide oxalique sur l'activité de la PPO de Deglet-Nour et de déterminer ses mécanismes d'inhibition en utilisant le pyrocatechol comme substrat phénolique.

Notre travail sera présenté en quatre parties et est séquencé comme suit. La première partie concerne un rappel bibliographique sur la datte Deglet-Nour, le polyphénol oxydase (PPO) et sur le brunissement enzymatique et sa prévention. Dans la deuxième partie, nous mettrons en évidence 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.

Synthèse bibliographie

1 .Le palmier dattier :

1.1 Le palmier dattier d'Algérie : répartition géographique et production

Les véritables palmeraies commencent sur le versant Sud de l'Atlas saharien, par les palmeraies Deglet Nour de Biskra (Tolga) à l'Est, par celles du M'zab au centre de Bni-Ounif à l'Ouest. A l'extrême Sud du Sahara, l'Oasis de Djanet constitue la limite méridionale de la palmeraie Algérienne. C'est dans le Nord-Est du Sahara qu'on trouve le 3/4 du patrimoine phoenicicole, à la région de Ziban, d'Oued-Righ et la cuvette d'Ouargla dont la production a été estimée de 849 082 qx en 2006. C'est aussi dans ces régions que sont produites les belles dattes, Deglet Nour et autres variétés commerciales: Ghars, Mech Degla, Degla Beida. (Quinten, 1996). La wilaya de Biskra est considérée comme la première région dattière du pays. Elle représente actuellement 27 % du patrimoine national avec une production dattière annuelle de 90000 tonnes suivi de près par la wilaya d'El-Oued (Anonyme, 2003).

Pendant la campagne phoenicicole (2003/2004), la production de dattes a été estimée de 4 721 540 qx soit une augmentation de 13 % par rapport aux années écoulées. Il est à noter que 49 % du volume global de la production sont représentés par la variété Deglet Nour.

Effectivement, l'exploitation du palmier dattier constitue une source de revenus financiers appréciables pour les habitants des oasis.

L'Algérie et la Tunisie sont les premiers exporteurs de Deglet Nour en France et en Europe (Guizani et al. 2010). Selon FAO (2005) l'Algérie se classe comme le sixième producteur dans le monde.

L'Algérie occupe le cinquième rang mondial avec une production annuelle entre 400000 et 430000 tonnes dont plus de 48 % est représentée par la variété *Deglet-Nour* soit une moyenne de 190000 à 210000 tonnes par an (Anonyme, 2003). La *Deglet-Nour* de bonne qualité est souvent exportée. Elle constitue ainsi une source non négligeable de devises pour le pays.

Dans la société, le palmier dattier joue un rôle important dans le système oasien. Il favorise le développement d'un microclimat propice à la culture d'arbres fruitiers, maraîchers, fourragers ou céréaliers. Le palmier dattier constitue, ainsi, le pilier sur lequel repose tout le système oasien (Quinten, 1995).

1.2 La datte Deglet Nour (*Phoenix dactylifera L.*) :

1.2.1 Définition :

La datte est une baie à une seule graine bien qu'on évoque souvent à tort un noyau. Elle contient une seule graine dite "noyau" Figure (1). La partie comestible de la datte, est dite "chair" ou "pulpe", donc elle se compose de :

Partie comestible, représentée par le mésocarpe dont la consistance peut être selon les variétés, le climat ainsi que la période de maturation :

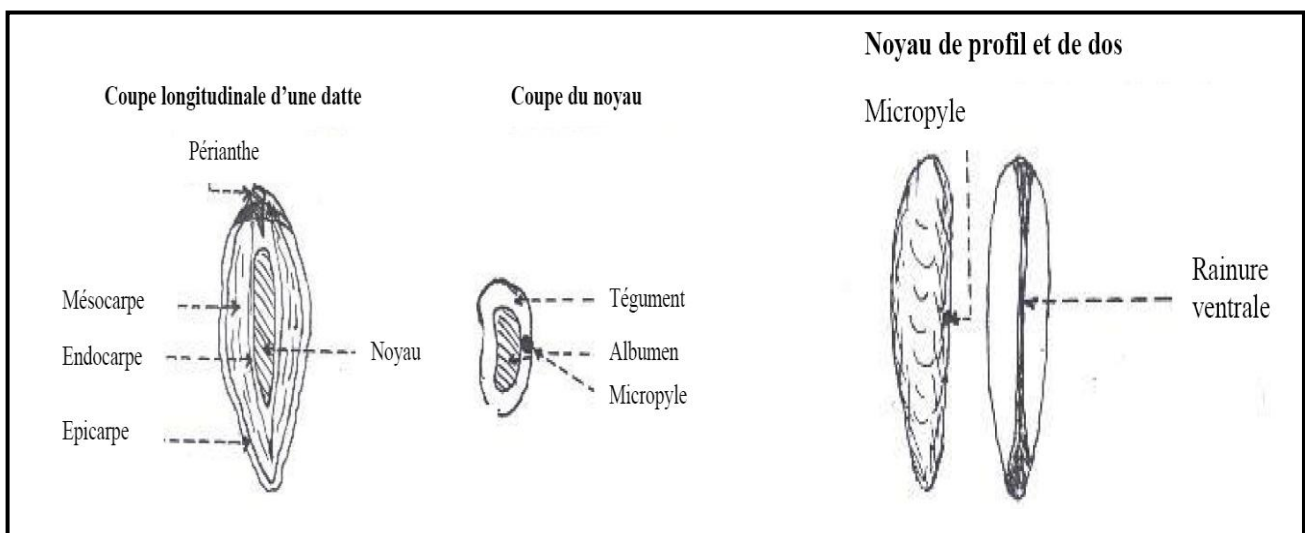
Molle : le mésocarpe est très humidifié avec peu de saccharose (31% d'eau).

Demi-molle : telle que la Deglet Nour (18% d'eau).

Sèche : telle que la Degla Beida, Hamraia et la Mech Degla (12% d'eau).

Partie non comestible, formée par la graine ou le noyau, ayant une consistance dure. Le noyau représente 10 % à 30 % du poids de la datte (Etienne, 2002).

La maturation des dattes est longue, elle débute vers les mois de mars-avril, et leur récolte commence en octobre, dans le nord du Sahara. Dans les oasis du Sahara central, on cueille les premières dattes, une friandise, dès le mois d'août, et même en juillet. Dans le sud du désert, le régime des pluies diffère, on doit alors cueillir les dattes à la fin de la saison sèche, début juillet, avant les pluies d'été (Benchelal et Maka 2006). Leur couleur va du blanc jaunâtre au sombre très foncé presque noir, en passant par les ambres, rouges et bruns.



Figure(1) : Fruit et graine du dattier (Munier, 1973 ; Buelguedj,2001).

1.2.2 Classification botanique

Le palmier dattier dans le règne végétal se classe selon (Feldman, 1974 ; Djerbi, 1994) :

Groupe : Spadiciflore.S

Embranchement : palmacées

Sous –embranchement : angiospermes

Classe : monocotylédones

Série : monocotylédone hypogynes

Ordre : spadiciflorales

Famille : palmoe

Tribu : phoenicées

Genre : *Phoenix*

Espèce : *dactylifera* L.

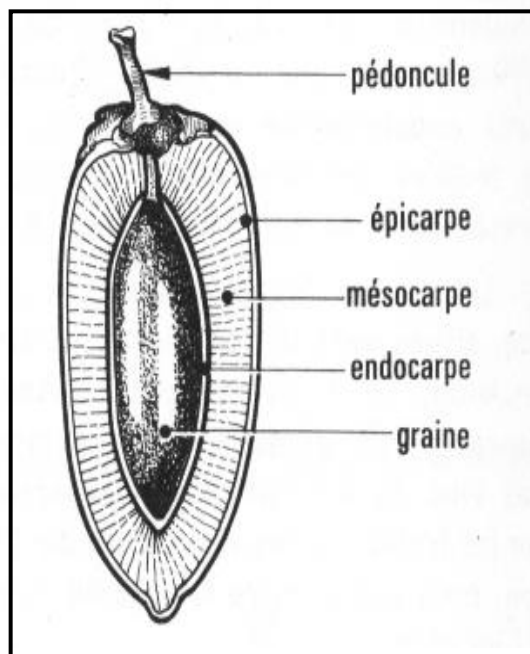


Figure (2) : Coupe longitudinale d'une datte (Richarde, 1972).

1.2.3 Evolution physiologique

Depuis la pollinisation jusqu'à la maturation complète de la datte et la récolte, on peut observer trois types d'évolution physiologique de la datte, qui sont (Kharoubi, 1995):

- Une évolution de taille ;
- Une évolution pondérale ;
- Une évolution de la couleur.

1.2.4 Caractéristiques morphologiques

En Algérie, les dattes les plus populaires sont : Deglet Nour et Ghars (Bessas *et al.*, 2008). La Deglet Nour/Deglet-En-Nour qui veut dire « doigts de lumière » a été ramenée en Algérie vers le 8^{ème} siècle. Elle constitue jusqu'à l'heure actuelle l'unique variété appréciée sur les marchés nationaux et internationaux et par ce fait, elle est la plus lucrative sensible à l'altération et se conservant mal sur les lieux de production. La datte Deglet Nour est une datte demie molle et excellente. Ses dimensions, selon (Maatallah, 1970) sont les suivantes:

- Un poids moyen de 10 g ;
- Une longueur moyenne de 6 cm ;
- Un diamètre moyen de 1.8 cm ;
- Un noyau lisse, de petite taille 0.8-3cm, pointu aux deux extrémités. La rainure ventrale est peu profonde, le micropyle est central.

1.2.5 Composition biochimiques et valeur nutritionnelle

2.2.5.1 Composition biochimique

Le pH : Le pH de la datte est légèrement acide, il varie entre 5 et 6. Ce pH est préjudiciable aux bactéries mais approprié au développement de la flore fongique (Reynes *et al.* 1994).

Les minéraux : La datte offre des **minéraux** et des **oligo-éléments** en quantité remarquable (Munier, 1973 ; Al-wassat., 2011). Elle en contient entre 1,5 et 1,8%, soit deux à trois fois plus que dans les fruits frais. La datte est parmi les fruits les plus riches en potassium (plus de 670 mg aux 100 g) (Al-wassat, 2011) et en calcium (62 mg) (Frenot et Vierling, 1997 ; Al-wassat, 2011). En magnésium (58 mg) et en fer (3 mg) ; une portion de 50 g de dattes fournit à peu près 10% des besoins quotidiens en fer et en magnésium. Elle renferme également du manganèse, du zinc et une quantité

intéressante de cuivre : ce dernier participe à la formation de l'hémoglobine et du collagène (protéine nécessaire à la structure et à la réparation des tissus) dans le corps.

Les fibres alimentaires : La datte procure une portion intéressante de **fibres**. Quatre dattes fournissent entre 2 et 4 g de fibres, soit entre 5 et 8% de l'apport journalier recommandé. Les fibres insolubles (non absorbées par les intestins) agissent directement sur le transit et les fibres solubles jouent un rôle dans la réduction du taux de cholestérol et par conséquent aident à réduire les risques de maladies cardiovasculaires (Barreveld, 1993, Al-wassat, 2011).

Le fluor : La datte contient une ration de **fluor** suffisante pour protéger les dents des caries (Al-wassat, 2011).

Les protides : Son taux de **protides** atteint 2,5% dans le fruit sec contre 1% maximum dans le fruit frais. Par contre, son pourcentage de lipides reste extrêmement faible (<1%) (Ghazi et Teffahi, 2007 ; Alwassat, 2011).

Les vitamines : Lorsqu'elle est séchée, son apport en **vitaminesdu groupe Best** remarquable : vitamine B3 (1,7 mg), vitamine B5 (0,8 mg), vitamine B6 (0,15 mg) et vitamine B2 (0,10 mg). En revanche, la vitamine C diminue considérablement (2 mg contre 15mg dans le fruit frais). (Munier, 1973 ; Al-wassat, 2011).

Les composés phénoliques :Mansouri et ses collaborateurs (2005) ont mené une étude sur des variétés de dattes mûres récoltés sur des palmeraies de Ghardaia. Les différentes variétés analysées ont présenté un contenu phénolique dans la gamme 2,49 - 8,36 mg/100 g du poids à l'état frais.

Les enzymes : La bonne connaissance des activités enzymatiques est d'une importance pratique pour l'aspect qualité en procédés alimentaires. En effet, par la manipulation de la température et l'humidité on peut stimuler ou désactiver l'enzyme suivant un résultat désiré (Barreveld W.H., 1993). L'activité des enzymes est connue pour être en grande relation avec la texture et la couleur des dattes (Zaid, 2002 ; Belarbi, 2001 ; Yahiaoui, 2000 ; Al-Hooti et al., 1997 ; Reynes, 1997 ; Aziza et al., 1986 ; Mutlak et Mann, 1984 ; Smolensky et al., 1975). Parmi les enzymes les plus regardées dans ce sens on trouve la polyphénol oxydase (PPO) et la peroxydase (POD). Selon Belarbi A. (2001), ces deux enzymes sont responsables du brunissement enzymatique du fruit.

1.2.5.2 Valeur nutritionnelle

La datte « Deglet noir » est un fruit très énergétique. Elle est légendaire pour la perfection qu'on lui connaît. La datte est qualifiée de « la reine des dattes » et l'un des produits phares de l'agriculture algérienne. Dotée d'un goût très doux, juteuse et quasi-transparente, elle est la plus populaire des dattes. Grâce à son effet laxatif, la datte est un aliment essentiel pour les femmes enceintes avant l'accouchement, car elle purgent le colon et les intestins et simplifie ainsi l'accouchement.

Le jus de dattes mixé avec du lait constitue une boisson très nourrissante et fortifiante pour les petits et même pour les grands. Les dattes agissent efficacement sur les troubles intestinaux (Benchelah et Maka, 2006 ; Al-wassat, 2011). Le sirop de datte est une médication intéressante pour traiter l'insuffisance cardiaque et les troubles sexuels (Al-wassat, 2011).

1.2.6 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.

Les dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L)

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).

2. Polyphénol oxydase

2.1 Historique

Le polyphénol oxydase a été découvert pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Et fut mise en évidence par Bertrand (1896) dans la bettrave ; le dahlia et certains champignons. Depuis sa découverte, la polyphénol oxydase a fait l'objet de recherches intensives (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Robb, 1984). Ces recherches ont portés, d'une part sur la nature physique et chimique de l'enzyme elle-même et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans la respiration des végétaux inférieurs et supérieures (Bonner, 1957).

2.2 Nomenclature

Des noms différents ont été associés à la polyphénol oxydase dont la phénolase, phénol oxydase, tyrosinase, crésolase, catécholase, diphénolase, o-diphénol oxydase et acide chlorogénique oxydase. La polyphénol oxydase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats qui sont généralement de o-quinones (Rivas et Whitaker, 1973 ; Sugumaran et *al.*, 1998; Burton, 1994).

2.3 Définition

La PPO également appelée tyrosinase est une oxydoréductase 1,2-benzenediol: oxygène. C'est une enzyme à cuivre (Kazandjian et Klibanov, 1985). La PPO est présente dans quelques bactéries et mycètes et dans la plupart des végétaux (Sapers, 1993).

2.4 Classification

La PPO a été placée dans deux catégories principales :

1) *monophénol monooxygénase ou tyrosinase (EC 1.14.18.1) :*

La PPO (EC 1.14.18.1) est une oxygénase aussi bien qu'une oxydase (Decker et Terwilliger, 2000).

2) *o-diphénol : O₂ oxydoréductase (EC 1.10.3.2):*

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

2.5 Source et localisation

L'activité de PPO a été rapportée dans la pomme (Aoki et *al.*, 1980), le raisin (Taverso- Rueda et Singleton, 1973 ; Kidron *etal.*,1978 ; Wissemann et *lie*, 1980 ; Sapis et *al.*,1983), la pêche (Harel *etal.*,1970 ; Chan et Jeunes, 1971 ; Wong et *al.*,1971 ; Flurkey et Jen, 1978), la poire (Tate et *al.*, 1964 ; Rivas et Whitaker, 1973), banane (Galeeazzi et *al.*,1981), la pomme de terre (Sato, 1976 ; Golbeck et Cammarata,1981 ; Harel et *al.*,1970).

La PPO a été également trouvée chez les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et les mycètes (Burton, 1994 ; Whitaker, 1995 ; Chen et Flurkey, 2002 ; Claus et Decker, 2006). On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. La PPO peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Mayer et Harel, 1979).

2.6 Caractéristiques réactionnelles

En présence d'oxygène moléculaire, la PPO catalyse deux réactions bien distinctes (Figure 3) à savoir l'ortho-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (catéchols) (activité crésolase ou hydroxylase, monophénolase) (Réaction (1)) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénol en o-quinones, activité fréquemment désignées sous le nom de la polyphénol oxydase, o-diphénol oxydase, catéchol oxydase ou activité catécholase (EC 1.10.3.1)(Réaction(2)) (Metzler, 1977 ; Cho et Ahn ,1999; Tomas-Barberà et Granata et *al.*, 2005).

Les o-quinones produits de la transformation des substrats de la PPO sont fortement réactifs et peuvent subir des réactions de polymérisation et de cyclisation non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène noir, brun ou rouge, généralement appelé mélanine, soit réagir avec des acides aminés ou des protéines pour produire des composés colorés (Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2007, Dicko et *al.*, 2002 ; Cho et Ahn, 1999; Burton, 1994).

le polyphénol oxydase

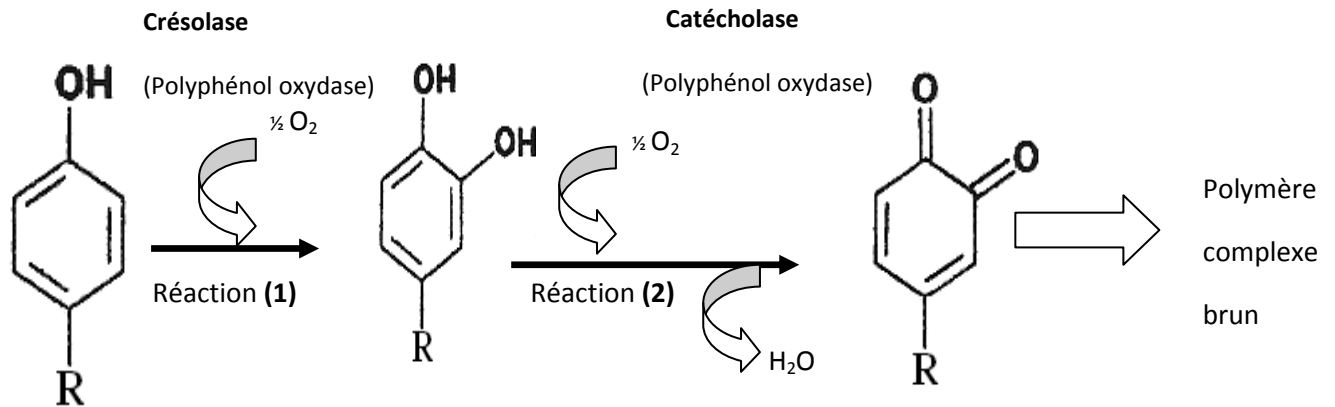


Figure 3: schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Burton, 1994; Van Gelder et *al.*, 1997).

2.7 Structure

La structure cristallographique de la PPO n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la PPO, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce, possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker, 2006 ; Siegbahn, 2003). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (Della Longa et *al.*, 1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmelwright et *al.*, 1980), et des similitudes de séquence primaires (Van Gelder et *al.*, 1997).

Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices α et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (Lerch, 1982). Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomeabatatas*) (Klabunde et *al.*, 1998). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des *o*-diphénols et permet ainsi, un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox.

Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (Mayer, 1987). Seule la structure cristalline de la PPO de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active, a été résolue (Klabunde et *al.*, 1998).

La PPO native du champignon de souche *Agaricus bisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, 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. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme H_2L_2 ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L, demeure inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure H_2L_2 . Alors que la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en sous-unités L_2H . Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la PPO des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (Strothkamp et *al.*, 1976 ; Robb, 1984 ; Zawistowski et *al.*, 1991; Whitaker, 1995 ; Solomon et *al.*, 1996 ; Van Gelder et *al.*, 1997; Jolivet et *al.*, 1998 ; Fan et Flurkey, 2004).

Selon Wichers et *al.* (1996), les sous-unités isolées H et L ne possèderaient aucune activité enzymatique. Les PPOs des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux, contiennent seulement un type de sous-unité, et sont souvent monomériques. Ces enzymes sont actives à l'état monomérique. Dans le cas de la PPO d'*A. bisporus*, la sous-unité H qui est responsable des activités catalytiques, peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (Robb, 1984 ; Jolivet et *al.*, 1998).

Dans beaucoup de cas, les PPOs des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentes sous des formes multiples d'isoenzyme (Mayer et Harel, 1979 ; Anosike et Ayaebene, 1982). Ces formes d'enzyme, peuvent être différenciées par leur spécificité de substrat, leur pH optimum, leur stabilité thermique et leur réponse aux inhibiteurs.

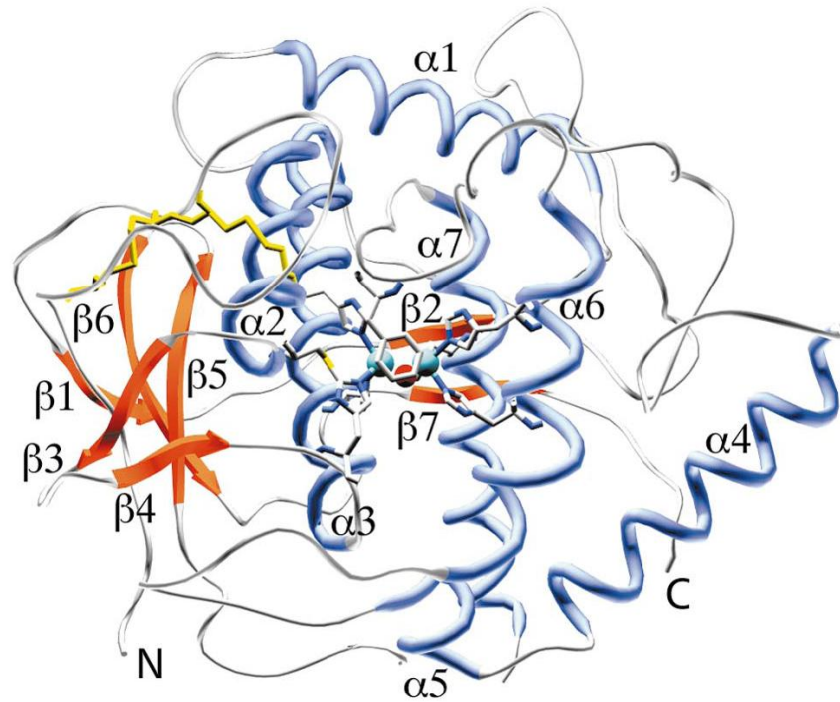


Figure 4: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et *al.*, 1999).

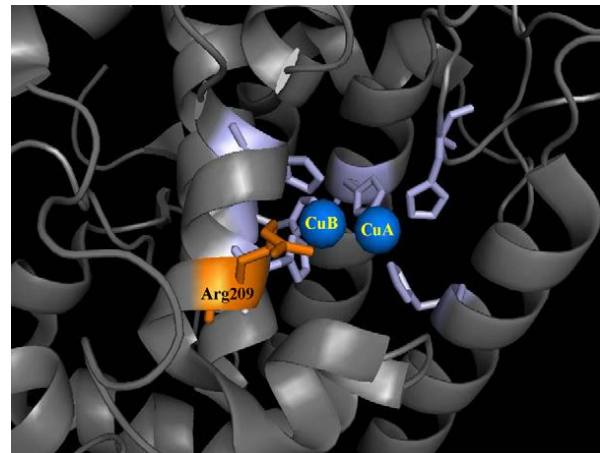


Figure 5: L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).

Figure 6: Structure du site actif de la tyrosinase. Les atomes de cuivre (bleu), histidines liées aux atomes de cuivre (violet clair) (Ben-Yosef et *al.*, 2010).

2.8 Le site actif

Il a été montré, que la PPO peut avoir un site actif semblable à celui de l'oxyhémocyanine (Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2003, Baldwin *et al.*, 1992).

La PPO est une métalloenzyme 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).

La structure secondaire de la PPO est principalement α -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ 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 du cuivre. Il est entouré par les hélices, $\alpha 1$ et $\alpha 4$, 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 $\alpha 2$ (Figure 4). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α (Figure 5). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est située au milieu de l'hélice $\alpha 2$, tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice $\alpha 3$. Le second cuivre, CuB, est 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 (Figure 6) (Van Gelder *et al.*, 1997).

2.9 Mécanisme réactionnel de l'activité catécholase

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique, sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après Sánchez-Ferrer *et al.* (1995), le site actif des PPOs peut exister sous trois formes, selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *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 7).

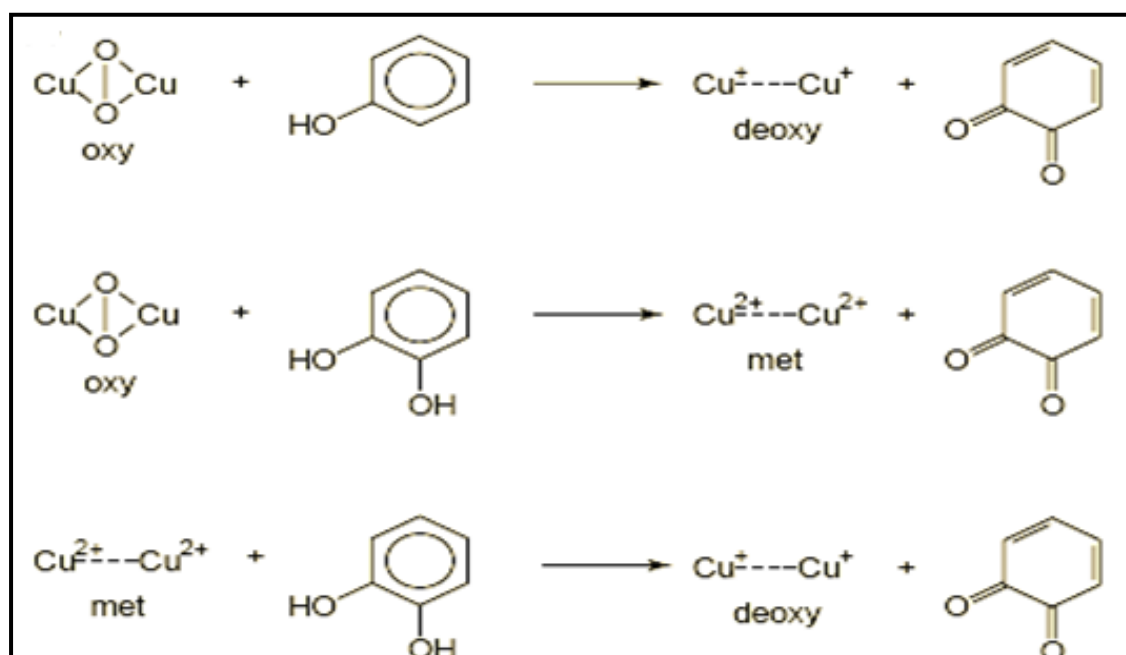


Figure 7: Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ; Deoxyet Oxy PPOd'après Van Gelder *et al.* (1997).

Le modèle du mécanisme réactionnel de l'activité catécholase de la PPO est représenté dans la Figure (8).

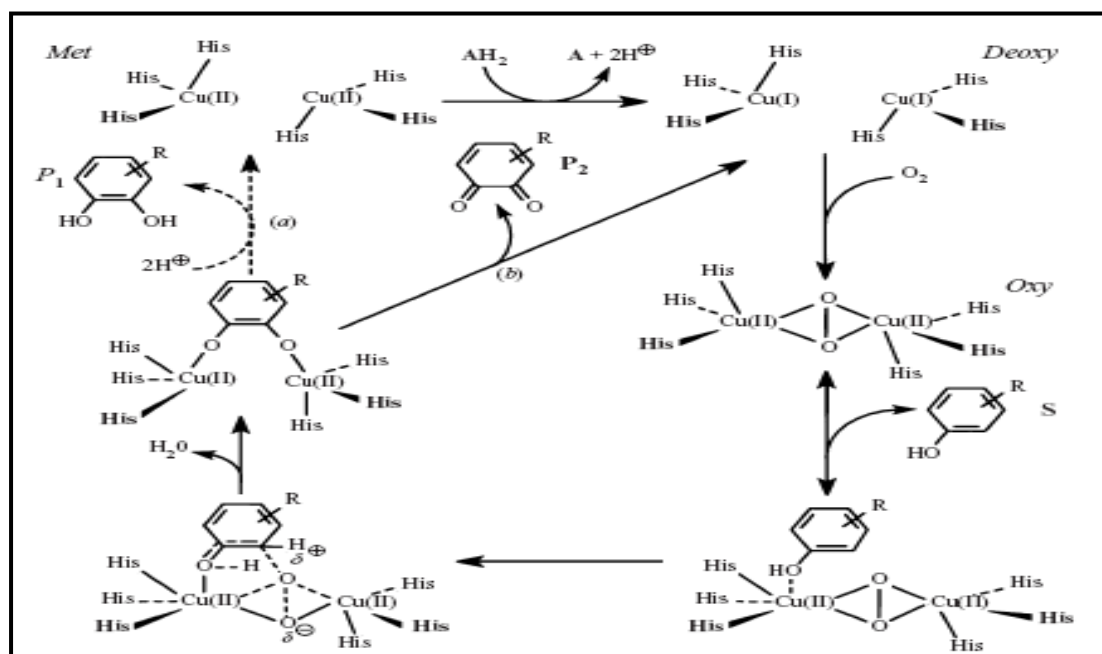


Figure 8: Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO Solomon *et al.* (1992).

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 bicuivrique, 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.

2.10 Méthodes de mesure de l'activité enzymatique

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 mesurée 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 vitesse de formation du produit peut être déterminée, par méthode spectrophotométrique, en mesurant la densité optique des composés colorés (o-quinones) formés à partir des substrats. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la PPO (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Espín et *al.*, 1995). 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 d'eau dans le milieu contenant du tritium à partir du [2.6- 3H] monophénol tel que la [3.5- 3H] tyrosine (Mayer et Harel, 1991 ; Jolivet et *al.*, 1998). On peut également 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).

2.11 Spécificité de substrat

Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphénol oxydase (catécholase), peuvent catalyser une grande variété de substrats (Whitaker, 1995). La PPO présente différentes affinités vis-à-vis du même substrat selon la source de son obtention tel que, l'espèce, le genre, le *cultivar*, ou également le tissu (Zawistowski et *al.*, 1991).

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 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, de grandes différences dans les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) sont constatées selon la source et la pureté de l'enzyme (Zawistowski et *al.*, 1991).

A titre d'exemple, la substitution en position 3 du 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 comme le 4-méthyl catéchol ou l'acide chlorogénique, augmente la réactivité du substrat, alors que celle d'un groupement attracteur d'électron, comme le 4-nitrocatechol ou le 3,4-dihydroxy acide benzoïque, réduit la réactivité du substrat (Vámos-Vigyázó, 1981).

Le catéchol est le substrat phénolique le plus simple de la PPO puisqu'il possède la structure de base des *o*-dihydroxyphénols. Ceci ne signifie pas qu'il s'agisse 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.

2.12 Effet du pH

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 impliqués 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^+ ou les hydroxyles OH^- sont impliqués.

2.13 Effet de la température

L'effet de la température sur l'activité des PPOs n'a pas été très étudié, comparativement parlant 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 courtes durées 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). La diminution d'une partie de l'activité de la PPO après chauffage à une basse température n'est pas étonnante (Yemenicioğlu, 2002). 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). L'inactivation thermique de la PPO peut être considérée comme étant une forme d'inhibition de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991).

2.14 Effet des effecteurs

Les activateurs : La PPO peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, les acides gras, les alcools, les protéases et par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), (Seo et *al.*, 2003 ; Pérez-Gilabert et *al.*, 2004 ; Gandía-Herrero et *al.*, 2005). Ce dernier (SDS), peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la PPO de champignon de couche (*Agaricus bisporus*) (Espín et Wichers, 1999).

Il a même été montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées. De même, l'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (Vámos-Vigyázó, 1981; Fan et Flurkey, 2004; Van Leeuwen et Wichers, 1999).

Les inhibiteurs : 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. Les traitements thermiques de courtes durées aux températures comprises entre 70- 90°C, de la PPO en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et al., 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003).

Plusieurs études ont montré que la PPO obtenue à partir de diverses source est inactivée thermiquement (Yemenicioğlu et al., 1997 ; McCord et Kilara, 1983 ; Weemaes et al., 1998a,b ; Soysal, 2008). L'inconvénient majeur du traitement thermique réside dans la production du mauvais goût et l'apparition d'une coloration indésirable causés par la réaction de Maillard. La combinaison du traitement thermique avec d'autres méthodes physiques tels que la pression, les micro-ondes ou les ultrasons pouvant induire une inactivation réversible ou irréversible de la PPO à des températures relativement basses, en particulier lorsqu'il s'agit d'un produit sensible à la chaleur (Terefe et al., 2009 ; Weemaes et al., 1998 ; Buckow et al., 2009 ; Rapeanu et al., 2005 ; Devece et al., 1999). Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique.

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la PPO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source d'enzyme, de la disponibilité du substrat (O_2 et substrat phénolique) et du pH et de la température (Zawistowski et al., 1991).

Il est commode de diviser les inhibiteurs de la PPO en trois catégories :

- 1) Les agents de chélation généraux pour le cuivre : petites molécules ou ions qui se lient au centre de cuivre dans le site actif compétitif en ce qui concerne l'oxygène,
- 2) les inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique,

3) les analogues des phénols compétitives vers des substrats (phénol et/ou diphénol) (Robb, 1984; Burton, 1994).

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 diéthylldithiocarbamate de sodium (DIECA), l'éthylène diamine tétra-acétique acide (EDTA), le 2-mercaptobenzothiazole, 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).

Les ions inorganiques, y compris les halogénures, sont également capables d'inhiber les PPOs de beaucoup de sources. Les inhibiteurs potentiels des PPOs de champignon, de cerises, de pommes, de poire, d'abricot et de pommes de terre sont principalement les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques, les acides carboxyliques, le dihydrate de phloridzine et certains acides cinnamiques substitués. Les ions halogénures se comportent comme étant des inhibiteurs purement compétitifs vis-à-vis de la fixation du dioxygène (Rescigno et *al.*, 2002; Robb, 1984). L'acide ascorbique peut également agir directement sur la PPO du champignon par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu^{2++} en Cu^+ (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991). En outre, les composés qui ne ressemblent pas à la structure de substrat (exemple : le 4-nitrophenol, la phénylalanine et le 4-chlorophénol) et qui sont lentement oxydés, ont été identifiés comme des inhibiteurs compétitifs de la PPO. Les analogues de substrat comme les acides aromatiques, tel que l'acide benzoïque et l'acide cinnamique, se comportent habituellement comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du substrat phénolique (Robb, 1984; Jolivet et *al.*, 1998; Gasowska et *al.*, 2002 ; Janovitz-Klapp et *al.*, 1990). L'inhibition de la PPO est également provoquée par des agents réducteurs parmi lesquels, les sulfites ; SO_2 ; l'acide ascorbique, l'acide érythorbiqes et les composés à fonction thiol (Kahn, 1985 ;Zawistowski et *al.*, 1991).

Les composés à fonction thiol, comme la L-cystéine, le glutathion, le dithiotreitol, le mercaptoéthanol et le thiourée, sont des inhibiteurs efficaces de la PPO de plusieurs sources (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Burton, 1994 ; Rescigno et *al.*, 2002). Les polymères solubles tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP), agissent au tant qu'inhibiteurs compétitifs de la PPO, mais on ne sait pas s'ils agissent sur l'enzyme

liée au phénol ou sur l'enzyme (Jolivet et *al.*, 1998 ; Vámos-Vigyázó, 1981). Les acides aminés, peptides et protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement la PPO, soit en réagissant avec les *o*-quinones (McEvily et *al.*, 1992). Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu^{2+} du site actif de la PPO (O'Sullivan, 1969). Les cyclodextrines peuvent inhiber la PPO par fixation sur le substrat phénolique (Irwin et *al.*, 1994). L'acide citrique inactive la PPO par deux mécanismes : élimination du cuivre du site actif et par la diminution du pH du milieu (McEvily et *al.*, 1992). La grande majorité de ses inhibiteurs n'est pas spécifique seulement pour les PPO (Mayer et Harel, 1991).

2.15 Applications

La PPO est l'une des enzymes ayant de multiples applications. Elle est utilisée dans la production des *o*-diphénols comme la L-dopamine et le catéchol (Min et *al.*, 2010 ; Seetharam et Saville, 2002 ; Marín-Zamora et *al.*, 2009 ; Tuncagil et *al.*, 2009).

Seule ou parfois associées à d'autres enzymes tel que la laccase (Monteriali et *al.*, 2010 ;), elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (Njagi et *al.*, 2010), le catéchol (Tan et *al.*, 2010), le phénol et ses dérivés (Adamski et *al.*, 2010).

Dans le domaine agroalimentaire et environnemental, les biocapteurs à tyrosinase peuvent être utilisés également pour le dosage de certains polluants chimiques (Durán et Esposito, 2000), comme le cyanure (Shan et *al.*, 2004), l'acide benzoïque (Li et *al.*, 2010), l'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 dérivées au niveau des eaux usées (Yamada et *al.*, 2005 ; Seetharam et Saville, 2003 ; Ikehata et Nicell, 2000).

Matériels et méthodes

I. Matériels

I.1 Matériels biologiques

La datte (Deglet-Nour) utilisée dans notre étude a été achetée à maturité du marché local de la Wilaya de Laghouat dans la semaine son utilisation. Les dattes sont lavées avec de l'eau distillée, séchées et conserver à 4°C(Figure 9)



Figure (9) : *Phoenix dactylifera L*, la variété de DegletNour d'AlgériePhoenix (Wilaya de Biskra, 2015)

I.2 Produits chimiques

Le phosphate de potassium(KH_2PO_4), (KH_2PO_4), l'acétate de sodium, le catéchol, l'acide benzoïque l'acide oxalique 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.

II. Méthodes

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

La PPO a été isolée à partir des dattes de la variété (Deglet-Nour) selon le protocole d'extraction développé par Hasegawa(1980)

Les dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre.200g de chair de dattes refroidie préalablement à -15°C sont Dénoyés et découpés et broyer pendant 3min à l'aide d'un mixeur (warning commercial blender 800EG ,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) comme chélateur des composés phénolique .le broyat est ensuite filtré à travers quatre couche de gaz. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min dans une centrifugeuse (Thermo ScientificHelIOSγSpectrophotometer, England).

Le surnageant récupéré d'un volume totale de 150 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait enzymatique brut(PPO) qui divisé dans des tubes Eppendrof de 2ml qui seront Conservés à -10°C

II.2 Mesure de l'activité de PPO

L'activité delàpoly phénol oxydasesest mesurée à 410 nm en utilisant le catéchol comme substrat par la mesure directe de la formation du produit o-quinone à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo ScientificHelIOSγSpectrophotometer, England).en présenced'oxygène/aire (Fan et Flurkey, 2004 ;Esppin et *al* .,1995).

La solution mère de catéchol à 0.4 M est préparé dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5mM (Fan et Flurkey, 2004).

Le milieu réactionnel contient 1 ml de substrat à 40mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 20 µl d'extrait enzymatique.La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant 2 min après l'ajout de l'extrait enzymatique.



Figure N° 10 :Un tube Eppendrof de 2mL Contenant l'extrait enzymatique brut d'une couleur jaune. Broyage

II.3 Détermination des valeurs d'IC₅₀

IC₅₀ et fait Pour déterminer la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC₅₀).

L'activité de la PPO a été mesurée à 30°C et pH 7.0 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs (acide benzoïque comprises entre 0.1 et 0.35 mM et l'acide oxalique comprises entre 0.5 et 3,5mM pour une concentration constante de 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 benzoïque et acide oxalique) (Chen et *al*, 1998).

Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'activité de l'inhibiteur (A₀) (Dogan et *al*, 2005) selon l'équation suivante :

$$AR(\%) = \left(\frac{A_1}{A_0} \right) \times 100$$

Avec :

A₀ : est l'activité diphénolase en absence d'inhibiteur

A₁ : est l'activité diphénolase en présence d'inhibiteur

Toutes les expériences ont été réalisées 2 fois.

2.4 -Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque et acide oxalique

L'activité enzymatique de la PPO est mesurée dans un milieu réactionnel en absence et en présence de deux concentrations constantes d'inhibiteur (0,1 et 0,3 mM pour l'acide benzoïque tandis que pour l'acide oxalique des concentrations valant 1,5 mM et 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).

2.5 Analyse des résultats expérimentaux

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 nonlinéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2DTM (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). EnzymeKinetics Pro™ 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.).

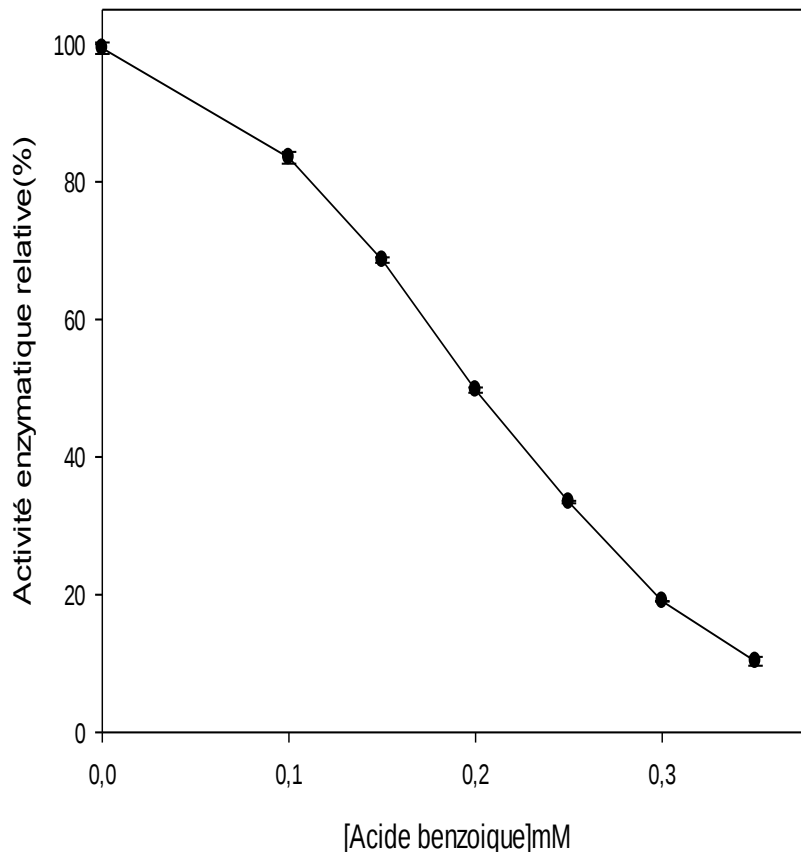
RESULTS ET DISCUSSION

I. Détermination de la valeur d'IC₅₀ et L'effet de l'acide benzoïque sur l'activité enzymatique de la PPO :

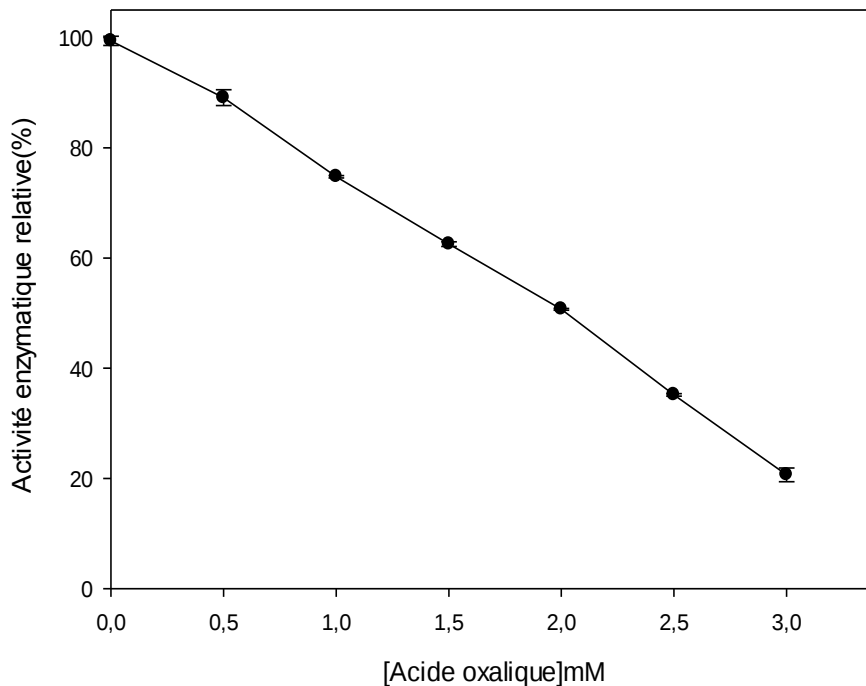
L'effet de différentes concentrations d'acide benzoïque sur l'oxydation de la Catéchol par le Poly phénol oxydase de *Phoenix dactylifera L*, la variété de Deglet Nour.

Les résultats trouvés, montre que la concentration d'acide benzoïque dans le milieu réactionnel provoque une diminution significative sur l'activité de la PPO.

La valeur d'IC₅₀ est définie comme étant la concentration d'acide benzoïque (inhibiteur) qui provoque une diminution de l'activité enzymatique de la PPO par 50%(Chen et *al.*, 1998).Et après le calcul la valeur d'IC₅₀ obtenue = 0,19mM±0,081mM. 1,92mM±0,33mM en présence d'acide benzoïque et oxalique, respectivement.



Figure(11) :L'activité enzymatique relative de l'enzyme PPO des dattes et l'effet de différentes concentrations de l'acide benzoïque de *Phoenix dactylifera*.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.



Figure(12) : L'activité enzymatique relative de l'enzyme PPO des dattes et l'effet de différentes concentrations de l'acide oxalique de *Phoenix dactylifera*. 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 comparés l'effet de l'acide benzoïque sur les PPOs d'origine végétale et celle de datte Deglet-Nour, la valeur IC_{50} a 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. Les valeurs d' IC_{50} de l'acide benzoïque ainsi que l'acide oxalique trouvées pour la PPO obtenues à partir de différentes sources végétales sont indiquées dans le Tableau (1 et 2) respectivement

D'après les résultats obtenus on constate que le pouvoir inhibiteur du l'acide benzoïque et la valeur d' IC_{50} dépend de la source d'enzyme et le type de substrat choisi pour la mesure de l'activité de la PPO des dattes.

Résultat et discussions

Tableau (1) : Les valeurs d'IC₅₀ de l'acide benzoïque comme inhibiteur trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats

source	Type de substrat phénolique	IC ₅₀ (mM)	référence
Champignon de paris (<i>agaricus bisporus</i>)	Catéchol	0.147	Gouzi et <i>al.</i> ,2010
Champignon de paris (<i>agaricus bisporus</i>)	Catéchol	1.00	Chen et <i>al.</i> 2003
Turffes (<i>terfezià leonis</i>)	Catéchol	8.2	Gouzi., 2014
Plaquemine	Catéchol	5.00	Arzu et <i>al.</i> 2004
Turffes (<i>terfezià leonis</i>)	L-Tyrosine	2.82	Djaïd et Kouidri 2015
Datte (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Catéchol	0.19	Notre étude

On remarque que l'affinité de la PPO de Champignon de paris (*Agaricus bisporus*) et de Deglet-Nour vis-à-vis de l'acide benzoïque est relativement similaire. La PPO de truffes semble être la moins sensible à l'acide benzoïque.

Tableau (2) : Les valeurs d'IC₅₀ de l'acide oxalique comme inhibiteur trouvée à partir de différentes sources de PPO et le catéchol comme substrats.

source	Type de substrat phénolique	IC ₅₀ (mM)	référence
Champignon de paris (<i>agaricus bisporus</i>)	Catéchol	1.1	Son et <i>al.</i> ,2000
Turffes (<i>terfezià leonis</i>)	Catéchol	8.21	Chàher et benmbàrek ., 2011
plaquemine	Catéchol	0.031	Arzu et <i>al.</i> 2004
Artichaut (<i>Cyanra scolymuys</i>)	Catéchol	0.194	àydémir., 2014
Datte (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Catéchol	1.92	Notre étude

En revanche, on remarque l'efficacité de l'acide oxalique vis-à-vis de la PPO des dattes est moyenne par rapport aux autres sources et que l'acide benzoïque semble être plus puissant que l'acide oxalique avec un rapport d'environ 10 fois.

Résultat et discussions

II. Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase des dattes

L'effet inhibiteur de l'acide benzoïque et/ou de l'acide oxalique 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 benzoïque et/ ou de l'acide oxalique pour le substrat utilisé (catéchol) sont indiqués dans le tableau (3) et (4) respectivement. Leurs valeurs de R^2 comprises entre (0.985 et 0.998) indiquent bien que les données expérimentales ont été parfaitement ajustées par le modèle cinétique de l'inhibition choisi.

Tableaux(3) : type inhibition k_i et k_m de la PPO de datte (*Phoenix dactylifera*) avec catéchol comme substrat pour l'acide benzoïque

Acide benzoïque (mM)	K_i (mM)	K_m (mM)	V_{max} (abs/min)	Type d'inhibition	R^2
0		95,93±6,25			
0.1	95,93±6,25	150,62 ±9,81	0,60±0,02	Compétitive	0,997
0.3		262.17±17,08			

Tableau (4) : type inhibition k_i et k_m de la PPO de datte (*Phoenix dactylifera*) avec catéchol comme substrat

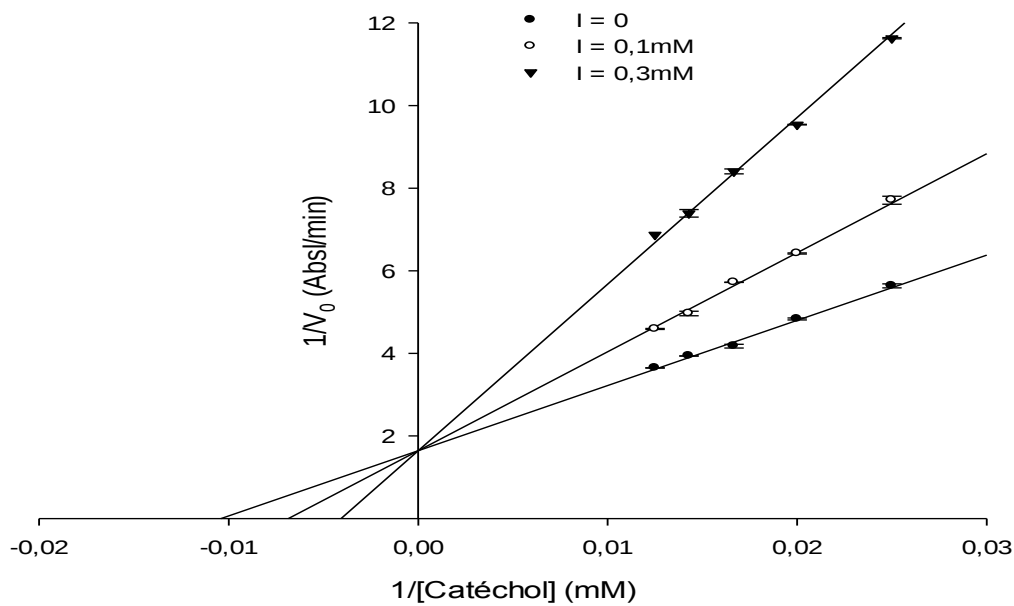
Acide oxalique (mM)	K_i (mM)	K_m (mM)	V_{max} (abs/min)	Type d'inhibition	R^2
0					
			0,61±0,03		
1.5	4,62±0,12	123,61±9,24	0,42±0,02	non Compétitive	0,992
3					
			0,37±0,01		

Les valeurs de K_{IS} indiquées dans les Tableaux (3 et 4) suggèrent que l'acide benzoïque, et/ou l'acide oxalique inhibent efficacement l'activité de la PPO des dattes Deglet-Nour en présence de catéchol de même ces tableaux montrent que les

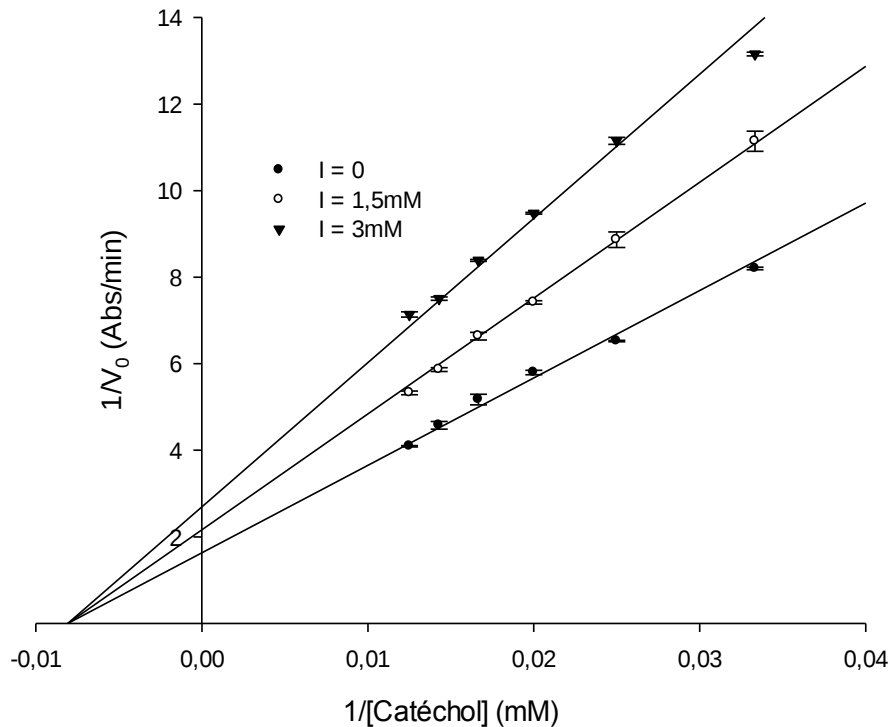
Résultat et discussions

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, une diminution 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 benzoïque et/ou l'acide oxalique 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 benzoïque et/ou l'acide oxalique sont représentés dans les figures (13) et (14) respectivement.



Figure(13): Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenixdactylifera L*) par l'acide benzoïque. Les concentrations d'acide benzoïque sont : 0 (●) ,0.1 (○) ,.0.3(▲),mM.



Figure(14) : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenixdactylifera L*) par l'acide oxalique . Les concentrations d'acide oxalique sont : 0 (●) ,0,5(○) ,3(▲),mM.

Les Figures (13 et 14) montrent respectivement, les graphiques de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence d'acide benzoïque et d'acide oxalique en utilisant le catéchol

En présence d'acide benzoïque, la représentation graphique de $1/V_0$ 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 oxalique la figure (14) 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 type d'inhibiteur compétitif et non compétitif pour l'acide benzoïque et l'acide oxalique, respectivement.

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

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

Avec :

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

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

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

L'acide benzoïque 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 (K_m) en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Comme c'est indiqué dans les Tableau (3), le constante d'inhibition (K_I) pour l'acide benzoïque, utilisant le catéchol comme substrat sont respectivement, 95,93mM

L'inhibition compétitive de la PPO par l'acide benzoïque observée dans notre étude, est en accord avec les résultats trouvés pour la PPO de champignons par Harry *et al.*, (1970) et pour d'autres PPOs obtenues à partir de différentes sources (Anosike et Ayaebene, 1982; Robert *et al.*, 1997 ;Ziyan et Pekyardimce, 2004 ; Dogan *et al.*, 2005). Le caractère inhibiteur de l'acide benzoïque est due à la présence du cycle benzène au niveau de sa structure (PIFFERRI *et al.*, 1974).

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

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

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).

Résultat et discussions

La constante d'équilibres de la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_I ; et sur le complexe (ES) ; K_{IS} cette valeur est égale à valeurs sont de 4 ,62 mM

La présence d'un inhibiteur noncompétitif dans le milieu réactionnel n'affecte pas la fixation du substrat avec l'enzyme libre mais affecte la fonction catalytique de l'enzyme.

L'inhibition par l'acide oxalique peut être fondée sur l'hypothèse que l'enzyme est inactivée en liant l'inhibiteur par chélation au cuivre du site actif de l'enzyme en présence du substrat (Ferrar et Walker,1993). Les PPO de sources différentes peuvent présenter un mécanisme d'inhibition différent, par exemple Tulin (2004); Fujita et Tono (1988); Huang et *al.*, (1996) ont étudié la PPO des artichauts, des aubergines et des poires, respectivement, et leurs résultats sont en accord avec notre étude. En outre les PPO de céleri, de champignon, et de blé (Tulin et Gulay, 2006; Son et *al.*, 2000; Erat et *al.*, 2010) ont présenté un mécanisme d'inhibition compétitif.

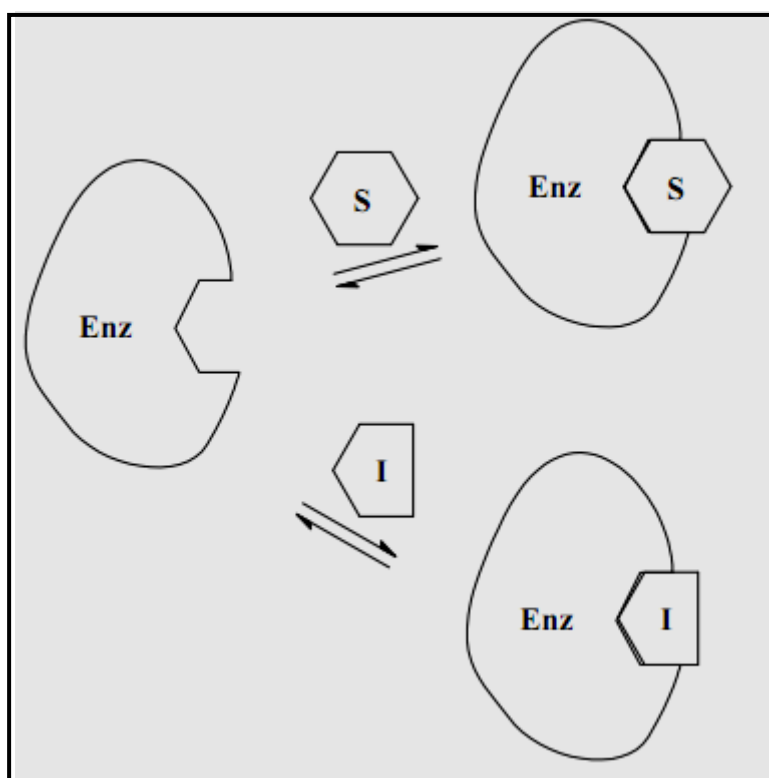


Figure N°(15): Représentation de l'inhibition compétitive (Keillor, 2004)

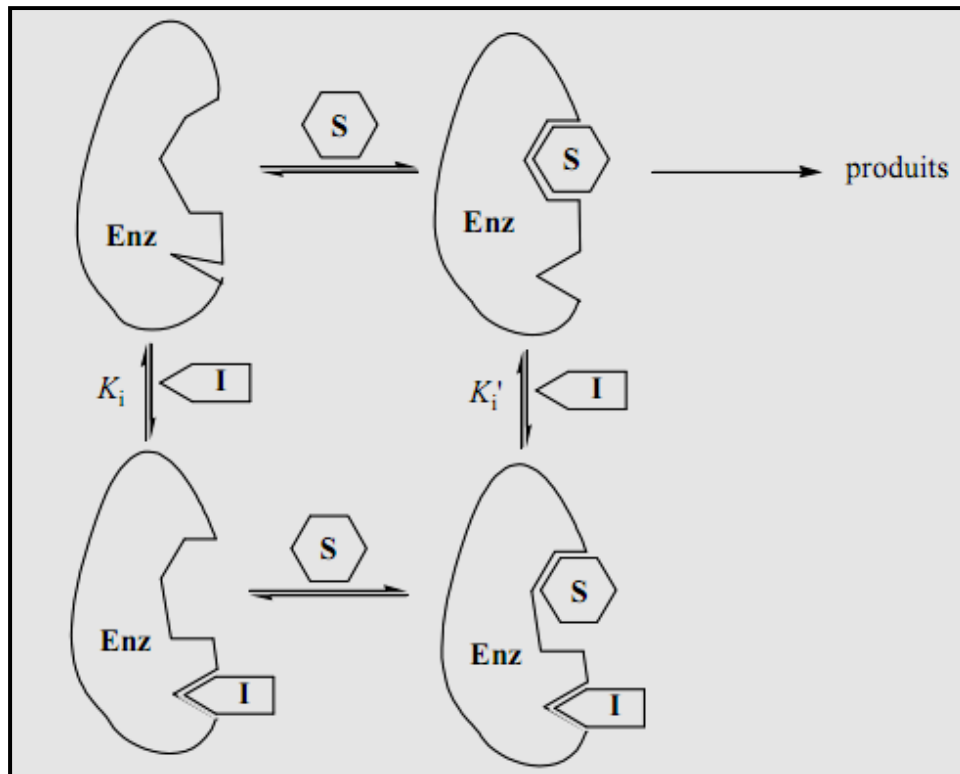


Figure N° (16): Représentation de l'inhibition non compétitive (Keillor, 2004)

CONCLUSION

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

Le polyphénol oxydase de datte Deglet-Nour a été extrait 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 pyrogallol comme substrat.

L'application de l'acide benzoïque et/ou l'acide oxalique comme des inhibiteurs pour réduire le brunissement dû à l'enzyme PPO des dattes *Phoenix dactylifera* L. Est ainsi rapportée pour la première fois.

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

L'acide oxalique 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 tandis que L'acide benzoïque se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat

D'après les valeurs d'IC₅₀ ces derniers peuvent être considérés comme étant des inhibiteurs efficaces

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

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.

Reference bibliographie

- **ADAMSKI, J., NOWAK, P., KOCHANA, J.**(2010). Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*. 55: 2363–2367.
- **Al-Hooti, S.; Sidhu, J.S., (1997)**. Qabazard, H. Objective color measurement of fresh date fruits and processed date products. *Journal of Food Quality*. Vol 20: 257-266.
- **Al-wassat, 2011** A kinetic study of the air oxidation of pyrogallol and purpurogallin. *International Journal of Chemical Kinetics*. 21: 465-476.
- **Amiot et al. 1997** Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. *Postharvest Biology and Technology*. 7: 119-127
- **ANDERSON, J.W.**(2001). Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*. 7: 1973-1988.
- **Anonyme (2003)**. Ministère de l'agriculture. Statistique agricole. Ministère de l'agriculture. Série A..revue p77.
- **Anosike E.O., and Ayaebene, A.O. (1982)**. Properties of polyphenol oxidase from tubers of the yam *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*. 21, 1889-1893.
- **Aoki, S., Suzuki, S. and Tamura, A. (1980)**. Internal browning of stracking delicious apple during low temperature storage. Report of the National Food Research Inst., No. 38, 56-61.
- **ARSLAN O., DOĞAN 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.
- **ARSLAN,O.,ERZENGIN,M.,SINAN,S.,& OZENSOY,O.**(2004).Purification of mulberry (*Morus alb L.*) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*,88 ,479–484.
- **ARZU,Z., COLAK,A., DINCER,B., GUNER,S.**(2004). A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki L.*, Ebenaceae). *Food Chemistry.*, 85, 431–437.
- **ASAV, E., YORGANCI, E., AKYILMAZ, E.**(2009). An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.
- **Aurand, L. W. and Woods, A. E. (1973)**. Polyphenol oxidase from BARHEE and ZAHDI dates. II. Characterization ,*Journal of Food Biochemistry*,Vol 12: 241-252.
- **AYDEMIR A.**(2014). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*) heads. *Food Chem.*, 87, 59-67.
- **Aziza B. Mustafa, David B. Harper and Donald E. Johnston,(1986)**. Biochemical changes during ripening of some Sudanese date varieties. *J. Sci. Food Agric.*,Vol 37:43-53
- **Barreveld W H. FAO. (1993)**. Agricultural Services Bulletin N° 101, Date Palm Products. FAO, Rome, 39p.
- **Belarbi A. (2001)**. Stabilisation par séchage et qualité de la datte Deglet Nour. Thèse de Doctorat de l'ENSIA, Massy.
- **Benchelah et Maka, 2006** ; Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the mcfarlin cranberry. *Journal of food science*. 35: 169.

- **Ben-Yosef et al., 2010.** The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments, *Ultrasonics Sonochemistry* 20,674–679.
- **BERTRAND G.**(1896 a).Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelque champignon. *C. R. Acad. Sc.*, 123, 463-465.
- **BERTRAND G.**, (1896 b). Sur une nouvelle oxydase ou ferment soluble oxydase d'origine végétale. *C. R. Acad. Sci.*, 122, 1215-1217.
- **Bessas A, Benmoussa L, Kerarma M. (2008).** Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien, *Mémoire d'ingénieur d'état* ., Vol 12 :4-6 .
- **Bonner, W. D. (1957)** . *Annu. Rev. Plant Physiol.* 8, 427.
- **Buckow et al., 2009 ;** Thermal inactivation of polyphenol oxidase in pineapple puree. *Lebensmittel-wissenschaft.*, 36, 492-495.
- **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, 22,459-487
- **Casañola-Martín et al. 2006** Recherche sur l'inhibition du brunissement enzymatique ; utilisation de préparations enzymatique, substitués aux sulfite. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix. Marseille III. Option : biochimie. P19. (Thèse de Doctorat).
- **Chàher et benmbàrek ., 2011** Copper proteins with dinuclear active sites. In: King, B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, II: 1159–1173.
- **CHAN, H. T AND YANG, H. Y. (1971).** Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the *myrica* cranberry. *Journal of food science*. 35: 169.
- **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.
- **Chen, J. and Flurkey, W.H. (2002).** Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current topics in phytochemistry*. Vol.5, pp.109-120.
- **CHEN Q.X., LU H.Y., ZHU C.M., LIN H.N., ZHOU H.M. (1998).** The effect of Nthiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem Mol Biol Int.*, 45, 465-73.
- **CHEN Q.X., SONG K.K., WANG Q., HUANG H., (2003).** Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.*, 15, 491–496.
- **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.
- **Cho et Ahn ,1999;** Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia*. 94 (2) : 247–259
- **Claus, H and Decker, H. (2006).** Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29:13-14.
- **CUI, Y., BARFORD, J.P., AND 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.

- **DECKER, H AND TERWILLIGER N.**(2000). Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 1777-1782.
- **Decker, H.**(2005).Copper proteins with dinuclear active sites. In: King, B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, II: 1159–1173.
- **DELLA LONGA S., ASCONE I., BIACONI A., BONFIGLI A., CASTELLANO A.C., ZARIVI O., MIRANDA M.,**(1996). The dinuclear copper site structure of *Araricus bisporus* tyrosinase in solution propped by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 271, 21025-21030
- **Devece et al., 1999.** Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem.*, 53, 776–785.
- **Dicko et al., 2002 ;** Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS).Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3518-3525.
- **Djaïd et Koudri 2015.** Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ.* 28: 83–99. during ripening of some Sudanese datevarieties. *J. Sci. Food Agric.*,37, 43-53
- **Djerbi M, (1994).** Précis de phéniculture, F.A.O, Rome, 191 p.
- **DOGAN S., TURAN Y., ERTURK H., ARSLAN O.,**(2005). Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem.*, 53, 776–785.
- **Dowson V. H. W. et Aten A. (1963).** Composition et maturation. Récolte et conditionnement des dattes. Collection FAO, Rome, Cahier n°72, 1-394.
- **Duran,N.,Esposito,E.**(2000).Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ.* 28: 83–99. during ripening of some Sudanese datevarieties. *J. Sci. Food Agric.*,37, 43-53
- **EICKEN, C., KREBS, B AND SACCHETTINI, J.C.**(1999).Catechol oxidase:structure and activity.Catalysis and regulation.Current Opinion in Structural Biology. 9: 677-683.
- **EL-BAYOUMI, M.A AND FRIEDEN, E.**(1957). A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications. 79: 4854-4858.
- **Erat et al.,2010** Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*. 65: 671-678.
- **ESPIN, J.C. AND WICHES, H.J**(1999). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS).Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3518-3525.
- **Espin,J.C.,Morales,M.,andvaron,R,**(1995).Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and di-phenolase activities of pear polyphenoloxidase. *J.FoodSci.*61(6),1177.
- **Etienne E. (2002).** Introduction à la transformation industrielle des fruits, Tec Lavoisier, Paris, New York, 147-149-150-151 p.
- **FAN, Y AND FLURKEY, W.H.**(2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*. 65: 671-678.
- **FAO 2005**
- **FERRAR P.H., WALKER J.R.L., 1993.** Microorganisms as potential source of novel diphenol oxidase inhibitors. *J. Food Biochem.*, 23, 1-15.

- **Flurkey, W. H. and Jen, J. J.(1978).** Peroxidase and polyphenol oxidase activity in developing peach. J. Food Sci. 43, 1826-1828, 1831 .
- **Frenot M et Vering E, (1997).** Biochimie des aliments, diététique des sujets bien portent, Dion, 282 p.
- **FUJITA, S., SAARI, N., MAEGAWA, M., TETSUKA, T., HAYASHI, N., & TONO, T.(1988).** Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). Journal of Agricultural Food Chemistry. 43(113)1138–1142
- **Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V. C. and Constantinides, S. M.(1981).** Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase (PPO) from a Dwarf variety of banana (*Musa caendishii*, L.). J. Food Sci. 46, 150-155.
- **GANDÍA-HERRERO, F., JIMÉNEZ-ATIÉNZAR, M., CABANES, J., GARCIA-CARMONA, F AND 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.
- **Garcia-Borrón et Solano 2002 .** Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in black berry fruits, J.Agric.FoodChem.48;5459e5464
- **Gasowska et al., 2002 ;** First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle(*Terfezia leonis* Tul.) and its thermal behavior. Eur Food Res Technol .DOI 10.1007/s00217-013-2040-8.
- **GAUILLARD, F., RICHARD FORGET, F. AND NICOLAS, J., (1993).** New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity, Anal. Biochem., 21559–65
- **Gawlik-Dziki et al. (2007).** Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. botrytis italica) florets. Food Chemistry 105 ,1047–1053.
- **Ghazi F et Teffahi M, (2007).** Mis en valeur et étude de l'utilité technologique de la fermentation de dattes « cas de la variété Hmira », mémoire d'ingénieur d'état en sciences alimentaires, Mascara, 3-6-9-21p.
- **Golbeck, K. H. and Cammarata, K. V. (1981).** Spinach thylakoid polyphenol oxidase: isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. Plant Physiol. 67, 977-984.
- **GOLDFEDER M, KANTEEV M, ADIR N, FISHMAN A (2013).** Influencing the monophenolase/diphenolase activity ratio in tyrosinase. Biochim Biophys Acta 1834:629–633
- **GONZÁLEZ E.M, EANCOS B.D., CANO M.P.(2000).** Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in black berry fruits, J.Agric.FoodChem.48;5459e5464
- **GOUZI H., CORADIN T., DELICADO E.M., ÜNAL U., BENMANSOUR A., (2010).** Inhibition Kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach Polyphenol Oxidase. *The Open Enzyme Inhibition Journal.*, 3, 1-7.
- **Gouzi H., Depagne C., BENMANSOUR, A., CORADIN T., (2013)(a).** First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle(*Terfezia leonis* Tul.) and its thermal behavior. Eur Food Res Technol .DOI 10.1007/s00217-013-2040-8.
- **Gouzi, H., Depagne, C., & Coradin, T. (2014).** Kinetics and thermodynamics of the
- **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 Engineering Vol 99 : 92–97
- **HAGHBEEN, K., SABOURY, A.A., KARBASSI, F.(2004).** Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. Biochimica et Biophysica Acta. 1675: 139-146.

- **Harel, E., Mayer, A. M. and Lerner, H. R. (1970).** Change in the level of catechol oxidase and laccase activity in developing peach. *J. Sci. Food.* 21, 542-544 .
- **Hasegawa, S. and Maier, V. P. (1980).** Polyphenol oxidase of dates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 891-893.
- Himmelwright et *al.*, 1980
- **HUANG H., LIU X. D., CHEN Q. X.(2003).** Studies on mushroom tyrosinase activity inhibited by benzaldehyde family compounds. *Journal of Xiamen University.*, 42, 97-101.
- **IKEHATA, K AND NICELL, J.A.(2000).** Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog.* 16: 533-540.
- Irwin et *al.*, 1994
- **JANOVITZ-KLAPP, A.H., RICHARD, F.C., GOUPY, P.M. AND NICOLAS, J.J. (1990).** Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1437-1441.
- **Jarrah a. Z., Benjamin N. D. (1982).** Activity of polyphenoloxylase and pectin esterase during different stages of growth and developpement. *Date.Palm.Journal.* vol. 1, n°2.
- **JOLIVET, S., ARPIN, N., WICHES, H.J., PELLON, G.(1998).** Agaricus bisporus browning: a review. *Mycol. Res.* 102 : 1459-1483
- **JOSLYN H. MARTINEZ, FRANCISCO SOLANO, RAFAEL PEI~IAFIEL, JESIJS D. GALINDO, JOSI L. IBORRA and Joé A. LOZANO.(1951).**Comparative study of tyrosinases from different sources: relationship between halide inhibition and the enzyme active site.
- **KAHN, V. AND POMERANTZ, S.H.(1985).** Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidases. *Phytochemistry* 19, 379-385
- **Kazandjian et Klibanov, 1985,** Phenolic compounds in fruit processing. C.R.C. Press, BOCA_RATON. Fruit phenolics, pp 295-322
- **Keillor, 2004,** The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658-666
- **Kharoubi H.(1995).** Essai comparatif de l'effet de deux méthodes de ciselage, avec trois dattes de deux cultivars « Deglet Nour » et « Ghars », mémoire d'ingéniorat en agronomie, I.N.F.S.A.S. Ouargla, 103 p.
- **Kidron, M., Harel, E. and Mayer, A. M. (1978).** Catechol oxidase activity in grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 29, 30-36.
- **Klabunde, T., C. Eicken, et al. (1998).** "Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center." *Nat. Struct. Biol.* 5(12): 1084-1090
- **Kumar A, T.C. Mohan K, K. Murugan .(2008).**Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.) .*journal food chemistry.*Vol 110:328-333.
- **Lerch, J. (1982) .***Biol. Chem.*, Vol(11) :257 6414.
- **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.
- **Lineweaver, H and Burk, D.(1934).** The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658-666.
- **Maatalah S, (1970).** Contribution à la valorisation de la datte algérienne, mémoire d'ingéniorat en agronomie, I.N.A.,Alger, 120 p.
- **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.

- **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.
- **Marangoni., A. G.** (2003). *Enzyme kinetics: a modern approach*. New Jersey: John Wiley & Sons (pp. 140–157).
- **Marín-Zamora et al., 2009** ; Polyphenol oxidase in plants. *Phytochem.* 18, 193-215.
- **MARQUES, L., FLEURIET, A. AND MACHEIX, J.**(1995). Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 193-200.
- **MARTINEZ V.M., WHITAKERJ.R.,**(1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, 6, 195-200
- **MATHNEY ,PB., CURTIS,JM.,HOFSTETTER,V., AIME ,MC., MONCLAVO, JM., GE, ZW., SLOY ,JC., AMMIRATI ,JF., BARONI,TJ., BOUGHER NL, HUGHES KW, LODGE DJ, KERRIGAN ,RW., SEIDL ,MT., AANEN ,DK., DENITIS, M., DANIELE ,GM., DESJARDIN ,DE., KROPP ,BR., NORVELL, LL., PARKER ,A., VELLINGA ,EC., VILGALIS, R., HIBBETT DS.**(2006) Major clades of Agaricales : a multilocus phylogenetic overview. *Myco logia.* 98 : pp 984-997.
- **MAYER A.M.,**(2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. *Phytochemistry.*, 67, 2318–233.
- **Mayer, A. M. and harel, E. H. (1979).** Polyphenol oxidase in plants. *Phytochem.* 18, 193-215.
- **Mayer, A.M.** (1987). review article number 22. polyphenol oxidases in plants–recent progress. *phytochemistry*, vol. 26, no. 1, pp. 11-20.
- **MAYER, A.M., HAREL, E AND BEN-SHAUL, R.**(1966). Assay of catechol oxidase–A critical comparaisn of methods. *Phytochemistry.* 5: 783-789.
- **MAYER,A.M.,HAREL,E.,**(1971).Polyphenol oxidases in plants .*Phytochemistry* 18,193–215.
- **MCCORD, J. D AND KILARA, A.**(1983). Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Science*, 48:1479–1483.
- **MCEVILY, A.J., IYENGAR, R. AND OTWELL, W.S.** (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32,
- **Metzler, 1977 ;**
- **Michaelis-Menten**
- **Min, K., Yoo, Y.J.**(2010). Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta.* 80: 1007-1011.
- **Mohammed N.A., Nezam deldin a.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 disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis 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):
- **Mutlak H.H. et Mann J.,**(1984). Darkening of dates: Control by microwave heating. *Date Palm Journal*, 3(1), 303-316.

- **Naish-Byfield, S and Riley, P.A.**(1992). Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.* 288: 63-67.
- **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.
- **O’Sullivan; IWATSUKI, N; URITANI, I; ALVAREZ, A.M; AND GARCIA, V.V.** (1969). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes in banana bud. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1027-1030.
- **Ouinten M.** (1995). Le palmier dattier dans le système oasien.
- **PEREZ-GILABERT M., MORTE A., G-CARMONA, F.**(2004).Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science.* 166: 365–370
- **PIFFERRI P.G., BALDASSARI L., CULTRERA R.**(1974). Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J. Sci. Food. Agric.*, 25, 263-270
- **POTUS .**(1993). Production and utilization of papain- a proteolytic enzyme from *Carcia papaya* L. *Trop. Sci.*, 25, 123-137.
- **QUEIROZ ,C., MARIA LÚCIA MENDES ,LML., FIALHO ,E., VERA LÚCIA.**(2011). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International.* 24, 361–375.
- **.Quinten M,** (1996). Diversité et structure génétique des populations algérienne de *Fusarium oxysporum* agent de la fusariose vasculaire (bayoudh) du palmier dattier, thèse de doctorat, El Harrach, 52 p.
- **RAPEANU,G.,BULANCEA,M.** (2005). thermal inactivation kinetics of polyphenoloxidase extracted from white grapes. *Acta Universitatis Cibiniensis Series e: food technology Vol. IX no.1*
- **RESCIGNO, A., SOLLAI, F., PISU, B., RINALDI, A AND SANJUST, E.**(2002). Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 17: 207-218
- **Rescigno,A;Sollai,F;Pisu,B;Rinaldi,A and Sanjuust,E.**(2002). Tyrosinase Inhibition:General and Applied Aspects.journal of Enzyme Inhibition and Mdicinal Chemistry,Vol.17,.207-218.
- **Reynes M, Bouabidi H, Piombo G, Risterucci A M.,** (1994). Caractérisation des principales variétés de dattes cultivées dans la région des Djerid en Tunisie. *Fruit,* 49,289-298 p.
- **Reynes Max.** (1997). Influence d’une technique de désinfestation par micro-ondes sur les critères de qualité phisico-chimiques de la datte. Thèse de doctorat de l’INPL.
- **Richarde, (1972).** Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. Veg., I.N.R.A.*
- **Rivas, N. J. and Whitaker, J. R.** (1973) . Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. *Plant Physiol.* 52, 501-507
- **Robb, D. A.** (1984). Tyrosinase. Copper proteins and copper enzymes. R. Lontie. Florida, CRC Press, Inc. 2: 207-240.
- **ROBERT C., ROUCH C., CADET F.**(1997). Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem.,* 59, 355-60.
- **ROBINSON, S.P., LOVEYS, B.R. AND CHACKO, E.K.** (1993). Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Aust. J. Plant Physiol.* 20, 99-107.

- **ROCHA,A.M.C.N.,CANO,M.P.,GALEAZZI,A.M.,&MORAIS,A.M.M.B.(1998).**C haracterisation of Star- king apple polyphenoloxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,77,527–534
- **Rodakiewicz-Nowak et Ito,.(2003).** Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24 (5):500-13.
- **Rodakiewicz-Nowak et Ito,.(2007).** Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 3801-3810.
- **ROS, J.R., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N AND GARCÍA-CÁNOVAS, F.(1994).** Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42.
- **Salunkhe, DK, (1990).** Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Florida: CRC press.Vol 268:4384-4397.
- **SANCHEZ-FERRER,A.,RODRIGUEZ-LOPEZ,J.N.,GARCIA CANOVAS,F.,GARCIA CARMONA,F. (1995)** .Tyrosinase:a comprehensive review of its mechanism.*Biochim.Biophys .Acta* 1247 ,1–11
- **Sapers ,G.M.(1993)** .Browning of foods :control by sulfites,antioxidantsand other means .*Food Technol.*,Vol .47,pp.75-84.
- **Sapers, G.M., and Hicks, K. B.(1983).** Inhibition of Enzymatic Browning in Fruits and vegetables. In *Quality Factors of Fruits and Vegetables: Chemistry and Technology*, ed. Jen, J.J., ACC Symp., Series 405, pp 29-43, Am. Chem. Soc. Washington, DC.
- **Sato, M. (1976).** Phenolase of spinach roots. *Phytochem.*, Vol 15, 1845-1847.
- **SEETHARAM, G.B AND SAVILLE, B.A.(2002).** Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res.* 37: 436–440.
- **SEETHARAM, G.B AND SAVILLE, B.A.(2003).** Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res.* 37: 436–440.
- **Segel, I. H. (1994).** Simple inhibition system. In I. H. Segel (Ed.),*Enzyme kinetic; behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems* (pp. 100–136).
- **SEO, S.-Y., SHARMA, V.K., SHARMA, N.,(2003).** Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.
- **SHAN, D., MOUSTY, C., AND COSNIER, S.(2004).**Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183.
- **Siegbahn,.(2003).** Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry* 42 (6):943-950.
- **SMITH, J.L AND KRUEGER, R.C.(1962).** Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *The Journal of Biological Chemistry.* 237: 1121-1128.
- **SMITH,S.E.,READ,D.J.,(2008).***MycorrhizalSymbiosis*.3rdedn.AcademicPress,London.
- **SMOLENSKY, M.M., NUÑEZ-DELICADO, E., GARCIA-CARMONA, F., AND SANCHEZ-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
- **Solomon , PATTAMA PRATHAAN, RACHA TEPSORN.(1992).**Browning inhibition in fresh-cut rose apple fruit cv. Taaptimjaan using konjac.glucomannan coating incorporated with pineapple fruit extract.*Postharvest Biology and Technology* 73 (2012) 46–49.

- **Solomon , PATTAMA PRATHAAN, RACHA TEPSON.**(1996).Browning inhibition in fresh-cut rose apple fruit cv. Taaptimjaan using konjac.glucomannan coating incorporated with pineapple fruit extract.Postharvest Biology and Technology 73 (2012) 46–49
- **SON S.M., MOON K.D., LEE C.Y.**(2000). Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. J. Agric. Food Chem., 48, 2071–4.
- **Soysal, C., et Soylemez, Z. (2008).** Properties of wheat bran polyphenol oxidase. Nahrung/Food, 48, 5–8.
- **Strothkamp, K. G., R. L. Jolley, et al. (1976).** "Quaternary structure of mushroom tyrosinase." Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol 70: 519-524.
- **Sugumaran, M. (1998).** Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. Adv. Insect Physiol. 27, 229-334
- **TAN, Y., GUO, X., ZHANG, J., KAN, J.**(2010). Amperometric catechol biosensor based on polyaniline–polyphenol oxidase. Biosensors and Bioelectronics. 25: 1681–1687.
- **Tate, J. N., Luh, B. S. and York, G. K.(1964).** Polyphenol oxidase in Bartlett pears. J. Food Sci. Vol 29: 829-836.
- **Taverso- Rueda et Singleton, 1973 ;** Potential of oxidized phenolic as food colorants. Food Chemistry .,Vol 24 :301-313
thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from Agaricus
- **TEREFE CHEVALIER,DAVID DE RIGAL,DIDIER MBEGUIE-A-MBEGUIE,FREDERIC GAUILLARD FLORENCE RICHARD-FORGETAND ,BERNARD R. FILS-LYCAON.**(2009).Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol Oxidase ,Plant Physiology,vol. 119 no. 4 1261-1270.
- **Tomas-Barberà et Granata.(2005).** Radiation preservation of food of plant origin, Part 1. Potatoes and other tuber crops. Crit. Rev. Food Sci.Nutr., 19., 327-379.
- **Trebst et Depka. (1995).** Catecholase activity in grape juice and its implication in wine making.. Vol 24: 103-109.
- **TULIN, et Gulay. (2006).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *heads Food Chemistry* 87:59–67.
- **Tuncagil, URSZULA Z., MICHAL W.**(2007). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.) Food Chem., 8, 20-704
- **Turner, E.M.**(1974). Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*.Transactions of the British Mycological Society. 63: 541-547
- **VÁMOS-VIGYÁZO, 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. AND WICHERS, H.J.**(1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. Phyto-chemistry 45, 1309- 1323.
- **VAN LEEUWEN J AND WICHERS H.J.**(1999). Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. Mycol Res. 103: 413–418.
- **VAROQUAUX.,P** (1978).Contribution a l'étude des propriétés de m'o-diphenoloxydase du champignon de paris (*Agaricus bisporus*). Thèse de doct., faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'université de Dijon, 131p.
- **WEEMAES C.A.,LUDIKHUYZE L.R, VANDENBROECK I,HENDRICKS M.E.,P.P.TOBBACK.**(1998).Activity ,electrophoretic characteristics and heat

- inactivation of polyphenol oxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums, *Lebensm. Wiss. Technol.* 31 : 440-449.
- **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.
 - **Wichers, H.J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C.F.M., Biancone, G., Hoebrechts, F.A., (1996).** Cloning, expression and characterization of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 336–341
 - **Wisseman, K. W. and Lee, C. Y. (1980).** Polyphenol oxidase activity during grape maturation and wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol 31: 206-311.
 - **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.
 - **Yahiaoui K., (2000).** Caractérisation physicochimique et évaluation du brunissement de la datte «Deglet-Nour» au cours de la maturation. Mémoire de magister en sciences alimentaires. Institut national agronomique d'El-Harrach, Alger.
 - **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
 - **Yemenicioğlu et Cemeroglu. (2003).** Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2732-2735
 - **Yemenicioğlu, (2002).** Some properties of polyphenol oxidase from lily. *International Journal of Food Science and Technology* 43: 102-107.
 - **YEMENICIOGOLU, A., ZKAN, M., AND CEMEROGOLU, B. (1997).** Heat inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase and activation of its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510
 - **ZAID, (2002).** Truffles thio- flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters.* 220: 18-88.
 - **ZAWISTOWSKI, J., BILIADERIS, C.G., AND ESKIN, N.A.M. (1991).** Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, UK: Elsevier Applied Science). 217-273.

ملخص

كان الهدف من هذا العمل دراسة تأثير وحركية تثبيط نشاط الإنزيم المسؤول على عملية التشوه الإنزيمي الكريسولاز لبوليفينول اوكسيداز لدقلة نور (*Phoenix dactylifera* L) بواسطة حمض البنزويك وحمض اوكساليك كمثبطات. تم قياس نشاط انزيم PPO بواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي على طول موجة 410 نانومتر و عند درجة الحموضة 5.6 و 30 درجة م°، في وجود الكاتيكول باعتبارها الركيز.

نشاط الكريسولاز يثبط بـ حمض البنزويك وحمض اوكساليك بقوة بالرغم أن التراكيز ضعيفة. قيمة IC_{50} لحمض حمض البنزويك تقدر بـ : 0.19 و حمض اوكساليك تقدر بـ 1.29

أظهرت بيانات Linerweaver-Burk أن حمض البنزويك هو مثبط قادر على منافسة نشاط الكريسولاز وحمض اوكساليك مثبط غير تنافسي. حمض البنزويك وحمض اوكساليك هو مركبات كيميائية طبيعية يمكن إستعمالها من أجل مراقبة التشوه الإنزيمي لدقلة نور أثناء تخزينها و تحويلها.

الكلمات المفتاحية : دقلة نور، التشوه الإنزيمي ، تثبيط ، حمض البنزويك ، وحمض اوكساليك، لبوليفينول اوكسيداز كاتيكول.

Résumé

Ce travail avait pour l'objectif d'étudier l'effet et le mécanisme d'inhibition de l'activité de l'enzyme responsable du brunissement enzymatique (PPO) dans les dattes *Phoenix dactylifera* L par l'acide benzoïque et l'acide oxalique comme inhibiteur. L'activité de PPO est mesurée par le spectrophotomètre à 410 nm à pH 5.0 et à 30 °C en présence de catéchol comme substrat.

L'activité de PPO est fortement inhibée par l'acide benzoïque et l'acide oxalique à des faibles concentrations.

La valeur d' IC_{50} d'acide benzoïque est 0.19 et pour l'acide oxalique est 1.29 la représentation de Lineweaver-Burk obtenue indique que l'acide oxalique est un inhibiteur compétitif et l'acide benzoïque est un inhibiteur non compétitif. L'acide benzoïque et l'acide oxalique et un composé chimique naturel peut être utilisé pour le contrôle des brunissements enzymatiques ou lors du stockage et de transformation.

Mots clés: dattes, *Phoenix dactylifera* L, Poly phénol oxydase, acide benzoïque, acide oxalique, Inhibition, catéchol, Brunissement enzymatique.

ABSTRACT

This work was for the purpose of investigating the effect and the enzyme activity of inhibiting mechanism responsible for the enzymatic browning (PPO) in dates *Phoenix dactylifera* L of benzoic acid and oxalic acid as an inhibitor.

The PPO activity is measured by the spectrophotometer at 410 nm at pH 5.0 and at 30 °C in the presence of catecho substrate.

The PPO activity is strongly inhibited by benzoic acid and oxalic acid at low concentrations.

There value of IC_{50} of benzoic acid is 0.19 and for oxalic acid is 1.29 the representation obtained indicates that competitive inhibitor and oxalic acid and oxalic acid and a non-competitive inhibitor. Benzoic acid and oxalic acid and a natural chemical compound can be used for the control of enzymatic browning or storage and processing.

Keywords: dates, *Phoenix dactylifera* L, poly phenoloxidase, benzoic acid, oxalic acid, Inhibition, catechol, enzymatic browning.