



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



## **Université Amar Thelidji- Laghouat**

**FACULTE: Sciences**

**DEPARTEMENT: Biologie**

### **MEMOIRE DE MASTER**

**Présenté par : M<sup>lle</sup> DJAID Friha**

**M<sup>lle</sup> KOUADRI Rabab**

**DOMAINE : Science de la nature et de la vie**

**FILIERE : Biologie**

**OPTION : Biochimie des Produits Naturels**

### **Thème**

**Etude cinétique de l'inhibition de tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul*) par l'acide benzoïque**

#### **Jury de soutenance :**

<b>Nom et Prénom</b>	<b>Grade</b>	<b>qualité</b>
Ghermaoui Mohammed	Maitre-Assistant Classe A	Président
Benaceur Farouk	Maitre-Assistant Classe A	Examineur1
M. Gouzi Hicham	Maitre-Assistant Classe A	Rapporteur
M. Leboukh Mourad	Maitre de conférences Classe A	Co-Rapporteur

**Promotion : juin – 20**

## TABLE DES MATIERES

Introduction générale .....	1
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographie</b>	
1. Tyrosinase.....	3
1.1. Historique et perspectives sur la tyrosinase.....	3
1.2. Définition.....	3
1.3. Nomenclature.....	3
1.4. Classification .....	4
1.5. Caractéristiques réactionnelles et structurales de la tyrosinase.....	5
1.5.1. Caractéristiques réactionnelles.....	5
1.5.1.1. Activité monophenoloxydase (EC 1 .14.18.1).....	5
1.5.1.2. Activité O-diphenoloxydase (EC 1 .10.3.1).....	5
1.5.2. Caractéristiques structurales.....	6
1.5.2.1 Architecture moléculaire globale.....	6
1.5.2.2 Le site actif .....	7
1.6. Source, localisation et rôle des tyrosinases.....	8
1.6.1. Source des tyrosinases.....	8
1.6.2. Localisation des tyrosinases.....	9
1.6.3. Rôle des tyrosinases.....	9
1.7. Les applications de la tyrosinase.....	10
2. Brunissement enzymatique .....	11
2.1. Définition .....	11
2.2 Contrôle chimique du brunissement enzymatique .....	11
2.4.1 Inhibiteurs agissant sur les substrats de la tyrosinase.....	12
2.4.2 Traitements chimiques agissant sur l'enzyme. ....	13
2.4.2.1 Composés chélateurs d'ions métalliques.....	13
2.4.2.2 Les agents acidifiants. ....	16
2.4.2.3 Inhibiteurs agissant sur le site de fixation du substrat phénolique.....	16
2.4.2.4 Inhibiteurs agissant sur des sites autres que le site de fixation du substrat phénolique.....	18
2.4.3 Traitements chimiques agissant sur les produits de l'oxydation.....	20
<b>Chapitre 2. Matériels et méthodes</b>	
1. Matériels.....	23
1.1 Matériel biologique.....	23

1.2 Produits chimiques .....	23
2. Méthodes .....	23
2.1. Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase .....	23
2.2. Mesure de l'activité tyrosinase .....	24
2.3. Détermination des valeurs d'IC <sub>50</sub> .....	25
2.4. Détermination du mécanisme d'inhibition de la tyrosinase par l'acide benzoïque.....	25
2.5. Analyse des résultats expérimentaux .....	25
<b>Chapitre 3. Résultats et discussion</b>	
3.1. Détermination de valeur d'IC <sub>50</sub> de l'effet de l'acide benzoïque sur l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe.....	26
3.2. Inhibition mixte type I de l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe par l'acide benzoïque.....	27
<b>Conclusion .....</b>	<b>30</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>31</b>

## *Remercîments*

Nous remercions Dieu De nous avoir accordé des connaissances de la science et de nous avoir aidées à réaliser ce travail.

Au terme de ce modeste travail nous tenons à remercier chaleureusement et respectivement tous ceux qu'ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce modeste projet de fin d'étude, à savoir nos Encadreurs Mr GOUZI HICHAM et Co-encadreur Mr. LABOUKH Mourad

*Sans oublier de remercier Mr. Mustafa HADJOUJJA, chef de laboratoire de biologie de l'Université Amar Telidji de Laghouat, et les ingénieurs de laboratoire pour leur gentillesse et leur aide inestimable.*

*Enfin, nous adressons nos remerciements aux membres du jury qui ont acceptés d'examiner notre travail. Nous tenons à remercier tous les enseignants qui nous ont suivis durant notre formation.*

Ce travail fut difficile mais très bénéfique à tout point de vue.

Merci à tous

**RABAB.FRIHA**

## *Dédicace*

*Je voudrais dédier cet humble travail à mes très chers parents qui nous a quittés à jamais, Qui ont veillé à ce que je sois ce que je suis devenu maintenant.*

*A mes beaux frères Ismaïl et Louai.*

*A mes belles sœurs ainsi que ma chère Ikhlâs.*

*A mes chers grands parents*

*A ma chère tante et mes oncles.*

*A mon binôme Friha.*

*A tout mes amis*

*Merci à tous*

*Rabab*

## *Dédicace*

*Je voudrais dédie ce modeste travail, a ma chère  
maman et mon cher père qui m'ont tant soutenu et  
encouragé dans tout les domaines*

*À toute ma famille Djaid*

*A mes frères : Abderrahmane, Mohammed,  
Mahmoud, Nassim, Taher*

*A mes sœurs: kheira, abir, Lina. soad, fatiha,  
mebarka, saedia*

*A mon binôme Rabab.*

*A tout mes amis*

Et A tous mes collègues de la promotion 2015

*Merci*

*Friha*

## ملخص

كان الهدف من هذا العمل دراسة آلية تثبيط نشاط الكريسولاز لتيروسيناز الكمأة المسؤول عن التثوه الإنزيمي بواسطة حمض البنزويك كمثبط. كما توبع قياس نشاط الكريسولاز بواسطة جهاز المطياف الضوئي على طول موجة 475 نانومتر ودرجة حموضة 5.0 ، و 30°م وهذا باستخدام التيروسين كدعامة.

نشاط الكريسولاز يثبط بقوة بواسطة حمض البنزويك بالرغم من أن التراكيز ضعيفة. قيمة  $IC_{50}$  لحمض البنزويك تقدر ب (2,82 ميليومول).

أظهرت بيانات Lineweaver-Burk التي تم الحصول عليها أن حمض البنزويك هو مثبط مختلط من النوع الأول على نشاط الكريسولاز لتيروسيناز الكمأة مع قيمة ثابت التثبيط تساوي 0,20 ميليومول و 0,96 على الترتيب. نوع التثبيط يعتمد على طبيعة المادة الفعالة المستعملة و على مصدر الحصول على الإنزيم.

حمض البنزويك هو مركب كيميائي طبيعي يمكن استعماله من أجل مراقبة التثوه الإنزيمي للكمأة أثناء تخزينها و تحويلها.

**الكلمات المفتاحية:** الكمأة، التثوه الإنزيمي، تيروزيناز، كريسولاز، تثبيط، مثبط، حمض البنزويك.

## RESUME

Ce travail avait pour objectif d'étudier le mécanisme d'inhibition de l'activité crésolase de la tyrosinase responsable du brunissement enzymatique de la truffe *Terfezia leonis Tul.* par l'acide benzoïque comme inhibiteur. L'activité crésolase a été mesurée par spectrophotométrie à 475 nm, à pH 5.0 et à 30°C, en présence de la L-tyrosine comme substrat.

L'activité crésolase est fortement inhibée par l'acide benzoïque à de faible concentration. La valeur d' $IC_{50}$  est estimée à 2,82 mM. La représentation de Lineweaver-Burk obtenue indique que l'acide benzoïque est un inhibiteur mixte de type-I de l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe avec des constantes d'inhibitions  $K_I$  et de  $K_{IS}$  de 0.20 et 0.96 mM respectivement.

L'acide benzoïque est un composé chimique naturel peut être utilisé pour le contrôle du brunissement enzymatique des truffes au cours de leur stockage ou de lors de leur transformations.

**Mots-clés :** Truffe, brunissement enzymatique, Tyrosinase, Crésolase, Acide benzoïque, Inhibition, Inhibiteur.

## ABSTRACT

This work was aimed to study the inhibition mechanism of cresolase activity of tyrosinase responsible of the enzymatic browning of truffle *Terfezia leonis*, by benzoic acid as inhibitor.

Cresolase activity was measured at 475 nm by UV-Vis spectrophotometer at pH 5.0 and 30°C, using L-tyrosine as substrate.

The cresolase activity was greatly inhibited at low benzoic acid concentration. The  $IC_{50}$  value was estimated to be 2, 82 mM. The Lineweaver-Burk representation show that benzoic acid act as mixed type-I inhibitor on the cresolase activity of the truffle tyrosinase with inhibitors constants  $K_I$  and  $K_{IS}$  of 0.20 and 0.96 mM respectively.

Benzoic acid is a natural compound without a side effect, can be used efficiently for controlling enzymatic browning of truffles during their storage or processing.

**Key words:** Truffle, Enzymatic Browning, tyrosinase, cresolase, benzoic acid, Inhibition, Inhibitor.

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Schéma des réactions catalysées par la tyrosinase; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées	<b>5</b>
<b>02</b>	Structure cristallographique des sites catalytiques de type binucléaire de cuivre de deux tyrosinases	<b>8</b>
<b>03</b>	Structure de quelques composés chélateurs de métaux	<b>14</b>
<b>04</b>	Structure de quelques composés agissant au niveau du site actif des tyrosinases	<b>17</b>
<b>05</b>	Structure de quelques aldéhydes inhibant les tyrosinases	<b>18</b>
<b>06</b>	Structure de la liaison formée entre le groupement aldéhyde d'un inhibiteur et un groupement aminé porté par l'enzyme.	<b>18</b>
<b>07</b>	Structure de quelques inhibiteurs chimique agissant sur les produits de l'oxydation des diphénols par les tyrosinases	<b>20</b>
<b>08</b>	La truffe ( <i>Terfezia leonis Tul</i> ) (Wilaya de Tiaret)	<b>23</b>
<b>09</b>	Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine par l'extrait brut de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i>	<b>24</b>
<b>10</b>	Effet de la concentration de l'acide benzoïque sur l'oxydation de L-tyrosine de <i>Terfezia leonis</i>	<b>26</b>
<b>11</b>	Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis Tul.</i> ) sur le L-tyrosine par l'acide benzoïque	<b>28</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Inhibiteurs du brunissement enzymatique	12
<b>02</b>	Les valeurs d'IC <sub>50</sub> de l'effet de l'acide benzoïque sur l'activité tyrosinase	27
<b>03</b>	L'inhibiteur acide benzoïque, K <sub>I</sub> , K <sub>m</sub> , et V <sub>max</sub> de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> avec la L-tyrosine comme substrat	29

## Liste des abréviations

$\text{Cu}^+$ : les ions cuivreux  
 $\text{Cu}^{2+}$ : cuivre  
DOPA: dihydroxyphenylalanine  
EC: enzyme commission  
EDTA: Acide éthylène diamine tétracétique  
EI: Enzyme –Inhibiteur  
ESI: Enzyme-Substrat-Inhibiteur  
FAO: *Food and Agriculture Organization*  
GRAS: *Generally Recognized As Safe*  
 $\text{HSO}_3^-$ : bisulfite  
[I]: concentration d'inhibiteur  
IC: Concentration inhibitrice  
IUB: Union Internationale de Biochimie  
JECFA: *Joint Expert Committee on Food Additives*  
 $K_I$ : constante de dissociation du complexe EI  
 $K_{IS}$ : constante de dissociation du complexe ESI  
MBT: 2-mercaptobenzothiazole  
NaCl: Le chlorure de sodium  
PVPP: polyvinylpolypyrrolidone  
 $R^2$ : Coefficient de corrélation  
SDS: le sodiumdodécyl sulfate  
SHAM: Acide salicylhydroxamique  
SO<sub>2</sub>: Sulfiteéquivalent dioxyde de soufre  
 $\text{SO}_3^{2-}$ : Les ions sulfites  
Tr : tour  
UV:ultraviolet  
WHO: *World Health Organization*

# *Introduction*

La truffe du désert (*Terfezia leonis Tul.*), localement appelée 'Terfez' dans le sud Algérien constitue la majeure partie des champignons consommés dans le sud Algérien (Gouzi et al., 2013). Ce champignon est une source alimentaire très appréciée pour ses propriétés médicinales et organoléptiques ainsi que pour sa richesse en protéines, en fibres, en lipides, en vitamines, en sels minéraux et en polyphénols (Janakat et al. 2004 ; Al-Laith. 2010 ; Gouzi et al. 2013). Par rapport à la plupart des fruits et légumes, les champignons ont une durée de conservation très courte. Ils perdent leurs valeurs commerciale et nutritionnelle en quelques jours en raison de la sénescence, la perte d'eau, l'attaque microbienne et le brunissement (Whitaker et Lee. 1995 ; Jolivet et al. 1998).

Le brunissement est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréables des truffes (Gouzi et al. 2013).

Ce phénomène biochimique apparaît notamment après un choc, une découpe, un broyage, une réfrigération ou lors d'une congélation-décongélation consécutives de ces produits. Par conséquent, le brunissement enzymatique constitue un obstacle majeur pour la conservation des espèces animales ou végétales très sensibles en particulier : la pomme, la poire, la pêche, la banane, la pomme de terre, le champignon, l'avocat, les crevettes, ainsi que leurs dérivés (Pascal et al. 2006).

La prévention de cette réaction constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires (Matheis. 1987). Le brunissement résulte de l'oxydation des phénols-tyrosine, dopamine,  $\gamma$ -glutaminyl-4-hydroxybenzène et  $\gamma$ -glutaminyl-3,4-dihydroxybenzène-catalysée principalement par la tyrosinase (monophénol, *o*-diphénol: oxygène oxydoréductase; EC 1. 14. 18. 1). La tyrosinase est une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (Martinez et Whitaker. 1995 ; Mayer et Harel. 1979 ; David. 2001) et (Vámos-Vigyázó. 1981). En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme présente deux activités différentes. Elle est tout d'abord capable d'hydroxyler les monophénols en *o*-diphénols, activité dite crésolase ou monophénolase. Ces *o*-diphénols, sont à leur tour oxydés pour donner des *o*-quinones, activité dite catécholase ou *o*-diphénolase. Ces derniers se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir regroupé sous le terme générique de mélanine (Varoquaux. 1978 ; Arslan et Doğan. 2005).

L'inactivation de la tyrosinase par quelques inhibiteurs est une méthode de contrôle la plus efficace pour la prévention du brunissement enzymatique des truffes (MCevily et al. 1992; Sapers. 1993 ; Queiroz et al. 2008).

L'acide benzoïque est un acide organique que l'on trouve naturellement dans certaines plantes. L'acide benzoïque est essentiellement utilisé comme conservateur et comme additif alimentaire vu qu'il inhibe la croissance des levures et de certaines bactéries (Pierrick H. 2014). L'acide benzoïque est l'un des inhibiteurs des réactions d'oxydation les plus largement utilisés en technologie alimentaire (Valero et al. 1992).

De nombres recherches ont été consacré à l'étude de l'inhibition de l'acide benzoïque sur les tyrosinases obtenues à partir de diverses sources, tandis qu'aucune information n'est disponible sur l'inhibition de la tyrosinase de *Terfezia leonis Tul* par ce composé chimique (Gouzi et al. 2013).

Notre travail sera donc consacré à étudier l'effet de l'acide benzoïque sur l'activité crésolase de la tyrosinase de la truffe *Terfezia leonis Tul* en utilisant la L-tyrosine comme substrat. Tout d'abord, on essayera de déterminer la valeur  $IC_{50}$  de cet inhibiteur et de déterminer le mécanisme cinétique d'inhibition.

Ce mémoire a été organisé en différents chapitres décrivant les étapes successives de cette étude.

Le premier chapitre concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur la tyrosinase et sur le contrôle du brunissement enzymatique par les inhibiteurs chimiques de la tyrosinase. Dans un deuxième chapitre, nous décrirons les procédures expérimentales mises en jeu dans cette étude. Le troisième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux obtenus. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la tyrosinase de la truffe, sont regroupées dans le dernier chapitre.

# *Synthèse bibliographique*

## 1. Tyrosinase

### 1.1. Historique et perspectives sur la tyrosinase

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

Le tyrosinase a été préparée pour la première fois simultanément par Kubowitz (1938) à partir des pommes de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir d'*Agaricus bisporus* et partiellement purifiée par précipitation. C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, K. 1981).

Depuis sa découverte, elle a fait l'objet de plusieurs sujets de recherches intensifs. Ces recherches ont porté 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, Jr W.D. 1956).

### 1.2. Définition

La tyrosinase est une enzyme de type monooxygénase contenant du cuivre, et est largement distribuée dans la nature que ce soit chez les champignons, les plantes supérieures ou les animaux. Elle catalyse la conversion de la tyrosine en DOPA puis la conversion ultérieure en mélanine. L'inhibition de la tyrosinase est utilisée comme agent blanchissant et antihyperpigmentation parce qu'il présente une capacité à supprimer la production dermique de mélanine. Une de ses principales utilisations pratique est la réduction des taches brunes (Morin, E. 2008).

### 1.3. Nomenclature:

L'union Internationale de biochimie avait donné aux enzymes des noms systématiques fondés sur le type de réaction qu'elles catalysent et sur la spécificité de leurs substrats.

L'*o*-diphénoloxydase qui appartient au groupe des oxydoréductases a été définie par Dixon et Webb (1964) comme l'*o*-diphénol : oxygène, oxydoréductase (E.C.1.10.3.1.).

Plusieurs noms ont été associés à la tyrosinase, dont le polyphénol oxydase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, le phénol oxydase, l'*o*-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase.

De ces derniers, c'est la tyrosinase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des *o*-quinones dans les deux cas. Les noms « tyrosinase », « phénol oxydase » et « polyphénolase » sont aussi généralement employés avec « le polyphénol oxydase » (Burton. 1994).

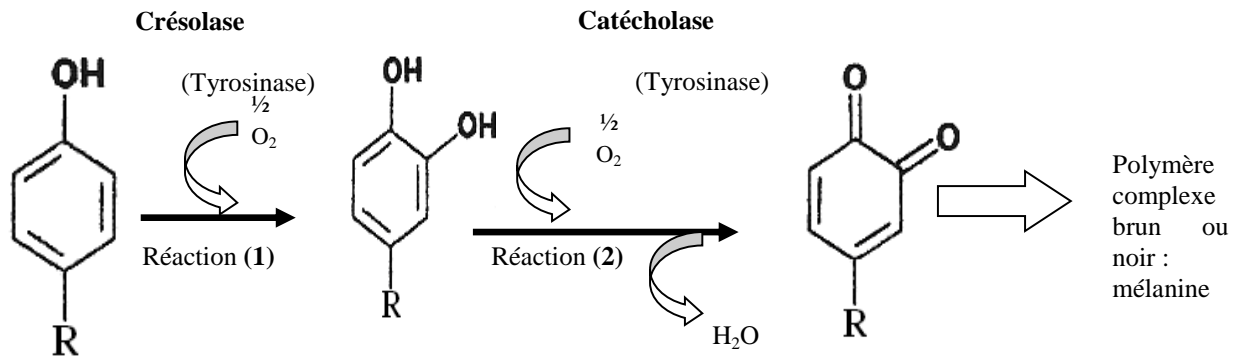
#### 1.4. Classification :

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

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB) a placé la tyrosinase dans deux catégories principales comme (EC 1.14.18.1) monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase et (EC 1.10.3.2) *o*-diphénol : O<sub>2</sub> oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Zawistowski *et al.* 1991).

De nos jours, on accepte généralement que la tyrosinase (monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine : oxygène oxydoréductase ; (EC 1.14.18.1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions bien distinctes en présence d'oxygène moléculaire, à savoir [réaction (1)] l'ortho-hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (catéchols) (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des *o*-diphénols [réaction (2)] en *o*-quinones, activité fréquemment désignées sous le nom de polyphénol oxydase, *o*-diphénol oxydase, catéchol oxydase ou activité catécholase (Granata *et al.* 2005).

Les *o*-quinones sont des composés fortement réactifs et peuvent subir spontanément en solution aqueuse soit 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.* 2003). (Figure 1)



**Figure 1:** Schéma des réactions catalysées par la tyrosinase; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Van Gelder et *al.* 1997).

## 1.5. Caractéristiques réactionnelles et structurales de la tyrosinase

### 1.5.1. Caractéristiques réactionnelles

Le groupe des polyphénols oxydases comprend essentiellement deux types d'enzymes : l'*o*-diphénol oxydase (catéchol oxydase, tyrosinase, phénolase, polyphénol oxydase) et la *p*-diphénoloxydase ou laccase. Les deux types d'enzymes sont phénol-oxygène oxydoréductases (Mayer et Harel. 1991).

#### 1.5.1.1. Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénols oxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o* diphénols. Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénol oxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons (Varoquaux. 1978), et un peu plus récemment dans la pomme (Nicolas et *al.* 1994).

#### 1.5.1.2. Activité *O*-diphénoloxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase. Cette dernière a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanoïdines (Cheriot. 2007), soit réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés (Dicko et *al.* 2002).

Les préparations enzymatiques de la tyrosinase obtenues à partir de plusieurs espèces possèdent l'activité crésolase et/ou catécholase (Burton. 1994).

## 1.5.2. Caractéristiques structurales

### 1.5.2.1. Architecture moléculaire globale

La structure cristallographique de la tyrosinase n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la tyrosinase, 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). 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 (Himmel wright 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 tyrosinase, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices  $\alpha$  et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des tyrosinases, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques.

Une autre caractéristique du site actif des tyrosinases, 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 (*Ipomea batatas*) (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 tyrosinase de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active, a été résolue (Kiabunde et *al.*1998).

La tyrosinase native du champignon de couche *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<sub>2</sub>L<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>L<sub>2</sub>. Alors que la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en

sous-unités L2H. Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la tyrosinase des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (Fan et Flurkey. 2004).

Selon Wichers et *al.* (1996), les sous-unités isolées H et L ne posséderaient aucune activité enzymatique. Les tyrosinases 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 tyrosinase d'*A. bisporus*, la sous-unité H qui est responsable des activités catalytiques, peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (Jolivet et *al.*, 1998).

Dans beaucoup de cas, les tyrosinases des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentes sous des formes multiples d'isoenzyme (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.

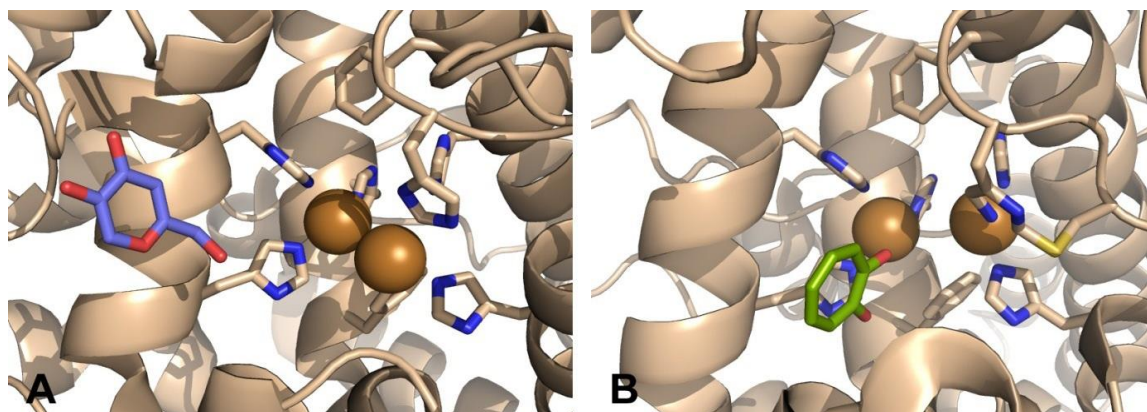
### 1.5.2.2 Le site actif

Au niveau de son site actif, la tyrosinase contient un ion de cuivre. Une molécule de tyrosinase peut contenir deux atomes de cuivre et chaque atome de cuivre se lie à trois histidines qui sont indispensables à l'activation de la réaction (David *et al.* 2011).

La tyrosinase possède un site catalytique de type binucléaire de cuivre, ainsi de plusieurs formes (notamment *oxy*:  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2^{\text{2-}}\text{-Cu}^{\text{II}}$ , *deoxy*:  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{ Cu}^{\text{I}}$ , et *met*:  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OH-Cu}^{\text{II}}$ ), sur une tyrosinase recombinante provenant de la bactérie *Streptomyces castaneoglo bisporus* accompagnée d'une protéine caddie. Une telle structure du site actif avait déjà été proposée grâce à des données spectroscopiques comme étant un analogue structural de celui des autres enzymes à cuivre de type 3 et notamment des catéchol oxydases et des hémocyanines. Néanmoins, la cristallisation de la tyrosinase était rendue particulièrement difficile par la présence d'une région transmembranaire et d'une extrémité glycosylée.

Le centre catalytique de la tyrosinase contient deux atomes de cuivre, nommés CuA et CuB. Les deux sphères de coordination associées comprennent au total six acides aminés de type histidine, qui est directement engagés dans des liaisons azote – cuivre strictement nécessaires à l'activité de la tyrosinase, ces histidines sont conservées dans les hémocyanines et les catéchol oxydases au niveau de la région CuB.

Il semble en revanche que la région CuA soit sensiblement différente aux niveaux stérique et électronique dans certaines hémocyanines et catéchol oxydases, expliquant notamment les différences d'accessibilité et de nature des substrats naturels de ces enzymes. Une concentration importante de résidus hydrophobes à proximité du centre catalytique forme une poche qui permet de fixer le substrat de la tyrosinase (Haudecoeur.2011).



**Figure 2.** Structure cristallographique des sites catalytiques de type binucléaire de cuivre de deux tyrosinases, respectivement isolées de *Bacillus megaterium* (bactérie, oxydée, A) et d'*Agaricus bisporus* (champignon, réduite, B). Les enzymes sont Co-cristallisées avec des inhibiteurs connus : l'acide kojique (A) et la tropolone (B) (Haudecoeur. 2011).

## 1.6. Source, localisation et rôle des tyrosinases

### 1.6.1 Source des tyrosinases

La tyrosinase est largement distribuée dans la nature. Elle se trouve dans une grande variété d'organismes vivants y compris les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être rencontrée chez les mycètes (Claus et Decker. 2006).

Un certain nombre de microorganismes peuvent produire la tyrosinase (Burton. 1994). Les premières tyrosinases bactériennes ont été purifiées à partir des extraits cellulaires de *Streptomyces nigrefaciens* et *Streptomyces glaucescens*.

Le champignon commun coloré en blanc (*Agaricus bisporus*) est généralement reconnu comme étant la source naturelle majeure de la tyrosinase (Beelman et al. 1996). La tyrosinase est présente dans la tige, la peau du chapeau, et la chair du chapeau (3). Cette enzyme a été utilisée dans la majorité des études biocatalytiques, puisqu'elle est aisément obtenue en quantité relativement grande (Burton. 1994).

Les meilleures préparations caractérisées sont issues de *Streptomyces glaucescens* et de *Neurospora crassa* et d'*Agaricus bisporus* (Solomon et al. 1996).

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux tyrosinases de diverses sources comme: les truffes (Perez-Gilabert et al. 2001; Zarivi et al. 2003), les champignons (Gouzi et Benmansour. 2007), la banane (Ôba et al. 1992 ; Sojo et al. 1998), les tubercules de pomme de terre (Cho et Ahn. 1999a,b; Marri et al. 2003), les épinards (Golbeck et Cammarata. 1981), l'artichaut (Ziyan et Pekyardimci. 2003), la poire (Ziyan et Pekyardimci. 2004), le coing

(Yağar et Sağıroğlu. 2002), la pêche (Wong et al. 1971), l'abricot (Chevalier et al. 1999), les feuilles de tabac (Shi et al. 2001) et le cerise (Kumar et al. 2008).

### 1.6.2 Localisation des tyrosinases

Les tyrosinases sont localisées au niveau des membranes plastidiales (chloroplastes pour les feuilles et les fruits, amyloplastés ou leucoplastés dans les parenchymes de réserve (tubercule de pomme de terre ou racines de carottes) (Steffens et al. 1994). Plus précisément, des études ultrastructurales associées à la cytochimie et à l'immunohistochimie ont montré que les tyrosinases sont liées aux membranes des thylakoides. Des fractions solubles et liées de la tyrosinase ont fréquemment été décrites et il est souvent nécessaire d'utiliser un détergent pour extraire la totalité de l'activité associée aux membranes. L'état physiologique des organes semble avoir un impact sur le degré des liaisons membranes des tyrosinases, en particulier la maturation et la sénescence sont associées à une solubilisation plus facile de l'enzyme (Dry et al. 1994).

### 1.6.3 Rôle des tyrosinases

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

En support à cette hypothèse, Lax et Vaughn. (1991) ont montré que la tyrosinase était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*).

Dans les plantes, la tyrosinase joue également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker. 1995).

La tyrosinase catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkerage. 1986), et se polymérisent ensuite, pour former des polymères bruns insolubles, ces derniers forment une barrière, qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante, grâce à leurs propriétés antimicrobiennes (Zawistowski et al. 1991). Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les tyrosinases sont cependant largement controversés (Mayer et Harel. 1991; Walker et Ferrar. 1995) et plusieurs hypothèses sont émises. La tyrosinase est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Whitaker. 1995; Fenoll et al. 2004).

Chez les insectes, la tyrosinase est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine (Steffens et al., 1998). Elle participe également dans la biosynthèse des composés phénolique

(Zawistowski et *al.* 1991). La tyrosinase est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé (Whitaker et Lee. 1995). L'activité tyrosinase joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer et Harel. 1991). Elle est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé (Whitaker et Lee. 1995). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Zawistowski et *al.* 1991).

### **1.7 Les applications de la tyrosinase**

La tyrosinase est la base de nombreuses applications industrielles. Dans les technologies de l'environnement pour la détoxification des eaux usées et sols contaminés contenant les phénols (Claus et Decker. 2006). Dans les industries pharmaceutiques pour la production des o-diphénols (par exemple, la L-dopa, dopamine pour le traitement de la maladie de Parkinson).

Dans les produits industriels cosmétiques ou alimentaires, pour des réactions de brunissement oxydatif (Mayer et Harel. 1978), comme échangeur de cations, et support pour les médicaments, les antioxydants, les agents antiviraux et immunogènes (Nosanchuk et Casadevall. 2003). Par ailleurs, la tyrosinase ayant un potentiel de biocapteurs elle est à l'origine de nombreuses applications, principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (Njagi et *al.* 2010) et le suivi des phénols (Claus et Decker. 2006).

Et aussi impliquée dans le système de défenses de certaines plantes contre les insectes et les microorganismes en intervenant dans la formation d'une croute imperméable les mélanines, qui joue un rôle protecteur contre de nouvelles attaques (Gelder et *al.* 1997). Synthétique les mélanines ont des applications comme protectives contre rayonnement (UV, rayon X, rayons gamma). En outre, les inhibiteurs de la tyrosinase sont devenus des constituants importants des produits cosmétiques luttant contre l'hyperpigmentation (Maeda et Fukuda. 1991).

## 2. Brunissement enzymatique

### 2.1. Définition

Parmi les caractéristiques organoleptiques des aliments, la couleur est l'une des propriétés principales pour évaluer la qualité des aliments par les consommateurs. Le brunissement est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréables du champignon (Martinez et Whitaker. 1995).

Le brunissement résulte de l'oxydation des phénols - tyrosine, dopamine,  $\gamma$ -glutaminyl-4-hydroxybenzène et  $\gamma$ -glutaminyl-3,4-dihydroxybenzène - catalysée principalement par la tyrosinase, monophénol, o-diphénol: oxygène oxydoréductase; EC 1.14.18.1), par une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (Martinez et Whitaker. 1995) et (Casafiola-M et al. 2006).

En présence de l'oxygène moléculaire, la tyrosinase possède deux activités différentes. Elle est capable d'hydroxyler les monophénols en o-diphénols, connue sous le nom d'activité crésolasique ou monophénolasique. Les o-diphénols, sont à leur tour oxydés par l'enzyme pour donner des o-quinones, connue sous l'appellation d'activité catécholasique ou o-diphénol oxydasique (Arslan et Dogan. 2005; Kolcuoglu et al. 2006).

### 2.2 Contrôle chimique du brunissement enzymatique

La recherche de traitements chimiques a conduit à une meilleure compréhension des mécanismes d'action de composés connus et/ou employés dans l'industrie agro-alimentaire ainsi qu'à la découverte de nouveaux composés ayant un effet anti-brunissement. L'utilisation d'inhibiteurs du brunissement enzymatique ne peut se concevoir que s'ils n'ont aucun effet toxique et ne modifient pas le goût ni la couleur des produits, et évidemment si le surcoût économique est supportable.

Les inhibiteurs chimiques sont classés en trois groupes selon qu'ils affectent l'enzyme, les substrats ou les produits de la réaction. Ils sont classés selon Mcevily et al. (1992) en six catégories (tableau 1): les agents réducteurs, les acidifiants, les agents chélateurs, les agents complexant, les inhibiteurs de l'enzyme et les traitements enzymatiques.

**Tableau 1:** Inhibiteurs du brunissement enzymatique (Mcevely et al. 1992).

<b>Agents réducteurs</b>	Sulfite et dérivés Acide ascorbique et analogues Cystéine et glutathion
<b>Agents chélateurs</b>	Phosphates EDTA Acide organiques
<b>Acidifiants</b>	Acide citrique phosphorique
<b>Inhibiteurs d'enzyme</b>	Acides carboxyliques aromatiques Alcools aliphatiques Anions Peptides Résorcinol substitués
<b>Traitements enzymatiques</b>	Oxygénases o-Méthyltransférase Protéases
<b>Agents complexant</b>	Cyclodextrines

#### 2.4.1 Inhibiteurs agissant sur les substrats de la tyrosinase.

Certains inhibiteurs chimiques agissent en piégeant les substrats phénoliques. Parmi les produits de synthèse classiquement employés en œnologie ou dans la fabrication de jus de fruits se trouvent le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), le charbon actif et la bentonite (Spagna et al. 2000).

Les cyclodextrines constituent une première catégorie d'agents adsorbants des phénols d'origine naturelle. Leur forme cylindrique ménage une surface interne hydrophobe alors que la surface externe présente un caractère hydrophile (Szejtli. 1990). Leur cavité hydrophobe leur permet de former un complexe avec une large gamme de molécules organiques et notamment avec des phénols ayant un caractère hydrophobe fort. Ainsi, leur utilisation dans les jus de fruits et légumes a été brevetée par Hicks et al. (1990). Cependant, la capacité de piégeage des cyclodextrines dépend de la nature des cyclodextrines et de celle des polyphénols (Fayad et al. 1997).

Les chitosanes, polymère de la N-acétylglucosamine, dérivés de désacétylation de la chitine (N-acétyl-2-amino-3-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside), seraient également capables d'inhiber le brunissement enzymatique de jus de pommes, de poires (Sapers, 1992).

D'autres polysaccharides anioniques tels que les carraghénanes et les sulfates de xylane ou d'amylose peuvent inhiber le brunissement enzymatique de jus ou de tranches de pommes. Ils complexeraient les composés phénoliques, mais également les atomes de cuivre du site actif des tyrosinases (Tong et Hicks, 1995).

#### **2.4.2 Traitements chimiques agissant sur l'enzyme.**

Les inhibiteurs chimiques agissant sur les tyrosinases peuvent être classés en quatre grands groupes selon les mécanismes d'inhibition. Le premier groupe est constitué des composés chélateurs de métaux, le second d'agents acidifiants, le troisième des composés agissant au niveau du site de fixation du substrat phénolique et le quatrième groupe enfin rassemble les composés agissant sur des sites différents du site de fixation du substrat phénolique.

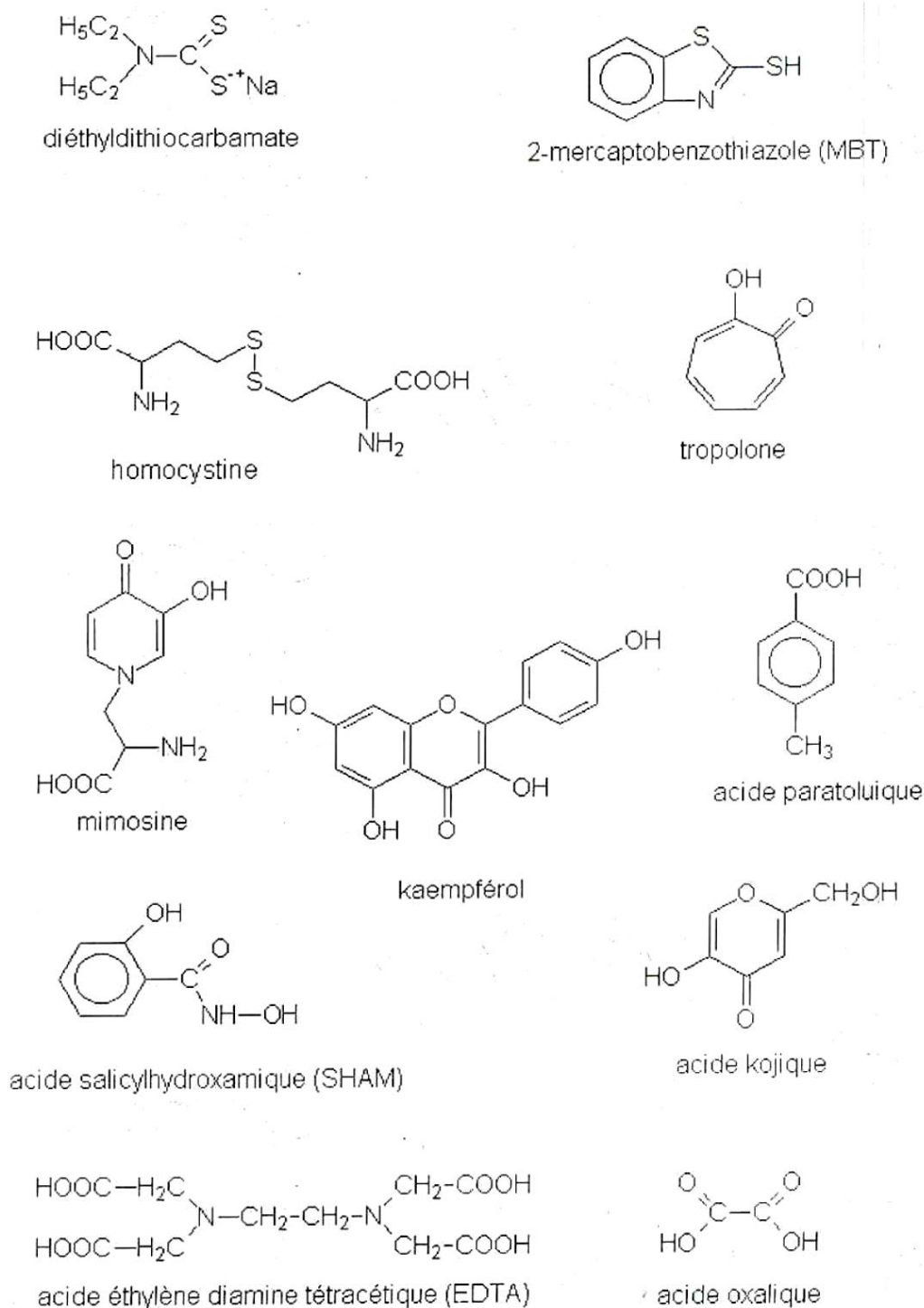
##### **2.4.2.1 Composés chélateurs d'ions métalliques.**

Ces composés forment des complexes avec les atomes de cuivre du centre actif des tyrosinases. Comme dans le cas de l'inactivation de la tyrosinase par l'acide oxalique. Cette inactivation s'accompagne de l'arrachement d'un des deux atomes de cuivre de l'enzyme conduisant à une forme inactive nommée *metapo*, l'atome de cuivre encore fixé à l'enzyme restant sous forme oxydé. La forme *metapo* est alors capable de fixer spontanément un atome de cuivre présent dans le milieu, conduisant ainsi à la régénération de la forme native de l'enzyme et à la restitution de l'activité catalytique (Yong et al. 1990). Parmi les composés chélateurs classiques inhibant les tyrosinases (figure 3) se trouvent le 2-mercapto benzothiazole, l'azoture, le cyanure, le monoxyde de carbone, l'acide éthylène diamine tétracétique, l'homocystéine, la métallothionéine et le diéthyl dithiocarbamate (de Rigal, 2001).

D'autres composés chélateurs ont une structure relativement proche de celles d'un phénol, ce qui leur confère une forte efficacité. C'est le cas de la tropolone, la mimosine (Kahn et Andrawis, 1985) le kaempférol, l'acide paratoluïque, l'acide salicyl hydroxamique ainsi que les acides kojique et oxalique (Tong et al. 1995).

Parmi les agents chélateurs employés industriellement se trouve le Sporix, un polyphosphate acide de synthèse, fréquemment utilisé en mélange avec l'acide ascorbique (Sapers, 1993). Les ions chlorure sont également capables de complexer les atomes de cuivre présents dans le site actif de la tyrosinase (de Poix et al. 1980).

Si le chlorure de sodium ou de calcium est fréquemment employé en combinaison avec l'acide ascorbique, son emploi est limité par les modifications de qualités gustatives qu'il entraîne (Walker et Ferrar. 1995).



**Figure 3:** Structure de quelques composés chélateurs de métaux (Rigal, 2001).

L'acide ascorbique, le peroxyde d'hydrogène, la phénylhydrazine, l'acide gallique, le ferrocyanure, le dithiothréitol, le glutathion et le  $\text{NH}_2\text{OH}$  seraient capables de réduire les atomes de cuivre du site actif de la tyrosinase de champignon (Andrawis et Kahn. 1990).

Selon ces mêmes auteurs, les ions cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) ainsi formés resteraient associés à la tyrosinase, même si leur affinité pour les résidus histidines de l'enzyme est fortement réduite. Ce phénomène conduit toutefois à une inactivation des activités polyphénoloxydasiques.

#### ***L'Acide oxalique.***

L'acide oxalique est un inhibiteur puissant de la tyrosinase par rapport à d'autres acides structurellement liés (Yoruk et Marshal. 2003). C'est un élément commun d'un grand nombre d'aliments d'origine végétale tels que les épinards, la rhubarbe, le persil, carotte, le pourpier, la pomme de terre, le cacao, ainsi que plusieurs plantes sauvages comestibles (Son et al. 2000b).

Des études menées par SATO (1980a) ont démontré que l'acide oxalique est un inhibiteur naturel de la tyrosinase des épinards. Ferrar et Walker (1993) ont signalé que l'acide oxalique produit par le phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum* inhibait l'activité de la tyrosinase des pommes infectées et les gousses des haricots. Aussi l'acide oxalique inhibé les activités de la tyrosinase de tournesol (Marciano et al. 1983), de cerise (Pifferi et al. 1974), et des champignons (Son et al. 2000a). Cependant, Il ya peu d'informations sur le mécanisme d'inhibition de l'acide oxalique sur la tyrosinase.

Dixon et Webb, (1979) rapportent que l'acide oxalique est un inhibiteur non compétitif de la tyrosinase. Yoruk et Marshall (2003) signalent que l'inhibition par l'acide oxalique peut être fondée sur l'hypothèse que l'enzyme est inactivée une fois que l'inhibiteur est lié au cuivre du site actif lié ou non au substrat, formant ainsi des chélates. En support à cette hypothèse Furia (1964) a suggéré que l'acide oxalique semblait inhiber la tyrosinase par chélation du cuivre du site actif formant un complexe métallique.

#### ***Le cyanure de potassium.***

Selon Robb (1984) le cyanure fait partie des espèces chimiques simples capables de se fixer avec le cuivre, et se comporte en tant qu'inhibiteur purement compétitif vers la fixation du dioxygène. Bien avant Harry et al. (1969) avaient rapporté que le cyanure était un inhibiteur très puissant de la tyrosinase champignon et se comporte comme un inhibiteur non compétitif vis-à-vis du catéchol. Et d'après Tülin (2003) une concentration de 1 mM de KCN inhibe 51% de l'activité de tyrosinase d'artichauts (*Cynarascolymus* L.).

### ***L'azide de sodium***

Jusqu'à présent, il a été constamment rapporté que l'azide de sodium agit en tant qu'inhibiteur de la tyrosinase. Ce comportement de l'azide est relié à sa capacité de former des complexes avec plusieurs métalloenzyme. L'inhibition des métalloenzymes, et spécialement les enzymes à cuivre par l'azide de sodium est principalement due à sa capacité de se coordonner fortement avec l'ion métallique du site actif, ce qui provoque un changement de conformation du site actif (Shi *et al.* 2001 ; Doğan *et al.* 2005).

#### **2.4.2.2 Les agents acidifiants.**

D'une manière générale, le pH optimal de tyrosinase est compris entre 5 et 7. Un abaissement de la valeur de pH du milieu vers 3 ou 4 permet donc d'inhiber ces enzymes et même d'augmenter l'efficacité de nombreux inhibiteurs (Conrad *et al.* 1994). L'acide citrique est l'agent acidifiant le plus couramment utilisé pour le traitement de fruits et légumes frais. Il est capable en outre de chélater le cuivre du site actif de l'enzyme (Walker et Ferrar. 1998). Certains acides, organiques ou non tel l'acide malique, tartrique, malonique, phosphorique ou chlorhydrique peuvent également être employés (Mac cord et Kilara. 1983). Cependant, leur prix et leur effet sur la qualité gustative des aliments représentent leurs principaux inconvénients (Weemaes *et al.* 1999a).

#### **2.4.2.3 Inhibiteurs agissant sur le site de fixation du substrat phénolique.**

Dans ce groupe (figure 4) se trouvent les acides carboxyliques et plus particulièrement les acides benzoïques, cinnamiques et phénylalcanoïques. Ce sont le plus souvent des inhibiteurs compétitifs des tyrosinases. Leur pouvoir inhibiteur tient à leur similitude structurale avec les phénols-substrats et à leur faible caractère oxydable (Mc evily *et al.* 1992b). Toutefois, le type d'inhibition observée peut varier selon le substrat ou la source enzymatique (Janovitz-klapp *et al.* 1990a ; Menon *et al.* 1990). Ces derniers auteurs ont également montré que la forme protonée des acides était responsable de l'inhibition, après avoir observé que celle-ci était accentuée à pH acide. Généralement, les dérivés de l'acide cinnamique ont un pouvoir inhibiteur plus élevé que ceux des deux autres séries citées (Sapers. 1993). Citons également l'acide kojique, l'acide oxalique, et la tropolone qui, outre leur pouvoir chélateur de métaux, sont des inhibiteurs compétitifs ou mixtes des tyrosinases (Kahn *et al.* 1995).

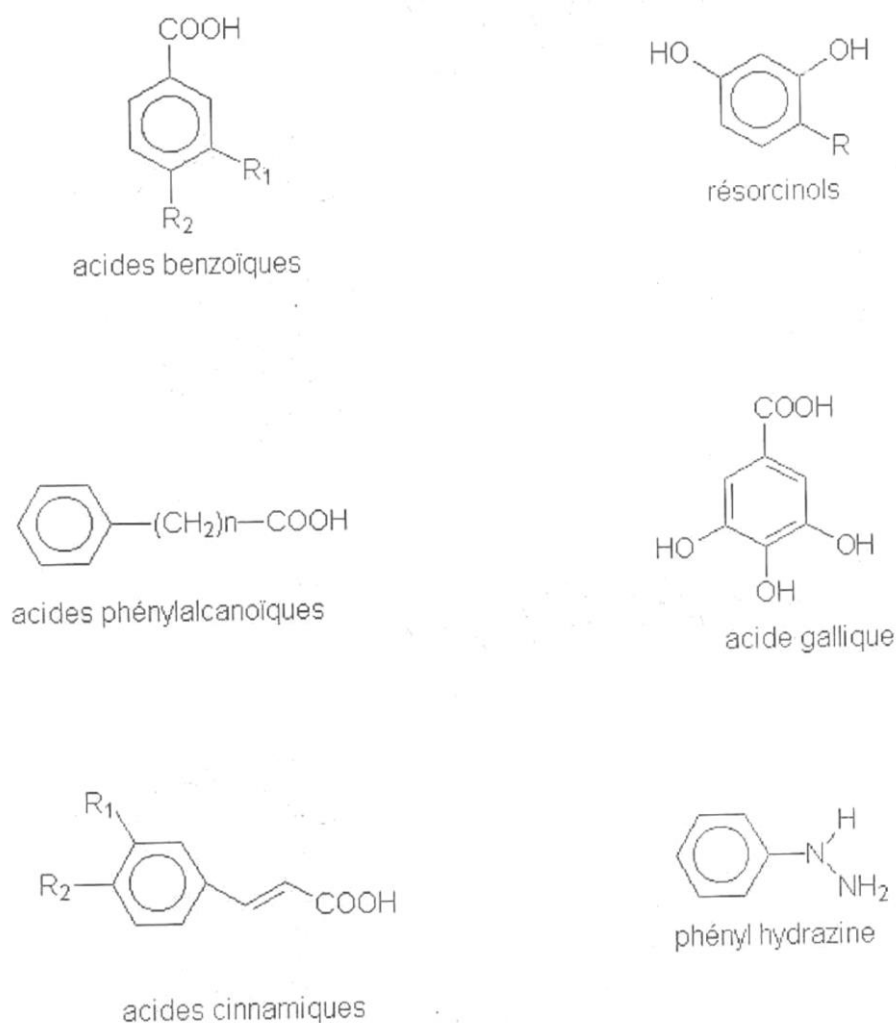
#### ***Les acides carboxyliques aromatiques (acides benzoïque et cinnamique).***

Ce sont des inhibiteurs de la tyrosinase en raison de leurs similitudes structurelles avec les substrats phénoliques. Les formes non dissociées de ces acides sont capables d'inhiber la tyrosinase par complexation avec le cuivre au site actif de l'enzyme (Marshall. 2000).

D'après Rapeanu et *al* (2006), une faible inhibition (23%), lorsque l'acide benzoïque a été testé dans les raisins. Et selon Liu, Huang et Chen (2003) l'acide benzoïque a été identifié comme un puissant inhibiteur de la tyrosinase de champignons. Inhibant à la fois l'activité monophénolase et diphénolase qui semble être une réaction réversible. En fin, dès 1969 Harry et *al* avaient rapporté que l'acide benzoïque inhibait la tyrosinase de champignon par une inhibition compétitive pour la fixation du catéchol et non compétitive vers la fixation de l'oxygène.

#### L'azide de sodium.

L'azide inhibe l'activité de l'enzyme en empêchant la ligature de la tyrosine au cuivre, ou en se mettant en compétition avec le substrat sur le site actif et spécialement l'oxygène moléculaire (Gouzi et *al*. 2010).



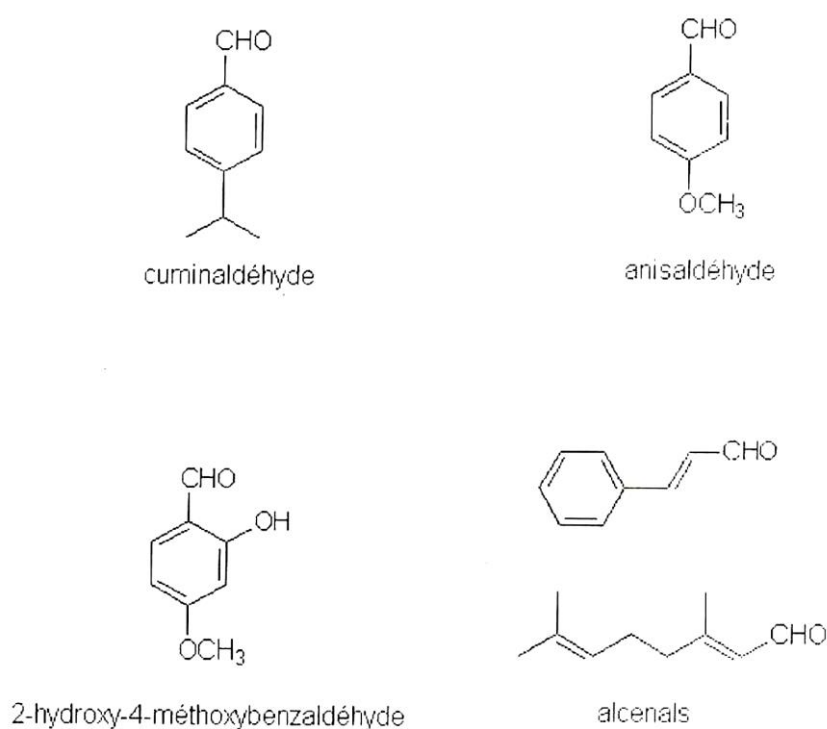
**Figure 4:** Structure de quelques composés agissant au niveau du site actif des tyrosinases (Rigal, 2001).

**Le fluorure de sodium.**

En termes de mécanisme d'inhibition les données suggèrent que le fluorure de sodium peut se fixer non seulement à l'enzyme libre mais aussi au complexe enzyme-substrat (Gouzi et *al.* 2010). Ces mêmes auteurs rapportent que le fluorure de sodium inhibe faiblement l'enzyme libre par rapport au complexe enzyme-substrat.

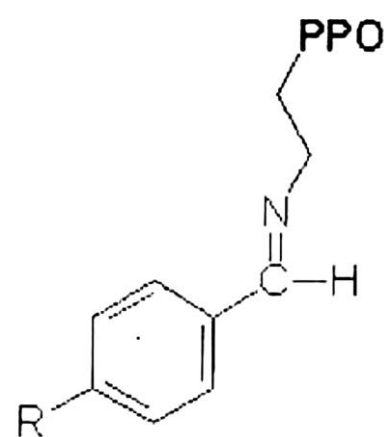
**2.4.2.4 Inhibiteurs agissant sur des sites autres que le site de fixation du substrat phénolique.**

Ce groupe d'inhibiteurs non compétitifs est constitué principalement d'aldéhydes extraits de végétaux. Citons le cuminaldéhyde présent dans les graines de cumin et l'anisaldéhyde présent dans les graines d'anis (Kubo et Kinst-hori. 1998) dont les structures sont représentées sur la figure 5.



**Figure 5:** Structure de quelques aldéhydes inhibant les tyrosinases (Rigal, 2001).

L'inhibition est due à l'attaque par le groupement aldéhyde d'amines primaires présent sur les chaînes latérales des tyrosinases, conduisant à la formation d'une base de Schiff stable (figure 6). De plus, l'hexanal sous forme de gaz s'est montré très efficace contre le brunissement de tranches de pommes (Lanciotti et *al.* 1999).



**Figure 6:** Structure de la liaison formée entre le groupement aldéhyde d'un inhibiteur et un groupement aminé porté par l'enzyme (Rigal, 2001).

***L'Acide citrique.***

C'est un acide organique faible (Rico et al. 2007; Li et al. 2008), le plus abondant dans les plantes et les fruits, en particulier les agrumes (Pernis et al. 2009). Cet acide organique a été souvent signalé par son activité anti-brunissement des fruits frais et les légumes coupés (Li-Quin et al. 2009) et est généralement reconnu comme étant non dangereux « GRAS » (*Generally Recognized As Safe*) (Pacific Health Sciences. 2008).

L'efficacité anti-brunissement de l'acide citrique dans les fruits frais coupés et les légumes se rapporte à deux facteurs principaux, y compris les types et cultivars de produit, et les concentrations d'agents anti-brunissement. Par exemple l'efficacité de l'acide citrique pour contrôler le brunissement enzymatique des pommes fraîchement coupées a été signalé à différer entre les cultivars de pomme. Dans les pommes Liberty, une activité inhibitrice moyenne sur le brunissement de 1%, étonnamment, 1% d'acide citrique ont montré une forte activité inhibitrice sur la tyrosinase de pomme (*Golden Delicious*) (Son et al. 2001). Aussi, d'après Pizzocaro, et al. (1993) des concentrations d'acide citrique entre 0,02 à 0,1% activaient la tyrosinase, alors que les concentrations à 0,2% ou plus présentaient un effet inhibiteur sur l'activité de la tyrosinase dans les pommes.

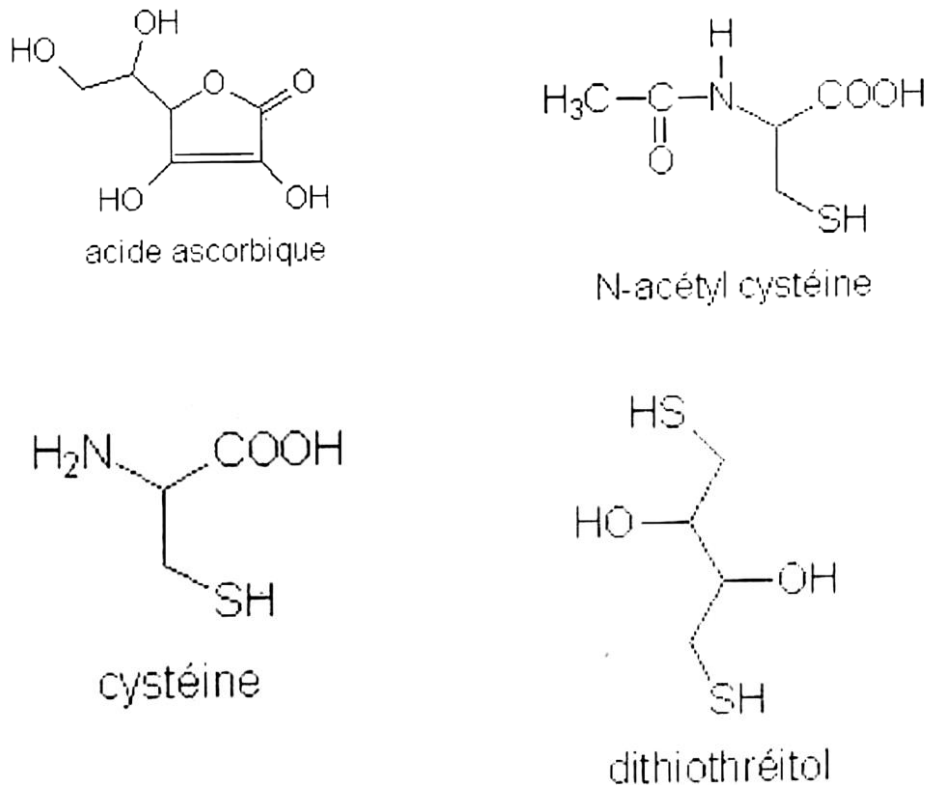
***Le chlorure de sodium.***

Le chlorure de sodium (NaCl) est un agent oxydant puissant, qui peut produire du dioxyde de chlore dans des conditions acides. Dans l'industrie alimentaire, il est utilisé pour une variété d'applications (Zhang et al. 2003). Le NaCl a montré une forte efficacité à la fois comme désinfectant pour réduire la croissance microbienne sur les produits et comme un inhibiteur de brunissement des pommes fraîchement coupées (Shengmin lu et al. 2006). Ces auteurs ont montré par l'expérience que NaCl avait une forte inhibition de la tyrosinase de pomme. Et leurs résultats fournissent une preuve supplémentaire que l'inhibition de l'activité de la tyrosinase par NaCl est due à l'inhibition de l'enzyme elle-même plutôt que l'élimination du substrat.

Ces résultats suggèrent que le NaCl peut avoir le potentiel pour devenir l'indispensable agent de contrôle double à la fois pour l'inhibition de brunissement et l'inactivation d'agents pathogènes. Marangoni et al. (2002) ajoutent que le NaCl est un inhibiteur de type mixte (compétitif et non compétitif) peut se lier non seulement avec l'enzyme libre, mais aussi avec le complexe enzyme-substrat à un autre site que le site actif.

### 2.4.3 Traitements chimiques agissant sur les produits de l'oxydation.

Les produits d'oxydation des diphenols, les quinones, réagissent entre eux et forment des dimères phénoliques. Ces dimères s'oxydent à nouveau et forment des polymères plus ou moins bruns. L'acide ascorbique (Hsu *et al.* 1988), les composés thiolés (Henze. 1956), les sulfites (Sayavedra- soto et Montgomery. 1986) et les acides aminés (Kahn. 1985) sont capables d'inhiber la formation de ces dimères en réduisant les quinones en phénols ou en formant des produits d'addition incolores par exemple (figure 7).



**Figure 7:** Structure de quelques inhibiteurs chimique agissant sur les produits de l'oxydation des diphenols par les tyrosinases (Rigal, 2001).

#### *Les sulfites.*

Le sulfite et ses dérivés constituent le moyen le plus efficace et le moins onéreux de lutte contre le brunissement enzymatique. Ces composés agissent simultanément sur les tyrosinases et sur les produits de la réaction d'oxydation catalysée par ces enzymes (Walker et Ferrar. 1998). Les formes solubles des sulfites, à savoir les ions sulfites ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) et bisulfite ( $\text{HSO}_3^-$ ), sont capables d'inactiver de manière irréversible les tyrosinases de végétaux supérieurs ou d'origine fongique (Golan-goldhirsh et Whitaker. 1984a).

Bien que les sulfites soient très efficaces, ils sont soumis à des restrictions d'utilisation en raison de leur effet toxique. Plusieurs rapports (Papazian. 1996) décrivent des réactions allergiques chez des personnes asthmatiques suite à la consommation de produits traités avec des sulfites. Le JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*) de la WHO (*World Health Organization*) et de la FAO (*Food and Agriculture Organization*) ainsi que la réglementation européenne recommandent une dose journalière admissible ne devant pas dépasser 0,7 mg/kg de masse corporelle de sulfite (équivalent dioxyde de soufre, SO<sub>2</sub>). Les sulfites, actuellement utilisés sur les pommes de terre, les champignons, les pommes et autres fruits et légumes, ne sont plus dans la liste des additifs « GRAS » (*Generally Recognized As Safe*) depuis 1986, et sont soumis à étiquetage si la concentration dans le produit final excède 10 mg/kg ou 10 mg/L. Depuis 1996, les traitements aux sulfites sont interdits sur les fruits et légumes vendus frais aux consommateurs. Les produits pouvant être sulfités font l'objet d'une liste positive où est précisée la teneur maximale en équivalent SO<sub>2</sub> dans le produit fini.

Depuis la limitation de leur utilisation et l'obligation d'étiquetage, de nombreuses recherches tendent à trouver un inhibiteur du brunissement enzymatique qui soit sain, aussi efficace et peu cher que les sulfites.

#### ***L'acide ascorbique.***

L'acide ascorbique est un agent réducteur, très hydrosoluble et dont les sels neutres sont également considérés comme sains pour inhiber le brunissement enzymatique ou d'autres réactions d'oxydation (Bauernfeind et Pinkert. 1970). L'acide ascorbique est également un piègeur d'oxygène libre. L'inhibition du brunissement enzymatique par l'acide ascorbique a été attribuée à la réduction des quinones en phénols initiaux avant qu'ils subissent les réactions secondaires qui mènent au brunissement et contribue également à la diminution du pH. Cependant, l'acide ascorbique est alors irréversiblement transformé en acide déhydroxy-ascorbique : le brunissement enzymatique est bloqué jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'acide ascorbique. Par ailleurs, des propriétés de chélation de cuivre prosthétique de la tyrosinase sont également attribuées à l'acide ascorbique (Whitaker. 1972). Ce dernier est en général utilisé en association avec l'acide citrique.

#### ***Le metabisulfite de sodium.***

Le Métabisulfite empêche le brunissement enzymatique de deux manières différentes: (1) il réagit avec les quinones produits par l'activité catalytique, et (2) il a un effet direct sur l'enzyme de manière irréversible (Valero et al. 1992).

Pour vérifier ces deux derniers effets, des expériences en présence d'acide ascorbique et de métabisulfite ont été effectuées de manière similaire, montrant que le métabisulfite agit par un mécanisme analogue à celui de l'acide ascorbique (Varoquaux et Sarris. 1979).

Wong *et al.* (1971) avaient rapporté que le disulfite de sodium inhibait la tyrosinase de céleri avec un mécanisme non-compétitif et que cet inhibiteur peut agir comme un agent réducteur des o-benzoquinones. EMBS et Markakis (1965) ont montré que le métabisulfite de sodium agit comme un inhibiteur de la tyrosinase de champignon en se liant aux o-quinones, empêchant ainsi la formation de mélanine. Cependant, bien que les bisulfites soient efficaces pour prévenir le brunissement, ils pourraient être nocifs pour la santé humaine, spécialement pour les patients asthmatiques.

### ***Les acides aminés.***

Les acides aminés, peptides et protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement l'enzyme, soit en réagissant avec les quinones (Mc Evily *et al.* 1992). Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  du site actif de la tyrosinase (O'Sullivan. 1969). Kahn (1985) compare les effets de protéines, d'hydrolysats protéiques et d'acides aminés sur l'activité *o*-dihydroxyphénolase de champignon, d'avocat et de banane par spectrophotométrie. La L-cystéine est l'acide aminé qui montre le plus fort pouvoir inhibiteur du brunissement enzymatique, dont l'efficacité rivalise avec celle du métabisulfite de sodium (Kahn. 1985). Cependant, les concentrations en cystéine et autres composés thiolés pour lesquelles les produits sont acceptables d'un point de vue de leur couleur, sont inacceptables en raison de l'amertume de ces produits. L'inhibition du brunissement enzymatique par la cystéine est due à la formation de composés d'addition incolores. Les adduits cystéine-quinone sont par ailleurs des inhibiteurs compétitifs de la tyrosinase. Les composés thiolés tels que la N-acétyl-cystéine et le glutathion (sous forme réduite) sont également de bons inhibiteurs du brunissement enzymatique de la purée de pomme de terre (Friedman *et al.* 1992).

Grâce aux nouvelles techniques de caractérisation des protéines, les connaissances des tyrosinases, de leurs propriétés et des mécanismes de la catalyse enzymatique du brunissement enzymatique ont pu progresser. En revanche, malgré la multitude des traitements chimiques ou thermiques agissant contre le brunissement enzymatique, aucun substitut aux sulfites suffisamment efficace, peu cher, pratique et sans effet néfaste sur les propriétés organoleptiques du produit alimentaire n'a pu être trouvé pour servir d'alternative à ce produit dont l'innocuité est largement remise en question. Nous nous proposons donc d'étudier le mécanisme d'inhibition des principaux inhibiteurs utilisés industriellement.

# *Matériels et méthodes*

## 1. Matériels

### 1.1 Matériel biologique

La truffe (*Terfezia leonis* Tul) est utilisée comme source de la tyrosinase (figure 08), les truffes ont été récoltées durant le mois de Mars 2014 de la Wilaya de Tiaret. L'extrait est conservé pendant une année à  $-10^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 8:** La truffe (*Terfezia leonis* Tul) (Wilaya de Tiaret).

### 1.2 Produits chimiques

La L-tyrosine, le sodium dodécyl sulfate (SDS) et l'acide benzoïque sont fournis par Fluka. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude, sont d'un grade analytique.

## 2. Méthode

### 2.1 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase

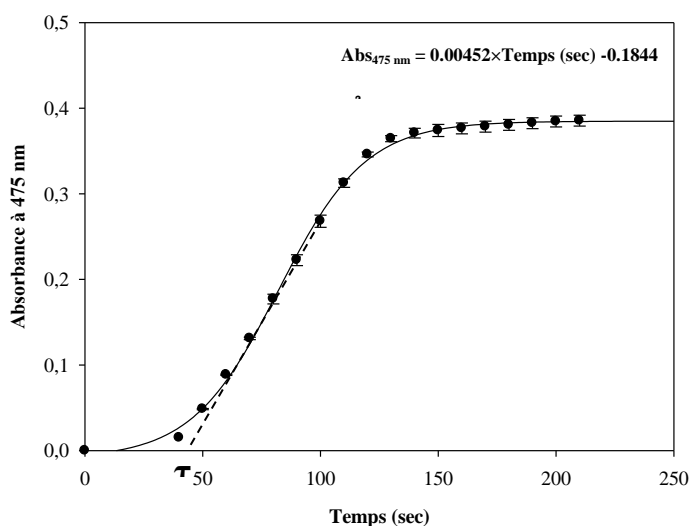
La tyrosinase a été extraite à partir de la truffe (*Terfezia leonis* Tul) selon la méthode d'extraction d'écrite par Gouzi et *al.* (2013).

Les écorces de la truffe (*Terfezia leonis* Tul) sont broyées à l'aide d'un mixeur pendant 5 min en présence de 200 ml de tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7.0). Le broyat obtenu est filtré à travers quatre couches de compresse stériles et le filtrat récupéré est centrifugé pendant 10 min à 400 tr/min. Le surnageant d'un volume total de 150 ml d'une couleur marron-jaunâtre représente l'extrait brut de la tyrosinase de la truffe. L'extrait enzymatique brut est répartis dans des tubes Eppendorph en plastique qui seront conservées à  $-10^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2 Mesure de l'activité de la tyrosinase

L'activité tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis*) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeLIOS $\gamma$  Spectrophotometer, England) en présence d'air en utilisant la L-tyrosine et en mesurant la production de la dopachrome à 475 nm ( $\epsilon = 3600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Gouzi et al. 2013).

L'activité tyrosinase est déterminée à 30°C dans le milieu réactionnel contenant 1 mL de la L-tyrosine à 1 mM dans du tampon acétate de sodium à 0.05 M et 40  $\mu\text{L}$  de la solution enzymatique. La vitesse initiale de l'activité crésolase est calculée à partir de la partie linéaire de la courbe d'accumulation du produit en fonction du temps après la phase de latence (figure 9).



**Figure 9:** Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine par l'extrait brut de la tyrosinase de *Terfezia leonis* (L-tyrosine à 0,5 mM, SDS à 4 mM, volume de l'extrait enzymatique 40  $\mu\text{l}$ , tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.0, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1.0 mL).

Une unité de l'activité tyrosinase est la quantité d'enzyme qui produit 1  $\mu\text{mol}$  de dopachrome par min à 30°C. La cuve de référence pour les mesures UV-visible contient tous les constituants sauf le substrat. Les solutions de substrat et d'enzyme sont mélangées après pré-incubation de 5 min à 30°C. Comme indiqué précédemment, l'extrait enzymatique est les constituants à ajouter le dernier dans le milieu réactionnel.

### 2.3 Détermination de la valeur $IC_{50}$

Pour déterminer la concentration de l'acide benzoïque qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50% ( $IC_{50}$ ), l'activité de la tyrosinase a été mesurée à 30 °C et à pH 5 (tampon acétate de sodium 0.05 M), en absence et en présence de différentes concentrations d'acide benzoïque comprises entre 0.4-4 mM et ceci pour une concentration constante de la L-tyrosine (0.5 mM). Les valeurs d' $IC_{50}$  ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'acide benzoïque (Chen et al. 1998).

### 2.4 Détermination du mécanisme d'inhibition de la tyrosinase par l'acide benzoïque

Pour déterminer le mécanisme d'inhibition de la tyrosinase de truffe par l'acide benzoïque, l'activité crésolase de l'enzyme a été mesurée dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations constantes d'acide benzoïque 0.4 et 0.8 mM à différente concentration de la L-tyrosine comprise entre 0.1 et 0.6 mM.

Le type d'inhibition a été déterminé 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 Dogan. 2005).

Les constantes d'inhibition  $K_I$  et  $K_{IS}$  ont été calculés à partir des graphes secondaire des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur,  $K_I$  et  $K_{IS}$  représentent les constantes de dissociation du complexe Enzyme -Inhibiteur (EI) et du complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur (ESI) respectivement.

La constante d'inhibition  $K_I$ , est une mesure quantitative du pouvoir inhibiteur des inhibiteurs réversibles. Par conséquent, dans notre étude, l'efficacité d'un inhibiteur est exprimée par le  $K_I$ , qui est l'inverse de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de l'inhibiteur.

### 2.5 Analyse des résultats expérimentaux

Les résultats observés ont été analysés par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve<sup>TM</sup>2D (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 2007) et Sigma Plot 2012 (Windows Version 12).

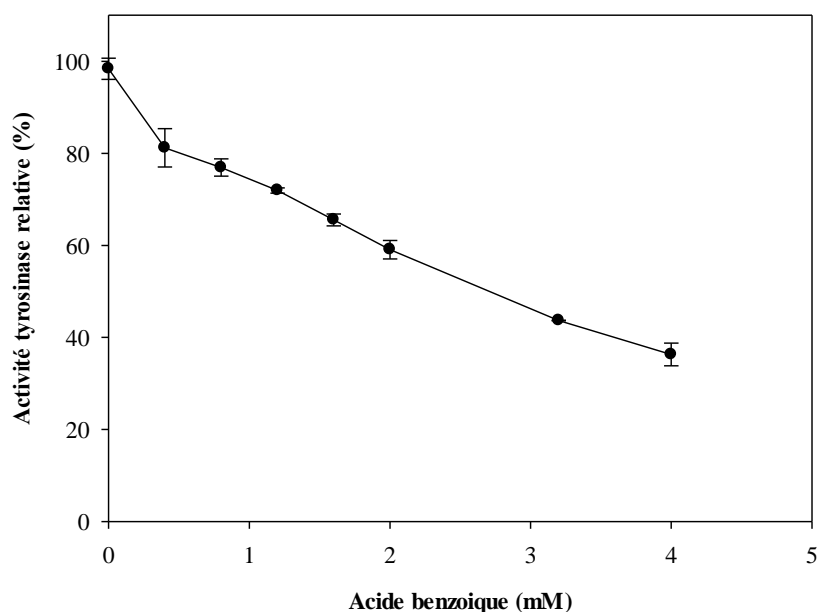
# *Résultats et discussion*

### 3.1 Détermination de la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'effet de l'acide benzoïque sur l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul)

L'effet de différentes concentrations de l'acide benzoïque sur l'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de truffe *Terfezia leonis* Tul est étudié. La figure (10) montre que l'activité crésolase de l'enzyme diminue en fonction de la concentration d'acide benzoïque dans le milieu réactionnel. Le caractère inhibiteur de l'acide benzoïque est dû à la présence du cycle benzène au niveau de sa structure (Pifferri et al. 1974).

La valeur d'IC<sub>50</sub> d'acide benzoïque définie comme étant la concentration de ce composé pour provoquer une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50% ainsi calculée égale à 2,82 mM.

Selon les résultats trouvés par Gouzi (2014), l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe est plus sensible vis-à-vis de l'acide benzoïque par rapport son activité catécholase.



**Figure 10:** Effet de la concentration de l'acide benzoïque sur l'oxydation de L-tyrosine de *Terfezia leonis*. Les conditions d'essai : 30°C, 1 ml de milieu réactionnel contient 0,05M de tampon acétate de sodium (pH 5.0); 1 mM de L-tyrosine; et 40 µl de l'extrait enzymatique, 4 mM SDS. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais.

Les valeurs de l'IC<sub>50</sub> déterminées pour l'acide benzoïque sur l'activité crésolase de la tyrosinase de *Terfezia leonis* ont été comparées par rapport à celles obtenues pour d'autres tyrosinases (tableau 2). On constate que la valeur d'IC<sub>50</sub> varie de manière significative avec la source de l'enzyme et du substrat phénolique utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique (Mayer et Harel. 1978).

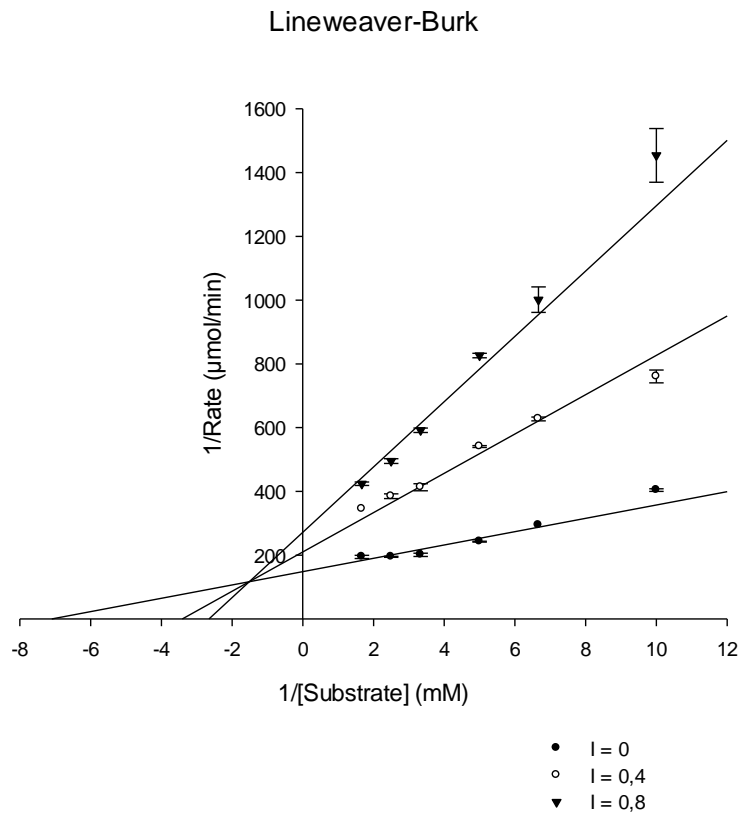
**Tableau 2.** Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'effet de l'acide benzoïque sur les tyrosinases obtenues à partir de quelques champignons.

Sources	Type de substrat phénolique	IC <sub>50</sub> (mM)	Références
Truffes ( <i>Terfezia leonis</i> )	L-Tyrosine	2,82	Notre étude
Truffe ( <i>Terfezia leonis</i> )	Catéchol	8.2	Gouzi (2014)
Champignon de Paris ( <i>Agaricus bisporus</i> )	Catéchol	1.00	Chen et al., 2003
Champignon de Paris ( <i>Agaricus bisporus</i> )	Catéchol	0.147	Gouzi et al., 2010
Plaquemine	Catéchol	5.00	Arzu et al., 2004

### 3.2 Inhibition mixte-type I de l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe par l'acide benzoïque

Le type d'inhibition de l'activité crésolase de truffe (*Terfezia leonis Tul*) par l'acide benzoïque a été déterminé à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk et les résultats obtenus sont représentés sur la figure (11) en présence de la L-tyrosine comme substrat. La représentation graphique de  $1/v_o$  en fonction de  $1/[S]$  est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, et qui se croisent du côté gauche de l'axe  $1/v_o$  et au-dessus de l'axe  $1/[S]$ , avec une diminution de  $V_{max}$  et inversement une augmentation du  $K_m$ , indiquant que l'acide benzoïque provoque une inhibition mixte-type I pour l'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de truffe.

D'après les travaux réalisés par Gouzi (2014), l'acide benzoïque est un inhibiteur compétitif vis-à-vis du catéchol comme substrat pour la tyrosinase de truffe *Terfezia leonis*. Ceci suggère que l'enzyme possède deux sites actifs bien distincts pour la fixation et la transformation des substrats mono- et diphenolique (tyrosine et catéchol).



**Figure 11:** Le graphe de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) sur le L-tyrosine par l'acide benzoïque. Concentrations de l'acide benzoïque sont: O (●), 0.4(○), et 0.8(▼) mM.

Chaque valeur représente la moyenne de deux essais  $\pm$ ES.

L'équation de Lineweaver-Burk pour l'inhibition mixte type-I 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 :

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

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

$$K_I \neq K_{IS}$$

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

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

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

L'inhibiteur mixte-type I peut se fixer non seulement sur l'enzyme libre mais aussi sur le complexe enzyme-substrat sur un site autre que le site actif (Chang et *al.* 2013).

D'après le tableau (3), on constate que la constante d'équilibre  $K_I$  pour l'acide benzoïque est de 0,205 mM en utilisant le L-tyrosine comme substrats, Indiquant que l'inhibiteur le plus efficace de l'activité crésolase de la Tyrosinase de truffe, vue sa valeur  $K_I$  qui est la plus faible.

Nous avons constaté que le rapport  $K_{IS}/K_I$  est supérieur à 1, signifiant que l'affinité de l'acide benzoïque pour l'enzyme libre est plus élevée par rapport à celle du complexe enzyme-substrat.

**Tableau 3** : L'inhibiteur acide benzoïque,  $K_I$ ,  $K_m$ , et  $V_{max}$  de la tyrosinase de *Terfezia leonis* avec la l-tyrosine comme substrat.

Acide benzoïque (mM)	$K_{IS}$ (mM)	$K_I$ (mM)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Type d'inhibition	$R^2$
0						
0,4	0.96	0,2050	0,1407	6,734e-3	Mixte type I	0,981
0,8						

# *Conclusion*

## Conclusion

---

Le brunissement des truffes est causé principalement par la tyrosinase. L'inhibition de cette enzyme par les agents chimique constitue un moyen pour le contrôle du brunissement des truffes lors de stockage ou leur transformation.

L'objectif principal de notre travail était d'étudier tout d'abord l'effet de l'acide benzoïque sur l'activité crésolase de la tyrosinase extraite à partir de la truffe *Terfezia leonis Tul.*

L'activité crésolase est sensible à l'acide benzoïque par rapport à son activité catécholase.

L'étude du mécanisme cinétique d'inhibition de l'acide benzoïque sur l'oxydation de la L-tyrosine comme substrat montre que l'acide benzoïque est inhibiteur mixte c'est à dire se fixe sur l'enzyme libre ainsi que sur le complexe enzyme-substrat avec une grande affinité vis-vis de l'enzyme libre.

Il serait donc possible d'utiliser l'acide benzoïque comme agent de contrôle du brunissement de la truffe ceci à de faible concentration.

A fin de compléter notre travail, il est envisageable d'étudier l'effet d'autres acide carboxylique aromatique sur la tyrosinase de truffe.

# *Références bibliographiques*

- Al-Laith AAA.** 2010. Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *J Food Compost Anal* 23:15–22
- Andrawis A., Kahn V.**, 1990. Ability of various chemicals to reduce copper and to inactivate mushroom tyrosinase. *J. Food Biochem.*, 14, 103-115.
- Anosike, E.O and Ayaebene, A.O.** 1982. Properties of polyphenol oxidase from tubers of the *yam Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*, 21: 1889-1893.
- 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.
- Arzu,Z., Colak,A., Dincer,B., Guner,S.**(2004). A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae). *Food Chemistry.*, 85, 431–437.
- Bauernfeind J.C., Pinkert D.M.**, 1970. Food processing with added ascorbic acid. *Adv. Food Res.*, 18, 219-315.
- Beelman, R.B and Simons, S.S.** 1996. Influence of Selected Cultural Factors on Relative Tyrosinase Activity in Cultivated Mushrooms. *World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products WSMBMP. The 2nd ICMBMP.* 1-9.
- Bonner, Jr W.D.** 1956. Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*, 8: 427-452.
- Burton, S. G.** 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*. Vol. 22, pp. 459-487.
- Casafiola, M., Khan, M; Marrero, P., Ather, A., Sultankhodzhaev, M., Torrens, F.** (2006). New tyrosinase Inhibitor selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorganic & medicinal Chemistry Letters*, Vol. 16, pp. 324-330.
- C.W. Van Gelder, W.H.; Flurkey, H.J.; Wichers,** 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases, *Phytochemistry*. Vol. 45, pp. 1309–1323.
- Chang, T-S.** 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci*, 10: 2440-2475.
- 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.
- Cheriot S.**, 2007. Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides. l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), Thèse de doctorat, spécialité sciences de l'aliment., 241.
- Chevalier T., De Rigal D., Mbeguier-A-Mbeguier D., Gaillard F., Richard-Forget F., Fils-Lycaon B.R.** (1999). Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxydase. *Plant Physiol.*, 119, 1261-1269.
- Cho, Y.K and Ahn, H.K.** 1999a. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*. 23: 577-592.
- Cho, Y.K and Ahn, H.K.** 1999b. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry*. 23: 593-605.
- Claus H., Decker H.**, 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology.*, 29, 3–14.
- Conrad J.S., Dawson S.R., Hubbard E.R., Meyers T.E., Strothkamp K.G.**,1994. Inhibitors binding to the binuclear active site of tyrosinase: temperature, pH, and solvent deuterium isotope effects. *Biochemistry*, 33, 5739-5744.
- David de Rigal,** 2001. Recherche sur l'inhibition du brunissement enzymatique ; utilisation de préparations enzymatique, substitués aux sulfites. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix. Marseille III. Option : biochimie. P19. (Thèse de Doctorat).
- de Poix A., Rouet-Mayer M.A., Philippon J.**, 1980. Action combinée des chlorures et de l'acide ascorbique sur l'inhibition des brunissements enzymatiques d'un broyat de pommes. *Lebensm. -Wiss. -technol.*, 14, 105-110.
- de Rigal.**, 2001. Recherche sur l'inhibition du brunissement enzymatique ; utilisation de préparations enzymatique, substitués aux sulfites. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix. Marseille III. Option: biochimie. P19. (Thèse de Doctorat).
- Della Longa S., Ascone I., Bianconi A., Bonfigli A., Castellano A. C., Zarivi O., Miranda M.** 1996. The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 271: 21025-21030.
- Dicko, M.H; Hilhorst, R; Gruppen, H; Laane, C; Van Berkel, W.J.H; and Voragen, A.G.J.** 2002. NOTE & TIPS. Zymography of Monophenolase and o-Diphenolase Activities of Polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry* 306, 336-339.
- Dixon M., Webb E.C.**, 1964. Dans "enzymes". Longman ed., Londres, 694-695.
- Dixon M., Webb EC.**, 1979. *Enzymes*. 3rd ed. New York: Academic Press. 1116 p.
- Dogan S., Turan Y., Erturk H., Arslan O.**, 2005. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynarascolumus* L.). *J Agric Food Chem.*, 53, 776–785.

- Dry I.B., Robinson S.P.** Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase, *Plant Mol Biol.* 26, 1994, pp. 495-502.
- Eicken, C; Krebs, B and Sacchetti, J.C.** 1999. Catechol oxidase – structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology.* 9: 677-683.
- EMBS R.J., Markakis P.,** 1965. Mechanism of sulfate inhibition of browning caused by polyphenol oxidase. *Journal of Food Science.*, 30, 753.
- Fan, Y and Flurkey, W.H.** 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gui tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry.* 65: 671-678.
- Fayad N., Marchal L., Billaud C., Nicolas J.,** 1997. Comparaison of  $\beta$ -cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenol oxidase from different source. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2442-2446.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García- Cánovas, F and Tudela, J.** (2004). Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- Ferrar P.H., Walker J.R.L.** 1993. *o*-Diphenol oxidase inhibition—an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. *Physiol Mol Plant Pathol.*, 43, 415–22.
- Friedman M., Molnar-Perl I., Knighton D.R.,** 1992. Browning prevention in fresh and dehydrated potatoes by SH-containing amino acids. *Food Add. Contam.*, 9, 499-503.
- Furia T.E.,** 1964. E.D.T.A in foods. *Food Technol.*, 18, 50-58.
- Garcia-Borron J. C., Solano F.** 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173.
- Golan-Goldhirsh A., Whitaker J.R.,** 1984a. Effects of ascorbic acid, sodium bisulfate and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1003-1009.
- Golbeck, J.H and Cammarata, K.V.** 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67: 977-984.
- Gouzi H., Coradin T., Delicado E.M., Ünäl 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 AND Benmansour, A.** (2007). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering.* 5: 1-11.
- Gouzi, H., Depagne, C., Benmansour, A., Coradin, T.** 2013. First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis* Tul.) and its thermal behavior. *European Food Research and Technology.* DOI 10.1007/s00217-013-2040-8.
- Gouzi, H.** 2014. Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée. UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE, Paris. Pages 159.
- Granata, A; Monzani, E; Bubacco, L; and Casella, L.** 2005. Mechanistic Insight into the Activity of Tyrosinase from Variable-Temperature Studies in an Aqueous/Organic Solvent. *Chem. Eur. J.* 12, Issue 9, 2504-2514.
- Harry W., Duckworth., Joseph E., Colema.,** 1969. Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *Biological. Chem.*, 7, 1613-1625.
- Haudecoeur, R.** (2011). Pharmacochimie des aurones pour la modulation d'enzymes. Thèse de doctorat, l'université de grenoble, Genève. 123-124
- Henze R. E.** 1956. Inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid solutions with cysteine and glutathione. *Science.*, 123, 1174-1175.
- Hicks K.B., Sapers G.M., Seib P.A.,** 1990. Process for preserving raw fruit and vegetable juices using cyclodextrins and composition thereof. U.S. Patent 4, 975-293.
- Himmelwright R. S., Eickman N. C., Solomon E. I.** 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* 102.
- Hsu A.F., Thomas C.E., Brauer D.,** 1988. Evaluation of several methods for estimation of the total activity of potato polyphenol oxidase. *J. Food Sci.*, 53, 1743-1745.
- 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
- Janakat, S., S. Al-Fakhiri and A. Sallal,** 2004. A promising peptide antibiotic from *Terfezia clavaryi* aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vivo. *Phytotherapy Res.*, 18: 810-813.
- Janovitz-Klapp A.H., Richard F.C., Goupy P., Nicolas J.J.,** 1990a. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 926-931.
- Jolivet, S; Arpin, N; Wichers, H.J and Pellon, G.** 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102, No. 12, 1459-1483

- Kahn V.**, 1985. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on *o*-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.*, 50, 111-115
- Kahn V., Andrawis A.**, 1985. Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. *Phytochemistry.*, 24, 905-908.
- Kahn V., Lindner P., Zakin V.**, 1995. Effect of kojic acid in the oxidation of *o*-dihydroxyphenols by mushroom tyrosinase. *J. Food Biochem.*, 18, 253-271.
- Keilin, D and Mann, T.** 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.*, Vol. 125, pp. 187-204.
- Kiabunde, T., Eicken, C., Sacchetti, J.O and Krebs, B.** 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology.*5: 1084-1090.
- Kubo I., Kinoshita H.**, 1998. Tyrosinase inhibitors from cumin. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5338-5341.
- Kubowitz, F.** 1938. Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung.* 299: 32-57
- Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T. C., Murugan. K.** (2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food Chemistry.*110:328-333.
- Kuwabara T and Katoh Y.** 1999. Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* 40: 1029-1035.
- Lanciotti R., Corbo M.R., Gardini F., Sinigaglia M., Guerzoni M.E.**, 1999. Effect of hexanal on the shelf life of fresh apple slices. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4769-4776.
- Lax A. R and Vaughn K. C.** 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31.
- Lerch, K.** 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine  $\beta$ -monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. Marcel Dekker, New York, Basel, 143-86.
- Lerch, K.** 1982. Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257: 6414-6419.
- Li H., Guo A., Wang H.**, 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.*, 108, 1-13.
- Li-Qin Z., Jie Z., Shu-Hua Z., Lai-Hui G.**, 2009. Inhibition of browning on the surface of peach slices by short-term exposure to nitric oxide and ascorbic acid. *Food Chem.*, 114, 174-9.
- Mac Cord J.D., Kilara A.**, 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Food Sci.*, 48, 1479-1483.
- Maeda K., Fukuda M.**, 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem.* 42: 361-368.
- Marangoni A.G.**, 2002. Reversible enzyme inhibition. In *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*; Wiley: Hoboken, NJ, 61-65.
- Marciano P., Lenna P.D., Magro P.**, 1983. Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiol Plant Pathol.*, 22, 339-45.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoepler, A., Poggi, V.** 2003. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry.* 63: 745-752.
- Marshall, M.R., Kim, J., and Wei, C.I.**, 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetable and seafoods. *Journal of Food and Agriculture Organization*, 41, 259-312.
- Martinez, M. V., Whitaker, J. R.** 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology.* 6: 195-200.
- Matheis, G.** 1987a. Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11: 5-12.
- Matheis, G.** 1987b. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic Browning and Potato Constituents. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11 : 33-41.
- Mayer, A.M and Harel, E.** 1978. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry.* Vol. 18, pp.193-215
- Mayer, A.M.** 1987. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants-Recent progress. *Phytochemistry.* 26: 11-20.
- Mayer, A.M.; Harel, E.** 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology.* London: Elsevier Applied Science. 373-398.
- Mc Evily A.J., Iyengar R., Otwell W.S.**, 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 253-273.
- Menon S., Fleck R.W., Yong G., Strothkamp K.G.**, 1990. Binzoique acid inhibition of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  isoenzymes of *agaricus bisporus* tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 280, 27-32.
- Morin Emmanuel**, 2008. Aloevera (L.) Burm.F.: Aspects pharmacologiques et cliniques. Université de Nantes Faculté de pharmacie. P 107-108. Thèse de Docteur en pharmacie
- Nicolas, J.J., Richard-forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M. AND Aubert, S.Y.** (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 109-157.

- 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.
- Nosanchuk J.D., Casadevall A.**, 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.*, 5, 203–223.
- Ôba, K; Iwatsuki, N; Uritani, I; Alvarez, A.M; AND Garcia, V.V.** (1992). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes in banana bud. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1027-1030.
- Osullivan W.J.**, 1969. Stability constants of metal complexes. in *Data for biochemical research.* DAWSON.R.M.C., ELLIOT D.C., ELLIOT W.H., JONES K.M. Oxford, England., 423-434. Pacific Health Sciences, Available at: [http://www.pacifichealth.com/gras\\_list.htm#GRAS](http://www.pacifichealth.com/gras_list.htm#GRAS), accessed October 2008.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., AND Giunta, C.** (1994) (a). *Agaricus bisporus* tyrosinase–I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215- 221.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., AND Giunta, C.** (1994) (b). *Agaricus bisporus* tyrosinase–II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities. *Int. J. Biochem.* 26: 223-228.
- Papazian R.**, 1996. Sulfites: safe for most, dangerous for some [http://www.fda.gov/fdac/features/096\\_sulf.html](http://www.fda.gov/fdac/features/096_sulf.html). FDA Consumer magazine., *US Food and Drug Administration.*, consulté le 13 mai 2011.
- Pascal, Sarni.; Manchado. Veronique. Cheynier.** 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. EDIT Tec et Doc. Paris. 398 p
- Perez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M AND Garcíacarmona, F.** (2001). Monophenolase activity of latent *Terfezia clavaryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum.* 133: 203 209
- Pernice R., Borriello G., Ferracane R., Borrelli RC., Cennamo R., Ritieni A.,** 2009. Bergamot: A source of natural antioxidants for functionalized fruit juices. *Food Chem.*, 112, 545-50.
- Pierrick Horde.** Juin 2014. Acide benzoïque
- Pifferi 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.
- Pizzocaro F., Torreggiani D., Gilardi G.,** 1993. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *J. Food Process. Preserv.*, 17, 21-30.
- Queiroz C., Maria Lúcia Mendes L.M.L., Fialho E., Veralúcia.,** 2008. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International.* 24, 361–375.
- Rapeanu G., Loey A.V., Smout C., Hendrickx M.,** 2006. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from *Victoria* grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). *Food Chem.*, 94, 253–361.
- Rico D., Martín-Diana A.B., Barat J.M., Barry-Ryanc.,** 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetable: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 18, 373-86.
- Robb, D.A.** 1984. Tyrosinase. In copper Proteins and Copper Enzymes, ed. R. Lontie. *CRC Press, Boca Raton, Florida.* 207-241.
- Rodakiewicz-Nowak, J and Ito, M.** 2003. Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 78, Issue 7, 809-816.
- Sapers G.M.,** 1992. Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration. *J. Food Sci.*, 57, 1192-1193.
- Sapers G.M.,** 1993. Browning of foods: control by control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol.*, 47, 75-84.
- Sato M.,** 1980a. Inhibition by oxalates of spinach chloroplast phenolase in unfrozen and frozen states. *Phytochemistry.*, 19, 1613–7.
- Sayavedra-Soto L.A., Montgomery M.W.,** 1986. Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *J. Food Sci.*, 51, 1531-1536.
- Schoenbein, C.F.** 1856. On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine* 11, 137-141.
- Shengmin Lu., Yaguang Luo., Hao Feng.,** 2006. Inhibition of Apple Polyphenol Oxidase Activity by Sodium Chlorite. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3693-3696.
- Shi, C., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y., AND Liu, Q.** (2001). The Purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter.* 19: 381a-381.
- Sojo, 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, E.I; Sundaram, U.M and Machonkin T.E.** 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.

- Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y., 2000a. Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2071-4.
- Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y., 2000b. Rhubarb juice as a natural antibrowning agent. *J Food Sci.*, 65, 1288-1299.
- Son SM., Moon KD., lee CY., 2001. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chem.*, 73, 23-30.
- Spagna G., Barbagallo R.N., Pifferi P.G., 2000. Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4619-4627.
- Steffens J.C., Harel E., Hunt M.D. Polyphenol Oxidase. In: *Genetic engineering of plant secondary metabolism*, Ellis B.E., Kuroki G.W., Stafford H.A., eds, Plenum Press, New York, 1994, pp.275-312.
- Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., Thipya-Pong, P. (1998). Polyphenol oxidase. In Polyphenols 96. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 23-250
- Szejtli J., 1990. Cyclodextrins, properties and application. *Drug investigation*, 2, 11-21.
- Tong C.B.S., Hicks K.B., Osman S.F., Hotchkiss JR A.T., Haines R.M., 1995. Oxalic acid in commercial pectins inhibits browning of raw apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 592-597.
- Tulin, A. (2003). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *heads Food Chemistry* 87:59-67.
- Valero E., Varan R., Garcia-Carmona F., 1992. Kinetic Study of the Effect of Metabisulfite on Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 904-908.
- Vamos-Vigyazo L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruit and vegetables. *C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 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. *Phytochemistry*. 45: 1309-1323.
- Varoquaux P., Sarris J., 1979. Influence de l'acide ascorbique sur la réaction de l'o-diphenolase (E.C.1.14.18.1) du champignon de paris (*Agaricus bisporus*). *Lebensm.-wiss. Technol.*, 12, 318-320.
- Varoquaux., P (1978). Contribution à l'étude des propriétés de m'odiphenoloxydase 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.
- Walker J. R. L AND Ferrar P. H. (1995). The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.*: 836-839
- Walker J.R.L., Ferrar P.H., 1998. Diphenol Oxidase, Enzyme-catalysed Browning and Plant Disease Resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, 15, 457-498.
- Weemaes C.A., Ludikhuyze L.R., Van Der Broeck I., Hendrickx M.E., 1999a. influence of pH, benzoic acid, glutathione, EDTA, 4-hexylresorcinol, and sodium chloride on the pressure inactivation kinetics of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem*, 47, 3526-3530.
- Whitaker J., Lee C. Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society: 2-7.
- Whitaker J.R., 1972. Effect of pH on rates of enzyme-catalyzed reactions. in *Principles of enzymology for the Food Sciences*. O.R. FENNEMA (Ed.). New York, Marcel Dekker. Chapter 10.
- Whitaker, J.R. 1995. Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman and Hall. 271-307.
- Wichers, H. J., Gerritsen, Y. A. M., & Chapelon, C. G. J. 1996. Tyrosinase isoforms from 392 the fruit bodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*. 43: 333-337.
- 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.
- Yagar, H AND Sagiroglu, A. (2002). Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince. *Turk J Chem*. Vol. 26, pp. 97-103.
- Yong G., Leone C., Strothkamp K. G., 1990. *Agaricus bisporus* metapotyrosinas: preparation, characterization, and conversion to mixed-metal derivatives of the binuclear site. *Biochem.*, 29, 9684-9690.
- Yoruk R., Marshall M.R., 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J Food Biochem* (forthcoming).
- Zarivi, O., Bonfigli, A., Cesare, P., Amicarelli, F; Pacioni, G., Miranda, M. (2003). 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.
- Zhang Y., Lu H., Levin R.E., 2003. Enhanced storage-life of fresh haddock fillets with stabilized sodium chlorite in ice. *Food Microbiol.*, 20, 87-90.
- Zinkernagel V., 1986. Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydse Aktivitäten. *J. Phytopathol*. 115, 257-266.

- Ziyan, E and Pekyardimci, Ş.** 2003. Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem.* 27: 217-225.
- Ziyan, E AND Pekyardimci, S.** (2004). Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.* 28: 547-557.