

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة البحث العلمي و التعليم العالي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار التليجي بالاغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT  
كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم العلوم الفلاحية  
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*  
*Filière : Sciences agroalimentaire*  
*Option : agroalimentaire et contrôle de qualité*

### THEME

---

# Contrôle du brunissement enzymatique post récolte des dattes <<Deglet-Nour>>

---

Présenté par : Mohammed Youcef Ben Ferhat.

Devant le jury :

Président : Adamou Alla edinne

Examineur : Gouzi Hichem

Rapporteur : BENACEUR Farouk

Soutenu publiquement le : 2018.

## *Dédicaces*

*On dédie ce modeste travail à tous qui a été participé d'arrivé à finir cette thèse et d'arrivé à finir notre études delle début jusqu'a la fin a partir de ma chère famille jusqu'au dernier.*

*Aussi sont oublié mes enseignants du primaire à L'université.*

*A mes chers amis aussi Yacine, Nouredinne, Farouk,  
Harzallah ..... Etc.*

*Youcef*

# *Remerciements*

Merci **bon Grand Dieu**, source de toutes les connaissances pour nous à donné la force et le courage de travaillé, d'être et devenue et arrivé de complété se travail.

Ont voudrai exprimer l'hémance plaisir et le respect pour les parent et leur encouragements, leur patience et le suivie durant toute notre vie.

Nos remerciements aussi Mr. **Farouk Benaceur** pour avoir accepté de nous encadré et de nous faire de la confiance et de soutient et d'encouragement pour travaillé dans cette thèse exceptionnellement.

Sans oublie un grand chapeau pour notre Co-encadreur Mr **Khaled Lagaa** pour leur travail et le soutient durant toute la partie pratique et de même le soutient

Aussi membres du jury merci qu'ont acceptés d'examiner se travail.

Notre remerciement a aussi à tous les amis, et tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail.

## Liste des tableaux

<b><u>Tableau 1</u></b>	variétés de dattes algériennes et leur aire de culture. <b>(Dubost., 1991).</b>	05
<b><u>Tableau2</u></b>	les valeurs de pH optimal de la PPO obtenue à partir de différentes sources végétales	20
<b><u>Tableau 3</u></b>	Les valeurs d'IC50 de l'acide ascorbique comme inhibiteur trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats	28
<b><u>Tableau 4</u></b>	Les valeurs d'IC50 de l'acide citrique trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats	28
<b><u>Tableau 5</u></b>	Les paramètres cinétiques estimés de l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase de ( <i>Phoenixdactylifera L</i> ) à pH 5.	30

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Datte et noyau du palmier dattier.	4
<b>Figure 2</b>	Classification de dattes selon leurs consistances.	4
<b>Figure 3</b>	La variété de dattes ( <i>Phoenixdactylifera L.</i> ) cvDegletNour	14
<b>Figure 4</b>	Extrait brut de la datte ( <i>Phœnix dactylifera L CV Deglet Nour</i> ) avant et après centrifugation.	16
<b>Figure 5</b>	Variation de l'activité enzymatique de la PPO de ( <i>PhoenixdactilyferaL.</i> ) cv Deglet Nour en --fonction du pH. (En présence de pyrocatechol comme substrat). A 30°C.	19
<b>Figure 6</b>	Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes Deglet Nour ( <i>Phoenixdactylifera L.</i> ) après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrocatechol comme substrat).	21
<b>Figure 7</b>	Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes Deglet Nour ( <i>Phoenixdactylifera L.</i> ) après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrocatechol comme substrat).en fonction de pH.	22
<b>Figure 8</b>	Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes Deglet Nour ( <i>Phoenixdactylifera L.</i> ) (En présence de pyrocatechol comme substrat).en fonction de pH et du temps du traitement thermique. A (30°C) ;B (40°C) ;:C (50°C) ;:D (60°C) ;E (65°C) ;F (70°C) ;G(75°C).	23
<b>Figure 9</b>	L'effet de la concentration de l'acide ascorbique sur l'oxydation de Pyropyrocatechol par la PPO de dattes ( <i>Phoenixdactylifera L cv DegletNour</i> ) en fonction de pH.	25
<b>Figure 10</b>	L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de Pyropyrocatechol par la PPO de dattes ( <i>Phoenixdactylifera L cv DegletNour</i> )en fonction de pH.	26
<b>Figure 11</b>	Les graphes de l'inactivation thermique de l'extrait brut de la polyphénol oxydase de ( <i>Phoenixdactylifera L</i> ) dans des températures comprises entre 60-75°C. Les conditions expérimentales sont : catéchol 20 mM, pH 5 (tampon acétate 0.05 M).	29
<b>Figure 12</b>	Graphique d'Arrhenius de la vitesse d'inactivation thermique du polyphénol oxydase des deux fractions (stable et résistante) des dattes ( <i>Phoenixdactylifera L</i> ).	31
<b>Figure 13</b>	L'effet de la température sur la valeur-D de l'inactivation de l'activité polyphénol oxydase des deux fractions (stable et résistante) des dattes ( <i>Phoenixdactylifera L</i> ).	31

## Liste des abréviations

<b>PPO</b> .....	La polyphénol oxydase
<b>IC<sub>50</sub></b> .....	l'activité enzymatique par 50 %
<b>Mm</b> .....	Milli molaire
<b>M</b> .....	... Molaires unités de mesure de la masse
<b>ΔS</b> .....	L'entropie
<b>ΔH</b> .....	L'enthalpie
<b>ΔG</b> .....	L'énergie libre de Gibbs
<b>ln(k<sub>s</sub>)</b> .....	Constante d'inactivation
<b>ln(k<sub>I</sub>)</b> .....	Constante d'inactivation
<b>t<sub>1/2</sub></b> .....	Demi-vie
<b>AR(%)</b> .....	L'activité enzymatique résiduelle
<b>D</b> .....	le temps (min) nécessaire pour diminuer 10% de l'activité initiale.
<b>K</b> .....	Constants d'inactivation a (s <sup>-1</sup> )
<b>°C</b> .....	Degrés Celsius.
<b>μg</b> .....	Micro-gramme.
<b>μl</b> .....	Micro-litre.
<b>Cm</b> .....	Centimètre.
<b>CMI</b> .....	Concentration Minimale Inhibitrice.
<b>L</b> .....	Litre.
<b>Min</b> .....	Minute.
<b>ml</b> .....	Millilitre.
<b>Mm</b> .....	Millimètre.

# Sommaire

- I Dédicaces et Remercîment
- II Listes des tableaux et des figures
- III Liste des abréviations

	<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
	<b>PREMIERE PARTIE : Synthèse Bibliographique</b>	<b>2</b>
<b>I</b>	<b>Chapitre I : I- Le palmier dattier</b>	<b>2</b>
<b>I.1</b>	<b>Généralités</b>	<b>2</b>
<b>I.2</b>	<b>La classification botanique</b>	<b>2</b>
<b>I.3</b>	<b>La répartition géographique</b>	<b>3</b>
<b>II-</b>	<b>La datte</b>	<b>3</b>
<b>II-1</b>	<b>Définition</b>	<b>4</b>
<b>II.2</b>	<b>Classification des dattes</b>	<b>5</b>
<b>II.3</b>	<b>Les principales variétés de dattes en Algérie</b>	<b>5</b>
<b>II.4</b>	<b>La composition biochimique</b>	<b>5</b>
<b>II.4-1</b>	<b>Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe "</b>	<b>5</b>
<b>II.4-2</b>	<b>Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau "</b>	<b>7</b>
<b>II</b>	<b>Chapitre II : Polyphénol oxydase</b>	<b>8</b>
	<b>Polyphénol oxydase</b>	<b>8</b>
<b>1.</b>	<b>Définition, classification et nomenclature</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Définition</b>	<b>8</b>
<b>1.2</b>	<b>Classification et nomenclature</b>	<b>8</b>
<b>1.3</b>	<b>Distribution, localisation subcellulaire et rôle physiologique</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Distribution et localisation subcellulaire</b>	<b>9</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Rôle physiologique</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>pH et Température optimale</b>	<b>10</b>
<b>1.5</b>	<b>Spécificité de la PPO</b>	<b>11</b>
<b>1.6</b>	<b>Affinité et efficacité</b>	<b>11</b>
<b>1.7</b>	<b>Aspects cinétiques et thermodynamiques de l'inactivation thermique de la PPO</b>	<b>11</b>
<b>1.8</b>	<b>Les effecteurs</b>	<b>12</b>
<b>1.8.1</b>	<b>Les activateurs</b>	<b>12</b>
<b>1.8.2</b>	<b>Les inhibiteurs</b>	<b>12</b>
	<b>DEUXIEME PARTIE</b>	
<b>1</b>	<b>Chapitre III : Matériels et méthodes</b>	<b>14</b>
	<b>Matériels</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Echantillonnage</b>	<b>14</b>

1.2	<b>Produits chimiques</b>	14
1.3	<b>Matériels utilisés</b>	
2.	<b>Méthodes</b>	15
2.1	<b>Préparation de l'extrait brut de la PPO</b>	15
2.2	<b>Mesure de l'activité de PPO</b>	15
2.3	<b>Effet du pH</b>	16
2.4	<b>Etude de la stabilité thermique</b>	16
2.5	<b>Détermination des valeurs d'IC50</b>	17
2.6	<b>Étude cinétique de l'inactivation thermique de la PPO</b>	17
2.7	<b>Analyse des résultats expérimentaux</b>	19
	 <b>Chapitre IV : Résultats et discussions</b>	
1	<b>Etude de l'effet du pH et de température</b>	19
2	<b>Etude de stabilité thermique</b>	20
3	<b>Détermination de la valeur d'IC50 de l'acide ascorbique et l'acide citrique sur l'activité enzymatique de la PPO</b>	25
4	<b>Etude cinétique de l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase de Phoenix dactylifera L.</b>	28
	 <b>CONCLUSION</b>	29

## **IX Références bibliographiques**

## **X Résumé**

# INTRODUCTION

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

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

En présence de l'oxygène moléculaire, la PPO présente deux activités différentes, elle est capable d'hydroxylé les monophénols en o-diphénols (activité crésolasique ou monophénolasique), les o-diphénols ainsi formés sont oxydés à leur tour pour donner des o-quinones (activité catécholasiqque ou o-diphénoloxydasiqque) qui se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir appelé mélanine (Drardja et *all.*,2017 ;Cao et *all.*,2018) .

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

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

L'objectif souligné dans notre étude vise une compréhension du comportement cinétique de la PPO extraite à partir de la variété d'excellence : «*Deglet nour* » et ceci via la détermination l'étude d'une part l'effet de pH et température et d'autre part l'effet de l'acide citrique et l'acide ascorbique comme étant deux inhibiteurs de synthèse fréquemment utilisés avec une étude thermodynamique détaillée et complémentaire impliquant le suivie de l'effet d'inactivation thermique en fonction du temps en présence de catéchol comme substrat.

Ainsi, notre travail présenté en quatre chapitres est séquencé comme suit :

Le premier chapitre concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur les dattes et l'enzyme d'intérêt « PPO ». Dans le deuxième chapitre, nous mettrons en évidences les procédures expérimentales. Le troisième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO de dattes sont regroupées dans le dernier chapitre.

## **I- Le palmier dattier**

### **I.1-Généralités**

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

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

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

### **I.2-La classification botanique**

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

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

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

### **I.3-Répartition géographique**

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

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

D'autre part les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis. Le palmier dattier est cultivé au niveau de 17 wilayas seulement, pour une superficie de 120830 hectares, cependant 4 wilayas représentent 83,6% du patrimoine phoenicicole national : Biskra 23%, Adrar 22%, El-oued 21% et Ouargla 15% (Anonyme, 2002).

## **II-La datte**

### **II-1 Définition**

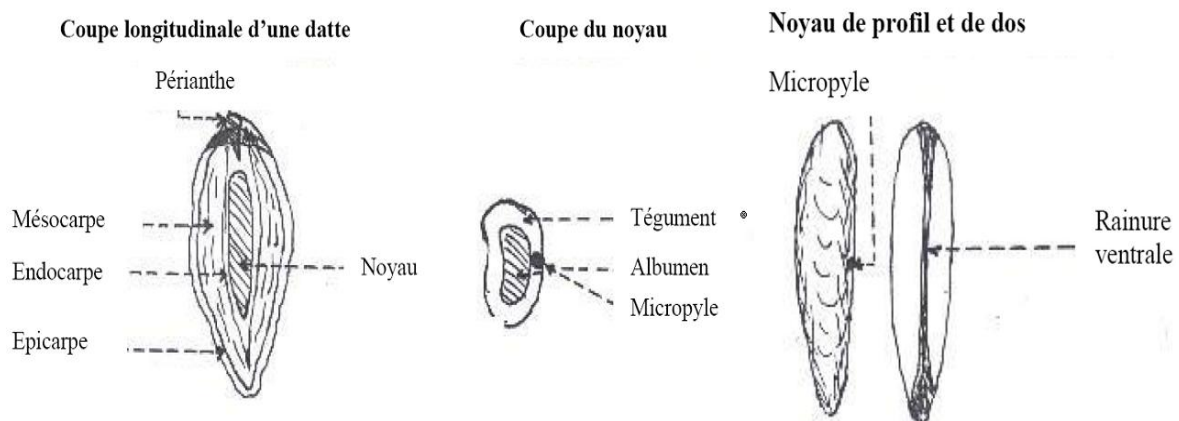
La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair. (Buelguedj,2001).

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

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

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

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



**Figure 1:** Datte et noyau du palmier dattier (DJERBI M., 1994).

### II. 3 Classification des dattes

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

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

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

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

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



**Figure 2 :** Classification de dattes selon leurs consistances (Absi., 2010)

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

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

**Tableau 1 :** Principales variétés de dattes algériennes et leur aire de culture (Dubost,1991).

Variétés	Consistance	Aire de culture	Utilisation
<i>Deglet-Nour</i>	Demi molle (T)	Bas Sahara	Export tout usage
<i>Ghars</i>		Mzab	
<i>Degla-Beïda</i>	Molle (P)	Idem	En pâte (pâtisserie)
<i>MechDegla</i>	Sèche (T)	Oued rhir	Farine
<i>Tante boucht</i>	Sèche (T)	Ziban	Farine
<i>Tatezuine</i>	Molle (P)	Ouargla Mzab	En pâte
<i>Bent</i>	Demi molle (P)	Ouargla Mzab	Fruit frais
<i>Keballah</i>		Ouargla Mzab	
<i>Tadala</i>	Molle (P)	Mzab Laghouat	Congelée
<i>Timjouhert</i>	Molle (N)	Mzab Gourara	Fruit frais

<i>Hmira</i>	Demi molle (N)	Touat, Saoura	Fruit frais
<i>Tegaza</i>		Tidikelt	Conservation
<i>Tazerzait</i>	Demi molle (N)	Sud ouest	Vente/sahel
<i>Ouarglia</i>	Demi molle (N)	Sud ouest	Vente
<i>Tim-nacer</i>		Sud ouest	Fruit frais
<i>Taker-boucht</i>	Demi molle (N)	Touat, Gourara	Vente/Sahel
<i>Aghrs</i>		Touat	Vente locale
	Demi molle (N)		Conservation
	Sèche (N)		
	Demi molle (T)		
	Sèche (T)		

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

T : Tardive (Période de récolte en Novembre).

## II.5-La composition biochimique

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- L'invertase : responsable de l'inversion du saccharose en fructose et glucose.
- La cellulase : elle décompose la cellulose en chaînes plus courtes.
- La pectinmethylesterase : elle convertit les substances pectiques insolubles en pectine plus soluble qui ramollit le fruit.
- La polyphénoloxydase : elle conduit au brunissement du fruit suite à l'oxydation des phénols (Yahiaoui., 1998).

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

-Les acides organiques : l'acide citrique, l'acide malique.....

-Les substances volatiles : l'éthanol, l'isobutanol, l'isopentanol.

-Les pigments : les caroténoïdes, la chlorophylle..... (Benchabane., 1996)

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

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

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

## **Chapitre II**

### **Polyphénol oxydase**

#### **1. Définition, classification et nomenclature**

##### **1.1. Définition**

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

##### **1.2 Classification et nomenclature**

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

L'o-diphénoloxydase qui appartient au groupe des oxydo-réductases a été définie par Dixon et Webb (1964) comme l'o-diphénol : oxygène, oxydoréductase (E.C.1.10.3.1.),le nom tyrosinase, très souvent donné à l'enzyme, était, par conséquent, en contradiction avec la nomenclature officielle. C'est pourquoi en 1972, cette nomenclature a été modifiée et le complexe nommé monophénol, dihydroxyphénylalanine : oxygène, oxydo-réductase (E.C.1.14.18.1.) (Martinez et Whitaker, 1995 ;Mesquita et Queiroz,2013)

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

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

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

##### **1.3 Distribution, localisation subcellulaire et rôle physiologique**

###### **1.3.1 Distribution et localisation subcellulaire**

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes et la proportion de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble peuvent être considérablement inégales. (Mayer et *all.*,2006). L'activité de PPO est très faible dans les jeunes plantes, souvent indétectable

(Mayer.,1979). Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux PPO de diverses sources telles que : les truffes (Miranda et *all.*,1996 ;Perez-Gilabert et *all.*,2001 ;Zarivi et *al.*,2003 ;Gouzi et *all.*,2013), les champignons (Papa et *all.*,1994.,Cheng et *all.*,2013 ), la banane (Sojo et *al.*, 1998., Ünal.,2007),l'artichaut (Ziyanet Pekyardimci.,2003 ;Quarta et *al.*,2013),la poire (ZiyanetPekyardimci.,2004 ;Kim et *al.*,2005), la pêche (José et *al.*,2014), la cerise (Kumar et *al.*,2008) ,l'abricot (Drardja et *all.*,2017), le piment royal (Cao et *all.*,2018) .

La PPO se trouve dans une variété désorganises subcellulaires telles que les peroxysomes, les mitochondries (Martinez et *al.*,1989 ;Webb et *all.*,2013).Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides., alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Whitaker et Lee,1995 ; Webb et *all.*,2013).

### **1.3.2 Rôle physiologique**

La localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara et Katoh.,1999). Il a été montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*). (Laxet Vaughn,1991)

Dans les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker, 1995). La PPO est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Fenoll et *all.*,2004). Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine (Steffens et *all.*,1998).

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

#### **1.4 pH et Température optimale**

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

La nature du substrat utilisé dans le dosage de l'activité est un autre facteur qui a une influence significative sur le pH optimum de l'enzyme ,par exemple, la PPO de persil (Yusufet Mustafa.,2012)présente une activité maximale à pH 8,5 avec le pyrogallol,mais un pH de 4 avec le 4-méthylcatéchol (Tableau I).Les valeurs de pH optimum en présence de même substrat vis-à-vis des PPO d'origine différente et sont également variables dont en présence de L-dopa,la valeur de pH optimum pour le persil égale à 4,5 (Doğruet Erat., 2012) tandis que pour celle de chèvrefeuille du Japon égale à 7,5.(Goyeneche et al ,2013).Les valeurs de pH optimums de la PPO est également exposé à des changements lorsqu'il est testé en présence d'un détergent, le comportement de la PPO de pomme en fonction de pH est modifié en présence de SDS ;quel que soit le substrat, l'activité de la PPO de pomme est inhibée à un pH acide et activé à un pH supérieur à 5,0 et ceci en présence de 3,5 mM SDS (Marques et al.,1995).

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

Chutintrasl et Noomhorm (2006), ont montré que l'activité PPO d'ananas, a été réduite d'environ 60% après une exposition à 40-60 °C, pendant 30 min. La valeur de la température optimale de la PPO dépendent notamment de substrat, du pH optimum, et également de de la source de l'enzyme. Elles varient entre 20 et 65°C.D'une façon générale, la température optimale peut varier en fonction de substrat, par exemple pour la PPO de radis (Goyeneche et al.,2013),des valeurs de températures optimales égales à 40 °C et 20°C, en présence de catéchol et pyrogallol ,respectivement, ont été obtenus.

#### **1.5 Spécificité de la PPO**

Les composés phénoliques sont des substances naturelles qui contribuent à la richesse sensorielle (couleur, goût, arôme et texture) associée à la qualité des fruits, toutefois, les PPO

des plantes présentent grandes spécificités vis-à-vis de ces composés et sont capables d'oxyder une variété de mono, di ou des polyphénols. (Es-Safi et *all.*,2003).

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

### **1.6 Affinité et efficacité**

La spécificité de l'enzyme est évaluée en estimant deux paramètres cinétiques : la valeur de  $K_m$  qui rend compte de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et la vitesse maximale de catalyse  $V_{max}$ . Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  de la PPO varient avec le type de substrat, le tampon, la concentration ionique, la température, la source d'enzyme, et la méthode utilisée pour son extraction (Doganet Dogan,2003 ;Ziyanet Pekyardimci,2004). Les valeurs de  $K_m$  dans la littérature varient généralement entre 7,4 $\mu$ M et 77mM, avec une meilleure affinité pour la PPO de persil vis-à-vis de pyrogallol comme substrat (Doğruet Erat,2012). L'affinité change avec le type de substrat utilisé et/ou même entre deux PPO de sources différentes vis à vis de même substrat. Pour la PPO de radis, par exemple, des valeurs de  $K_m$  différentes égales à 4,2 mM et 77 mM en présence d'acide gallique et d'acide caféique, respectivement, ont été estimées (Goyeneche et *all.*,2013).

### **1.7 Aspects cinétiques et thermodynamiques de l'inactivation thermique de la PPO**

Le traitement thermique est généralement considéré comme la méthode la plus efficace pour inactiver la PPO, inhibant entre autres le brunissement enzymatique (Wei et *all.*,2013). Les traitement thermiques peuvent, toutefois, être responsable des pertes de qualité sensorielle et nutritionnelle dans les fruits et légumes (Gnangui et *all.*,2009; Gouzi et *all.*,2012).

Dans le but de conserver la qualité, une approche visant l'optimisation du traitement thermique de fruits et légumes via l'adoption d'un modèle intégrant plusieurs paramètres de la cinétique d'inactivation des enzymes permet de prédire entre autres les changements ultérieurs de qualité durant le traitement et le stockage.

L'inactivation thermique des enzymes est souvent décrite en fonction des paramètres cinétiques comme le temps de réduction décimale (D), la constante d'inactivation (k), les valeurs (Z), les énergies d'activation ( $E_a$ ) et les paramètres thermodynamiques  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$ . La valeur D désigne le temps nécessaire pour réduire l'activité de la valeur initiale de 90%, la

valeur  $Z_T$  est la température nécessaire pour réduire la valeur de (D) par une unité de log (paramètre de sensibilité à la température), obtenue en traçant les valeurs de Log (D) en fonction des valeurs de températures correspondantes (Gouzi et al.,2012,Cheng et al.,2013).

Le paramètre  $Z_t$  (°C) est également utile pour apprécier la sensibilité de l'enzyme, plus la valeur est grande plus la PPO est d'autant sensible au traitement thermique (Cheng et al.,2013).

L'énergie d'activation est un autre paramètre très important reflétant le taux de l'énergie nécessaire pour assurer la stabilité de l'enzyme plus elle est grande plus l'enzyme est stable et vice versa (Gouzi et al.,2012).

## **1.8 Les effecteurs**

### **1.8.1 Les activateurs**

La PPO peut être activée par l'urée, par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), par les alcools, et les protéases (Seo et al., 2003 ,Gandía-Herrero et al., 2005), par un choc de pH acide et alcalin(Joy et al.,1995) et aussi par l'exposition aux acides gras dans les mélanges d'incubation, de même, l'addition des ions du  $Cu^{2+}$  dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (Fan et Flurkey.,2004).

Le SDS peut activer la PPO de diverses sources, y compris la PPO de champignon de Paris (*Agaricusbisporus*), Il a été également montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiée (Espinet Wichers.,1999.,Saeidian et Bahaaldi.,2013).

### **1.8.2 Les inhibiteurs**

Des millions de dollars perdus chaque année à cause d'une réaction très néfaste pour le marché des fruits et légumes « brunissement enzymatique ». Mal contrôlé, ce phénomène est responsable de plus de la moitié des pertes économiques dans ce secteur (Martinez et Whitaker.,1995, Kim et al.,2000). Une large gamme des composés est connue pour inhiber la PPO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source de l'enzyme, de la disponibilité de substrat ( $O_2$  et substrat phénolique), du pH et de la température (Arslanet Doğan.,2005). Plusieurs approches peuvent être utilisées pour diminuer ou prévenir le brunissement, comme examiné par McEvily et al.,(1992), les inhibiteurs disponibles pour éviter le brunissement lié au PPO peuvent être classés en six groupes en fonction de leur mode d'action:

-(1)- Agents Réducteurs (l'acide ascorbique et ses analogues, sulfites) (2) agents chélateurs (éthylènediaminetétraacétate (EDTA), diethyldithiocarbamate de sodium (DIECA),

l'azoture de sodium) (3) Les agents complexants (cyclodextrines, le chitosane) (4) acidulants (acide ascorbique, l'acide citrique, l'acide malique, l'acide phosphorique) (5) inhibiteurs enzymatiques (analogues de substrat, les halogénures) (6) traitements enzymatiques (protéases, o-méthyltransférase).

Ces composés diminuent ou inhibent le taux de réaction de brunissement par l'élimination d'un élément de réaction, le cuivre ou d'une réaction intermédiaire (O-quinones) (Vámos-Vigyázó,1981,Ferrar et Walker,1996,Nicolas et Billaud,2006 ;Gouzi et *all.*,2012).

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Matériels

### 1.1 Echantillonnage

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



**Figure 3 :** La variété de dattes «Deglet Nour »

### 1.2 Produits chimiques

Tous les produits chimiques sont fournis par fluka et les réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

Produit	Formule brute
Le phosphate de potassium	$\text{Na}^2\text{NPO}_4$
L'acétate de sodium	$\text{K}^2\text{HPO}_4$
Le pyrocatechol	$\text{C}^6\text{H}^6\text{O}^2$
L'acide ascorbique	$\text{C}^6\text{H}^8\text{O}^6$
L'acide citrique	$\text{C}^6\text{H}^8\text{O}^7$

**Tableau 2:** les produits utilisés dans l'étude pratique.

## 2. Méthodes

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

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

Les dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre. Une quantité suffisante de chair de dattes refroidie préalablement à 4°C sont dénoyées et découpées et broyées pendant 3min à l'aide d'un mixeur (warning commercial blender 800EG ,model BB 90E) avec un

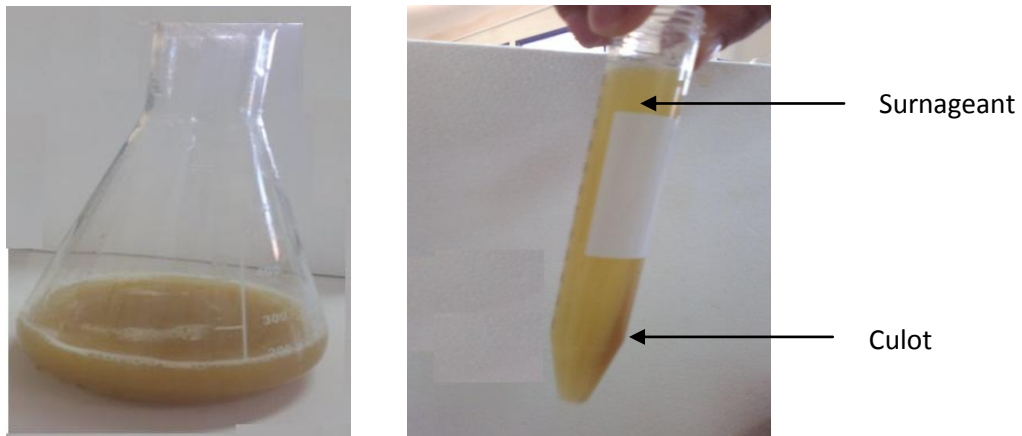
double volume d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de potassium 0.05M à pH 7.0. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min dans une centrifugeuse (Thermo Scientific Helios Spectrophotometer, England). Le surnageant récupéré représente l'extrait enzymatique brut (PPO) a été utilisé sur place pour le suivi de l'effet des facteurs physiques (Température et pH) et chimiques (Inhibiteurs) sur l'activité enzymatique de la PPO des dattes en condition réelle.

## 2.2 Mesure de l'activité de PPO

L'activité O-diphénol oxydase a été mesurée à 410 nm en utilisant le pyrocatechol comme substrat par la mesure directe de la formation du produit o-quinone à l'aide d'un spectrophotomètre à uv (Thermo Scientific Helios Spectrophotometer, England) en présence d'oxygène/aire (Fan et Flurkey, 2004).

La solution mère de pyrocatechol à 0.16 M est préparé dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5mM (Fan et Flurkey,.,2004).

Le milieu réactionnel contient 0,5 ml de substrat à 80 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 20 µl d'extrait enzymatique. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant 2 min après l'ajout de l'extrait enzymatique.



**Figure 5 :** Extrait brut de la datte (Deglet Nour) avant et après centrifugation.

## 2.3 Effet du pH

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

De même, l'effet combiné de pH avec le traitement thermique a été étudié en choisissant trois valeurs de pH (3,5 et 7) avec une gamme de la température comprise entre 30 et 75 °C. Le pyrocatechol à 80 mM est utilisé comme substrat.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

## 2.4 Etude de la stabilité thermique

L'activité pyrocatecholase résiduelle de l'extrait brut de la PPO est mesurée après 10 minutes d'incubation des tubes en verre de 1 mm d'épaisseur contenant 20 µl d'extrait enzymatique brut dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 à 75°C.

Après traitement thermique, les tubes sont refroidis rapidement dans l'eau froide et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à trois valeurs de pH (3 ; 5 et 7) en faisant varier également le temps.

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

$$AR^A (\%) = \left( \frac{A_t}{A_0} \right) \times 100$$

Où:  $A_0$  est l'activité avant traitement thermique

$A_t$  est l'activité après traitement thermique.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

## 2.5 Détermination des valeurs d'IC<sub>50</sub>

Cette valeur correspond à la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC<sub>50</sub>).

L'activité de la PPO a été mesurée à 30°C et pH 5 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs : d'acide ascorbique (0,1 à 0,5 mM), et l'acide citrique (15 et 30 mM) entre pour une concentration constante de pyrocatechol.

De même, l'effet mixte de la durée et la température ainsi que le pH sur la variation d'IC<sub>50</sub> a été étudié.

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (acide ascorbique et/ou citrique) (Chen et *al*, 1998). Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'activité de l'inhibiteur ( $A_0$ ) (Dogan et *all.*2005) selon l'équation suivante :

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

Avec :

$A_0$  : est l'activité diphérolase en absence d'inhibiteur

$A_1$  : est l'activité diphérolase en présence d'inhibiteur

Toutes les expériences ont été réalisées 3 fois.

## 2.6 Étude cinétique de l'inactivation thermique de la PPO

La cinétique d'inactivation thermique de la PPO a été étudiée par incubation des tubes à hémolyse de 1 mm d'épaisseur, contenant 2 ml d'extrait enzymatique brut dans un bain marie réglé aux différentes températures : 60°C, 65°C, 70°C et 75°C. Des prélèvements de 0.5 ml ont été effectués à différents intervalles fixes de temps, refroidis et leurs activités enzymatiques résiduelles ont été mesurées. Le pourcentage de l'activité résiduelle de la PPO est calculé par rapport à l'activité initiale de l'enzyme non traité thermiquement (Doğan et *all.*,2005).

Un model cinétique biphasique a été utilisé pour décrier le processus d'inactivation (Eq. 1) (Ling and Lund,1978). Un tel model a été observe chez les PPO de plusieurs sources (Rapeanu et *all.*, 2005; Terefe et *all.*, 2010; Lago et Noreña.2014).

$$A = A_S \exp(-k_S t) + A_L \exp(-k_L t) \quad (1)$$

Dont les constants d'inactivation de la fraction stable (s) et labile (L) sont respectivement,  $A_S$ ;  $A_L$  et  $k_S$ ;  $k_L$ .

L'estimation des constantes d'inactivation a été faite en exploitant l'équation d'Arrhenius (Eqs. 2, 3) :

$$\ln(k_L) = \ln(k_0) + \left[ \frac{-E_{aL}}{R} \left( \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (2)$$

$$\ln(k_S) = \ln(k_0) + \left[ \frac{-E_{aS}}{R} \left( \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (3)$$

Avec  $T$  et  $T_0$  sont les valeurs de température avant et après traitement, respectivement. (°K),  $E_{aL}$  et  $E_{aS}$  expriment les constantes d'énergie de la fraction labile et stable, respectivement (kJ/mol),  $R$  est la constante universelle de gaz (8.314 J/mol.K),  $k$  et  $k_0$  sont les constants d'inactivation ( $s^{-1}$ ) à  $T$  et  $T_0$  respectivement.

La valeur de la constant de Demi-vie ( $t_{1/2}$ ) est donné par l'expression (Eq. 4):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (4)$$

La Valeur de  $D$  est le temps (min) nécessaire pour diminuer 10% de l'activité initiale elle est inversement proportionnelle à la valeur de  $k$  selon l'équation suivante (5):

$$D = \frac{\ln(10)}{k} \quad (5)$$

La valeur de  $Z_T$  (Paramètre de sensibilité thermique) est calculé en exploitant la courbe de logarithme décimal de réduction du temps ( $\log D$ ) en fonction de température ( $T$  En °C) (Gouzi et al2012). Ainsi, pour une bonne compréhension de l'opération de dénaturation, les paramètres thermodynamiques à savoir (l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), l'enthalpie ( $\Delta H$ ) et l'entropie ( $\Delta S$ ), ont été estimées utilisant les équations suivantes (6, 7, 8) :

$$\Delta G = -R.T.\ln\left(\frac{k.h_p}{K_B.T}\right) \quad (6)$$

$$\Delta H = -E_a - R.T \quad (7)$$

$$\Delta S = \left(\frac{\Delta H - \Delta G}{T}\right) \quad (8)$$

Avec  $K_B$  la constant de Boltz mann's ( $1.3806 \times 10^{-23}$  J/K),  $h_p$  est la constant de Planck's ( $6.6262 \times 10^{-34}$  J.s), et  $k$  la constante d'inactivation pour chaque température ( $s^{-1}$ ).

## 2.7 Analyse des résultats expérimentaux

Toutes les analyses de ce travail ont été effectuées trois fois et la moyenne des résultats est présentée. La barre d'erreur représente l'erreur standard. L'analyse des données cinétiques observées a été effectué par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2 DTM (Jandel Scientific v2.03 Copyright©), EnzymeKinetics Pro et Origin 6.0.

# RESULTANTS ET DISCUSSION

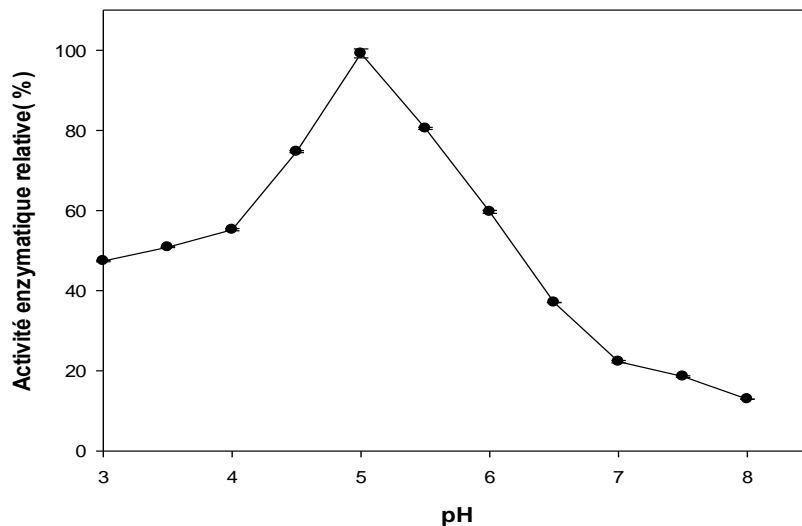
### III-1 Etude de l'effet du pH et de température

L'influence du pH sur l'activité pyrocatecholase des dattes Deglet Nour a été déterminée en mesurant les vitesses initiales d'oxydation du pyrocatechol à différents pH compris entre 3.5 et 8.0.

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

La figure (6) représente le profil de l'activité pyrocatechol oxydase relative en fonction du pH en présence de pyrocatechol comme substrat. Ainsi, une valeur de pH=5 correspondant au max de pic relativement proportionnelle à l'activité optimale a été déduite. De part et d'autre de ce pH, on assiste à une diminution de l'activité enzymatique qui peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation de la pyrocatechol et/ou des résidus d'acides aminés du site actif qui donnent naissance aux interactions défavorables entre le site actif de l'enzyme et le pyrocatechol. (Khatun et *all.*,2001).

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



**Figure 6 :** Variation de l'activité enzymatique de la PPO de « Deglet Nour » en fonction du pH. (En présence de pyrocatechol comme substrat) à 30°C.

Comme l'indique le Tableau (2), la PPO de datte est plus active dans les conditions acides que dans les conditions alcalines, ce qui est nettement différent par rapport à la plus part des PPOs qui montrent une activité PPO maximale dans le domaine de pH neutre ou proche de la neutralité. Au fait, l'activité faible de la PPO à pH 7.0 peut être exploitée, le brunissement enzymatique des dattes durant leur stockage ou leur transformation peut être contrôlée par l'utilisation des solutions neutres. Il dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique. (Whitaker,1994 ; Luh et Phithalopol,1972 et Kolcuoğlu et *all.*,2006).

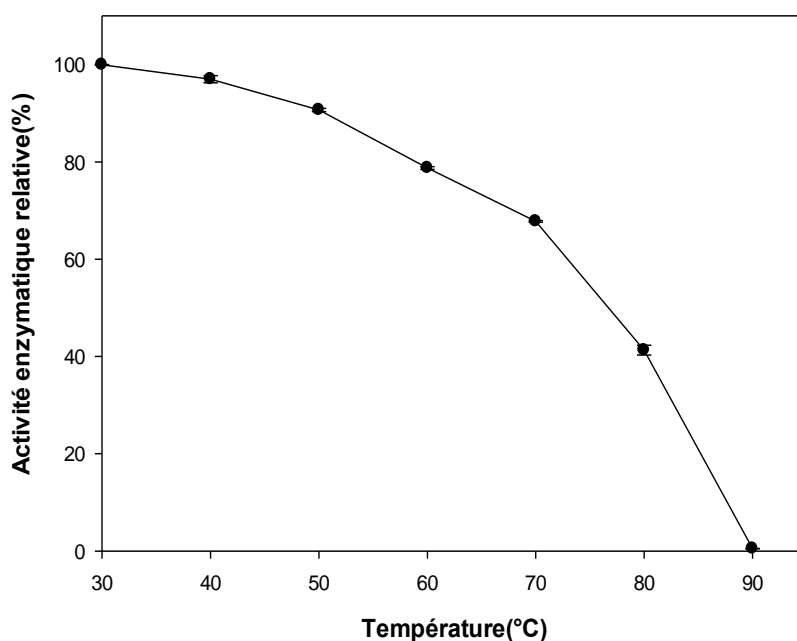
**Tableau 2** : les valeurs de pH optimal de la PPO obtenue à partir de différentes sources végétales.

Source	pH optimal	Référence bibliographique
Datte (Zahdiet Barhee)	6.8	Sachde et <i>al.</i> (1989)
Choux de Chine ( <i>Brassicarapa</i> L.)	5.0	Nagai et Suzuki. (2001)
Banane ( <i>Musa acuminata</i> )	6.5	Ünal (2005)
Fraise ( <i>Fragaria ananassa</i> )	5.0	Dalmadi et <i>al.</i> (2006)
Laitue ( <i>Lactuca sativavar, capitata</i> L.)	5.5	Gawlik-dziki et <i>al.</i> (2007)
Poire sauvage ( <i>Pyruselaegrifolia</i> )	6.0	Yerlitürk et <i>al.</i> (2008)
Fleur de viol ( <i>rapeflower</i> )	5.5	Sun et <i>al.</i> (2012)
Truffe ( <i>terfezialeonisTul</i> )	7.5	Maache et Bendjedia (2016)
Piment royal ( <i>myrica gale</i> )	6.0	Cao et <i>al.</i> , (2017)
Beaucarniea ( <i>Amorphophallus paeoniipholiu</i> )	6.0	Singh et wadhwa. (2017)
Datte Deglet Nour ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.)	5.0	<b>Notre travail</b>

### III-2 Etude de stabilité thermique

La Figure (7) représente les résultats de l'étude de la stabilité thermique de l'activité catécholase de la PPO de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L). On constate que l'activité catécholase est stable thermiquement vis-à-vis de gradient croissant de températures supérieures et que la vitesse d'inactivation thermique est plus grande au-delà de la température 50 °C. Les températures supérieures à 40°C provoquent une diminution progressive de l'activité enzymatique. Après 10 min de traitement à 55, 60 et 70°C, l'activité de la PPO est réduite par 18.1, 20.0 et 32.2 %, respectivement. Une activité catécholase résiduelle non négligeable d'environ 40% a été mesurée lorsque l'enzyme est incubée à 80°C. L'enzyme est presque totalement dénaturée à 90°C. Par conséquent, il semble que la PPO de

la variété Deglet Nour d'Algérie est plus thermostable par rapport aux PPOs obtenues à partir de la céleri (Yağar,2004). du raisin (*Vitisviniferasp. sativa*) (Rapeanu et *all.*, 2005) ; de la pomme (Eidhin et *all.*,2006) ; et de la fraise (*Fragariaananassa*) (Dalmadi et *all.*,2006), de la mangue (*Mangiferaindica* L. cv. "Tainong") (Wang et *all.*,2007), du champignon de Paris (*Agaricusbisporus*) (Gouzi et Benmansour,2007),. des truffes (*terfezialeonis*) (Maache et Bendjedia,2011), des fraises (Serradell et *all.*,2000).



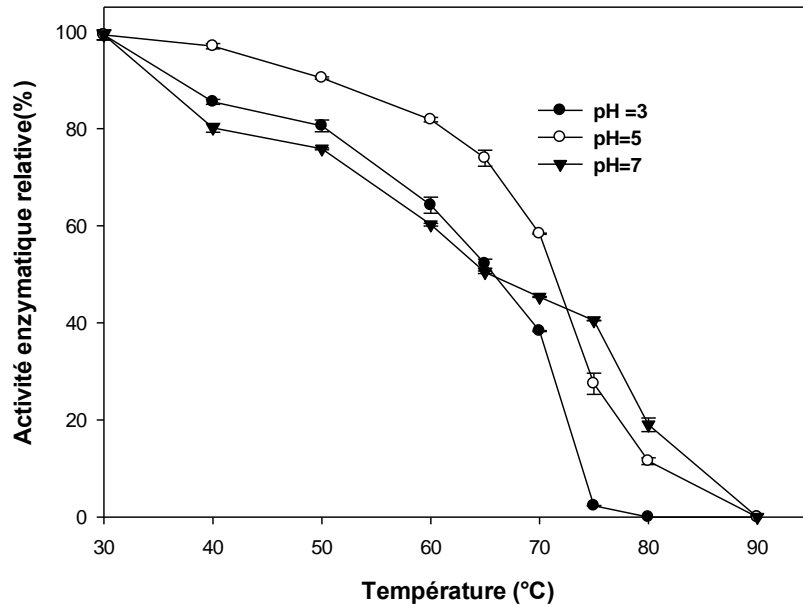
**Figure 7 :** Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes Deglet Nour après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrocatechol comme substrat).

De même, la variation de l'activité enzymatique de la PPO des dattes cv Deglet Nour en fonction de l'effet combiné de pH et température a été ainsi rapportée pour la première fois.

Un changement brusque dans les valeurs de ces deux paramètres physico-chimiques aura une conséquence sur la cinétique enzymatique.

Le suivi de l'activité enzymatique à trois valeurs de pH, du part et d'autre de la valeur pH optimum en fonction de changement de température permet d'une part d'avoir une idée sur le comportement cinétique de l'enzyme et d'autre part de valider les résultats de la stabilité décrits ci-dessus.

Les résultats ainsi obtenus sont récapitulés dans les figures (7 et 8).

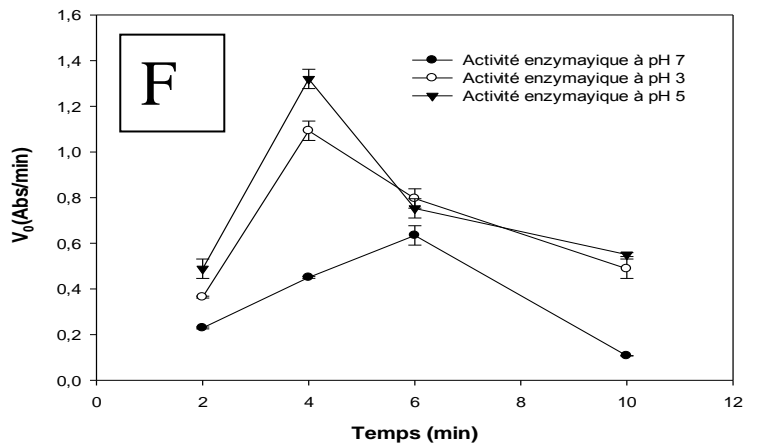
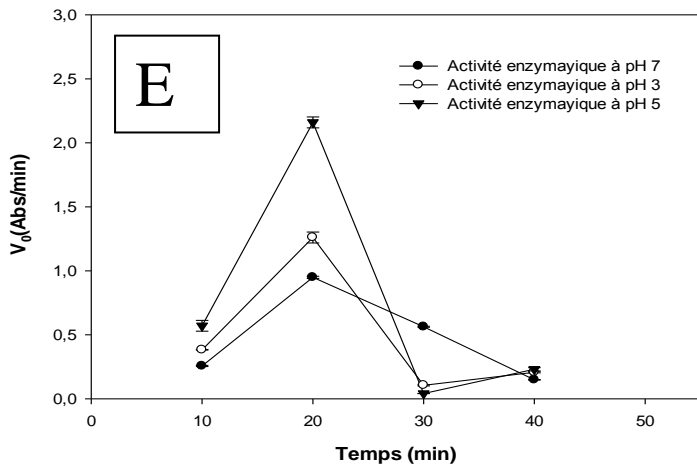
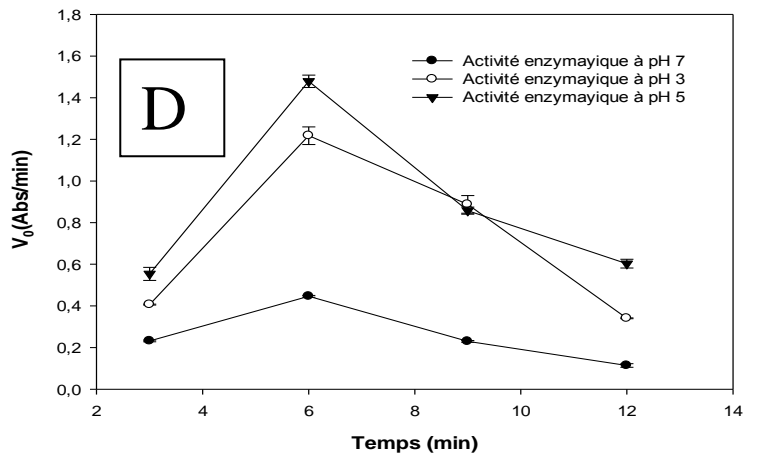
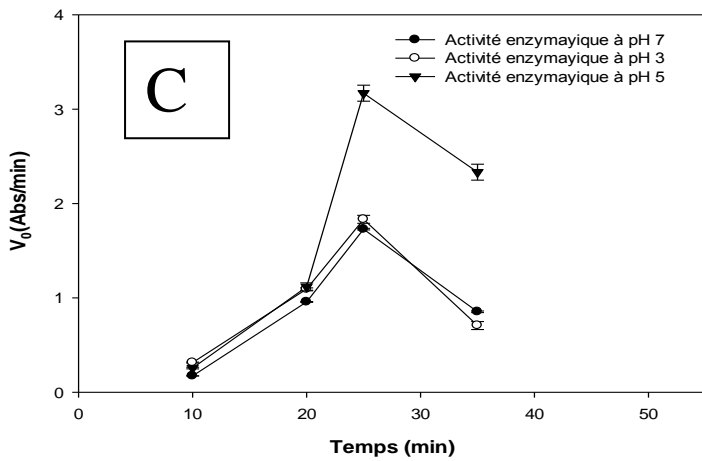
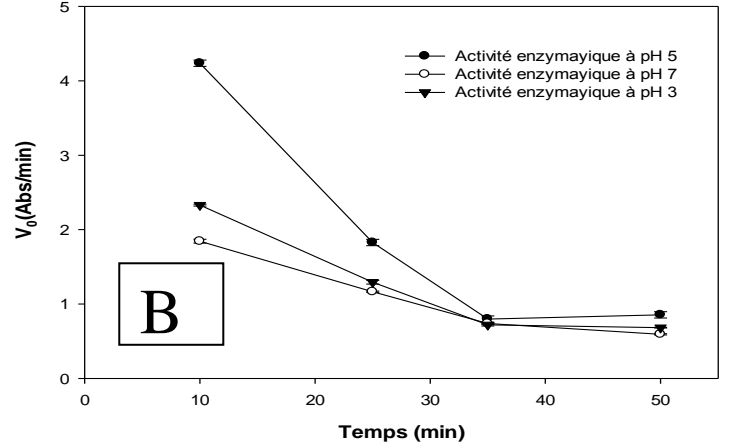
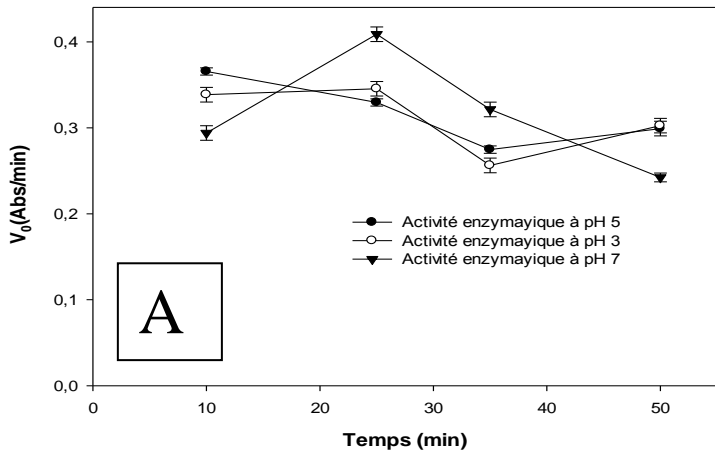


**Figure 8 :** Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrocatechol comme substrat) en fonction de pH.

Nous remarquons que la stabilité thermique est affectée avec le changement de pH ainsi que la durée du traitement à une température bien déterminée. Une meilleure stabilité semble avoir lieu avec la valeur de pH optimum (pH 5). Ceci implique que l'activité enzymatique nécessite la mise en place de plusieurs conditions favorables pour assurer une bonne stabilité et par conséquent un meilleur rendement. Dans laquelle l'activité enzymatique semble être optimale.

Yağar (2004) a montré que la PPO extraite à partir du céleri (*Apiumgraveolens* L.) perde environ 70% de son activité initiale à 50°C et environ 85% de son activité à 60°C pendant 30 min du traitement thermique (pH 7, tampon phosphate 0,05 M), 0.2 ml enzyme, catéchol à 80 mM).

**Figure 9:** stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes Deglet Nour (En présence de pyrocatechol comme substrat) en fonction de pH et du temps du traitement thermique. A (30°C) ;B (40°C) ;C (50°C) ;D (60°C) ;E (65°C) ;F (70°C) ;G(75°C)



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

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

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

Il est plus notable qu'à des températures relativement, élevées plusieurs liaisons faibles qui maintiennent la structure native de l'enzyme sont déstabilisées et solvatées et par conséquent l'enzyme devient inactive (Tuena de Gómez-Puyou et Gómez-Puyou,1998). La PPO n'est pas une enzyme extrêmement thermostable (Amiot et *all.*,1997).

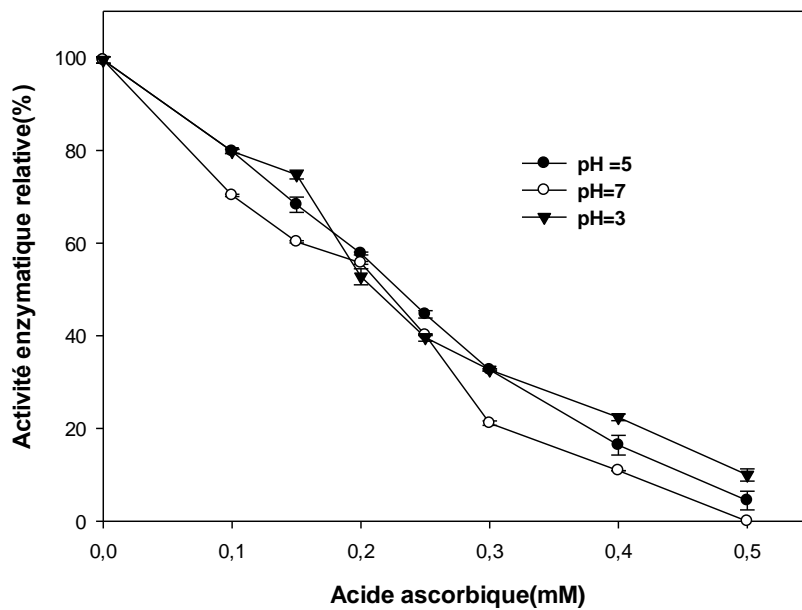
La tolérance thermique des enzymes dépend également de la spécificité de substrat, et au pH optimal, de la température, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et du cultivar (Vámos-Vigyázó,.1981;Yemenicioğlu et Cemeroğlu.2003). Elle peut être liée aussi à la maturité de la plante et des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

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

### **III-3 Détermination de la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique et l'acide citrique sur l'activité enzymatique de la PPO**

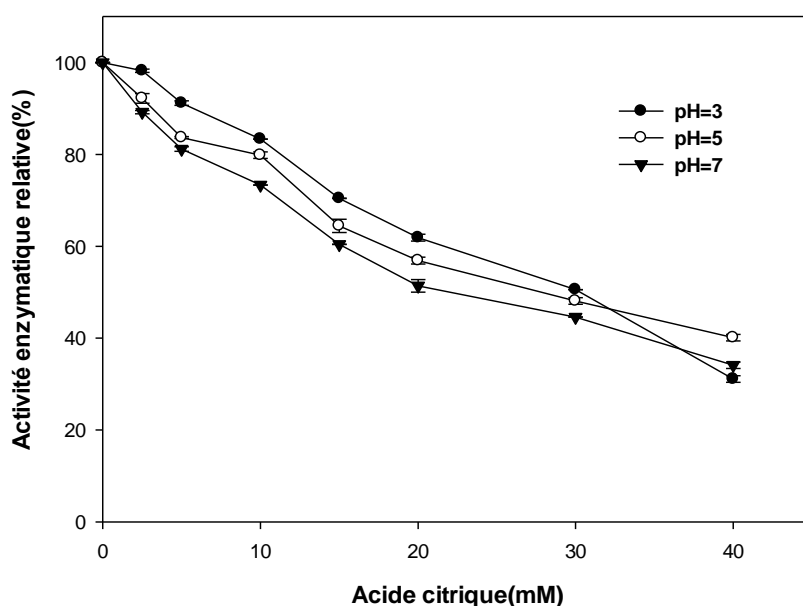
L'effet de différentes concentrations d'acide ascorbique et/ou l'acide citrique sur l'activité enzymatique de la polyphénol oxydase des dattes *Phoenix dactylifera L* cv Deglet Nour a été étudié en fonction de trois valeurs de pH (3, 5 et 7) afin d'évaluer également l'effet de changement de pH sur la variation de la valeur d'IC<sub>50</sub>.

Les résultats trouvés montrent une diminution progressive impliquant une sensibilité proportionnelle vis-à-vis de l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. La valeur d'IC<sub>50</sub> est définie comme étant la concentration de l'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique de la PPO par 50% (Chen et *all.*, 1998). On a obtenu des valeurs d'IC<sub>50</sub> valant 0,217mM ±0,09, 0,228mM ±0,06 et 0,210mM±0,07 en présence d'acide ascorbique à pH 3, pH 5 et pH 7, respectivement. (Figure10)



**Figure 10 :** L'effet de la concentration de l'acide ascorbique sur l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de dattes (*Deglet Nour*) en fonction de pH.

En outre, pour l'acide citrique, les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues sont ainsi récapitulées comme suites : 27,298mM ±0,81 ; 30,213 mM±1,011 et 22,157 mM±0,18 en présence d'acide citrique à pH 3, pH 5 et pH 7, respectivement.



**Figure 11 :** L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de dattes (*Deglet Nour*) en fonction de pH.

Pour mieux comparer l'effet de l'acide ascorbique et/ou l'acide citrique sur les PPO d'origine végétale et celle de datte Deglet Nour, les valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'acide citrique ainsi que l'acide ascorbique trouvées pour la PPO obtenues à partir de différentes sources végétales sont indiquées dans le Tableau (3) respectivement.

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

**Tableau 3 :** Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique comme inhibiteur trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats.

Source	Type de substrat phénolique	IC <sub>50</sub> (mM)	Référence
Datte ( <i>Phoenix dactylifera</i> )	Catéchol	0.228	<b>Notre étude</b>
Champignon de paris ( <i>Agaricus bisporus</i> )	Catéchol	0.147	Gouzi et <i>al.</i> ,2010
Champignon de paris( <i>Agaricus bisporus</i> )	Catéchol	1.00	Chen et <i>al.</i> 2003

Turffes ( <i>Terfezià leonis</i> )	Catéchol	8.2	Gouzi., 2014
Plaquemine	Catéchol	5.00	Arzu et al. 2004
Turffes ( <i>terfeziàleonis</i> )	L-Tyrosine	2.82	Djaïd et Kouidri 2015

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

**Tableau 4 :** Les valeurs d'IC50 de l'acide citrique trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats.

Sources	Type de substrat	IC <sub>50</sub> mM	Références
<i>PhoenixdactyliferaL</i> cvDegletNour	Pyrocatéchol	30,213	<b>Notre étude</b>
<i>PhoenixdactyliferaL</i> cvGhars	Pyrocatéchol	24,44±0,79	Lakhal et Ghafari .,2018
<i>PhoenixdactyliferaL</i> cvDeglet –Nour	Pyrogallol	50,08	Bouchareb.,2014
Truffe <i>TerfezialeonisTul</i>	L-tyrosine	9,46	Harrouz, Sahraoui, 2014
Champignon de Paris <i>Agaricusbisporus</i>	Pyrocatéchol	150	SON et al., 2000

D'après ces résultats obtenus, on constate qu'il y a plusieurs facteurs pouvant modifier la valeur d'IC<sub>50</sub> y compris la source d'enzyme et le type de substrat choisi lors la mesure de l'activité de la PPO des dattes ainsi que le pH choisi.

#### **4. Etude cinétique de l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase de *Phoenix dactylifera L.***

Les résultats observés de la cinétique d'inactivation thermique de la PPO des dattes « Deglet Nour » d'Algérie ont été ajustés par le modèle biphasique proposé.

Selon les valeurs du coefficient de corrélation des courbes ainsi obtenues ( $R^2$  0.97-0.99), le modèle biphasique ajuste parfaitement les résultats observés de la cinétique d'inactivation

thermique de la PPO, ceci confirme la présence d'une fraction thermostable et d'une fraction thermosensible de la PPO des dattes (Ünal et Şener,2006).

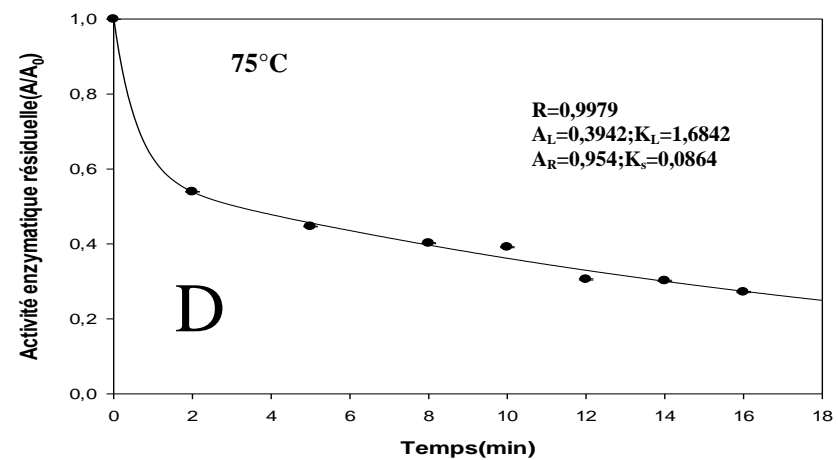
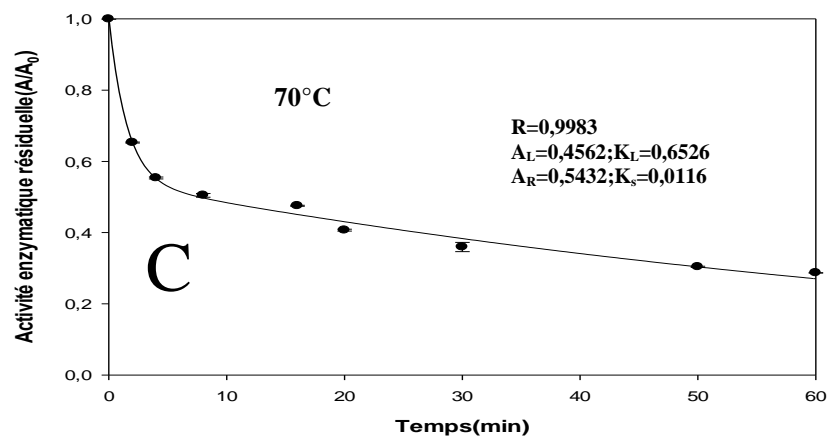
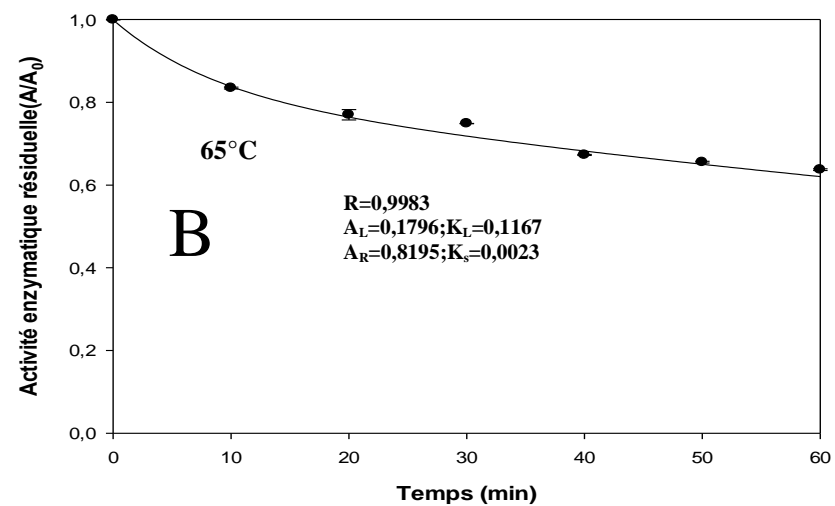
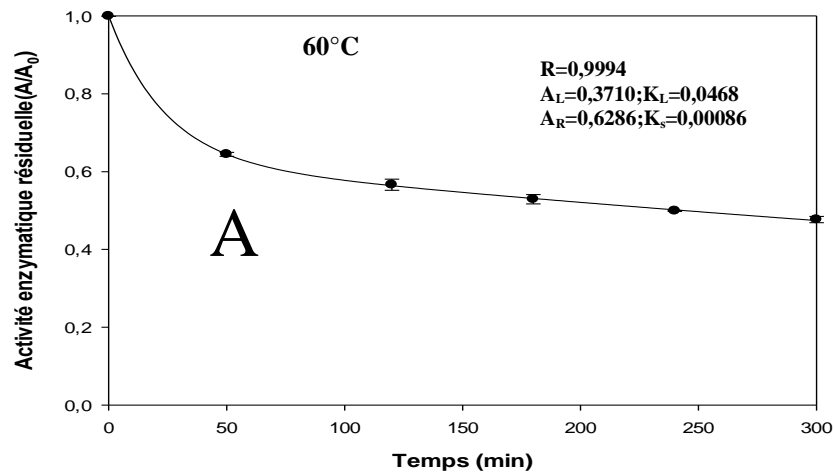
D'après la figure (13) remarqué que l'ampleur de la dénaturation de la PPO augmente avec la température et le temps du traitement (Patnaik,2002) et que l'activité enzymatique diminue de manière exponentielle avec le temps. La PPO semble être plus thermostable. Après 1 heure de traitement thermique à 65°C, l'enzyme retienne 60% de son activité initiale.

On assiste à une dénaturation thermique appréciable de l'enzyme qu'à partir de 70°C. Cependant, l'activité enzymatique résiduelle est environ 30% après 1 heure d'incubation de la PPO à cette température.

L'inactivation des enzymes est un processus chimique extrêmement complexe qui implique plusieurs phénomènes comprenant: l'agrégation, la dissociation en sous unité et la dénaturation (Ditchfield et *all.*,2006).

A des températures plus élevées, l'activité catalytique d'une enzyme diminue rapidement à cause de la destruction des liaisons non covalentes (Van der Waals, liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques et hydrophobes) qui sont maintiennent sa structure native de l'enzyme (Whitaker,1994 ; Vieille et Zeikus,2001).

Le Tableau (5) regroupe les valeurs des différents paramètres cinétiques estimés pour les deux fractions de la PPO thermostable et thermolabile à partir de la représentation graphique non linéaire de l'équation (1) des données de la cinétique de l'inactivation thermique de la PPO trouvés entre 60 et 75°C et à pression atmosphérique (Rapanu et *all.*,2005 ; Dalmadi et *all.*,2006).



**Figure 12** : Les graphes de l'inactivation thermique de l'extrait brut de la polyphénol oxydase de dans des températures comprises entre 60-75°C. Les conditions expérimentales sont : catéchol 20 mM, pH 5 (tampon acétate 0.05 M).

Tableau 5 : Les paramètres cinétiques estimés de l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase de  
à pH 5.

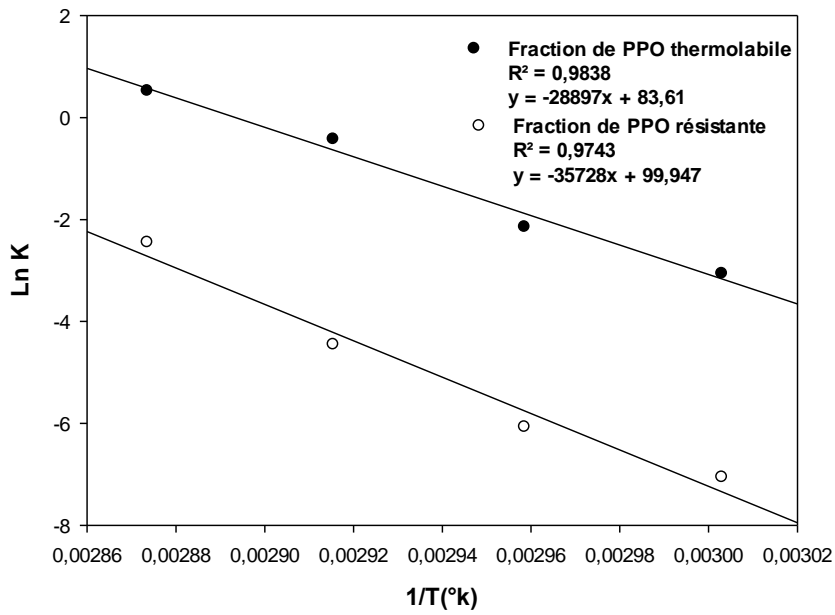
Température (°C)	A <sub>L</sub>	K <sub>L</sub> (min <sup>-1</sup> )	D <sub>L</sub> (min)	t <sub>1/2</sub>	A <sub>R</sub>	K <sub>S</sub> (min <sup>-1</sup> )	D <sub>S</sub> (min)	t <sub>1/2</sub>	R <sup>2</sup>
60	0,3710	0,0468	49,200	14,808	0,6286	0,00086	2677,424	805,985	0,9994
65	0,1796	0,1167	19,730	5,993	0,8195	0,0023	1001,123	301,368	0,9983
70	0,4562	0,6526	3,528	1,062	0,5432	0,0116	198,498	57,754	0,9972
75	0,3942	1,6842	1,367	0,411	0,954	0,0864	26,650	8,022	0,9959
<b>E<sub>aL</sub>=240,49 kJ/mol</b>					<b>E<sub>aS</sub>=297,04 kJ/mol</b>				
<b>Z<sub>T</sub>=9,23</b>					<b>Z<sub>T</sub>=7,45</b>				

On remarque d'après le Tableau (5) que les valeurs de la constante de vitesse d'inactivation (k) et D augmentent et diminuent respectivement avec l'augmentation de la température indiquant que la PPO s'inactive aux températures élevées (Gheibi et *all.*,2006 ; Gnanoui et *all.*,2009).

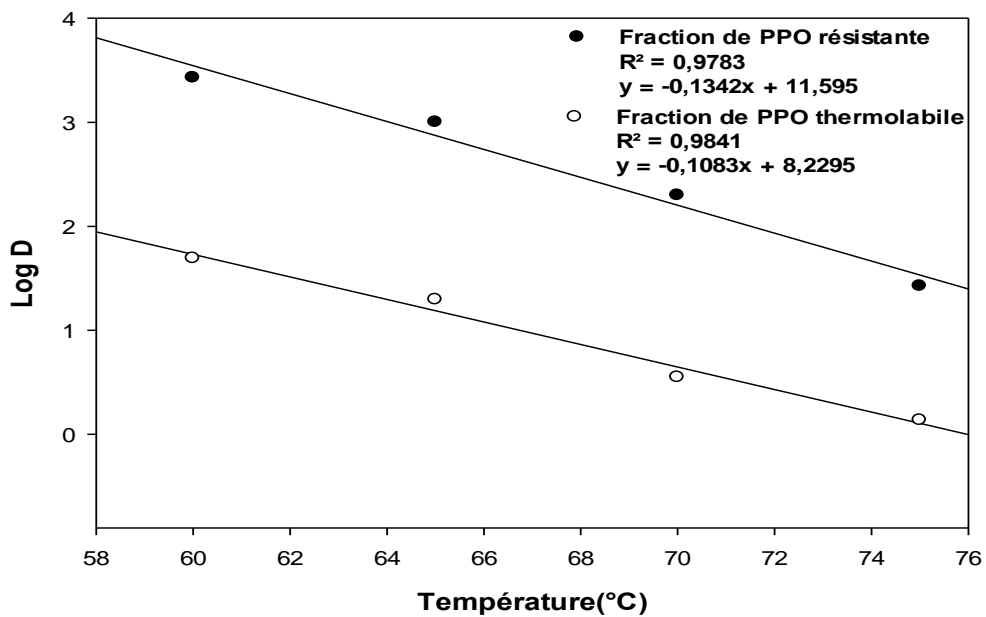
Le t<sub>1/2</sub> et D sont deux paramètres importants, utilisés souvent pour caractériser la stabilité d'une enzyme (Ünal et Şener,2006 ; Marangoni,2003).

La PPO des dattes est plus thermostable que les PPOs du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (t<sub>1/2</sub> = 11.08 min; 60°C, t<sub>1/2</sub> = 0.56 min; 70°C) et mais moins thermostable par rapport à la PPO obtenu à partir de l'ananas (t<sub>1/2</sub> = 79.67 min; 60°C, t<sub>1/2</sub> = 63.01 min; 70°C) (Chutintrasria et Noomhorm,2006).

La Figure (13) représente le logarithme népérien de la constante de vitesse d'inactivation thermique en fonction de l'inverse de la température absolue pour les deux fractions thermolabile et thermostable de la PPO des dattes.



**Figure 13 :** Graphique d'Arrhenius de la vitesse d'inactivation thermique du polyphénol oxydase des deux fractions (stable et résistante) des dattes.



**Figure 14 :** L'effet de la température sur la valeur-D de l'inactivation de l'activité polyphénol oxydase des deux fractions (stable et résistante) des dattes.

Les valeurs d'énergie d'inactivation estimées à partir de la pente des deux graphiques d'Arrhenius pour la fraction thermolabile et thermostable sont respectivement:  $E_{aL} = 240.49$  kJ/mol et  $E_{aS} = 297,04$  kJ/mol. Ces deux valeurs d'énergie d'activation sont différentes par rapport à celles trouvée par Sachde et *all.* (1989) (112.86 KJ/mol), mais sont presque similaires par rapport à celles obtenues par Rapanu et *all.*, (2005) pour la fraction thermolabile (285.5 kJ/mol) et thermostable (307.2 kJ/mol) de la PPO du raisin.

Des grandes valeurs d'énergie d'activation ( $E_a$ ) reflètent une grande sensibilité de la PPO au changement de la température (Weemaes et *all.*, 1998; Sachde et *all.*, 1989 ; Chutintrasri et Noomhorm,2006 ; Ünal et Şener,2006). Par conséquent la PPO des dattes est plus thermostable que les PPOs de champignon de Paris (208.37 kJ/mol) (Araar et Ziani,2009), du raisin blanc (var. *Victoria*, l'Afrique du sud) (221.5 kJ/mol) (Rapeanu et *al.*,2006), et du raisin de table (*Crimson Seedless*) (295.5 kJ/mol) (Fortea et *all.*, 2009), mais moins thermostable par rapport aux PPOs de pêche (502 kJ/mol) (Chan et Yang., 1971) et de banane (413 kJ/mol) (Dimick et *all.*,1951).

La Figure (14) montre le graphique du Log D et la température pour les deux fractions de la PPO thermolabile et thermostable. La pente de ces courbes représente  $-1/Z_T$ .

Les valeurs  $Z_T$  de la PPO de Deglet Nour d'Algérie ainsi calculées sont :  $Z_T = 9.31^\circ\text{C}$  pour la fraction labile et  $Z_T = 7.37^\circ\text{C}$  pour la fraction stable.

Les valeurs de  $Z_T$  trouvées pour d'autres PPOs obtenus à partir des fruits sont comprises entre  $8.5$  à  $10.95^\circ\text{C}$  (Ünal et *all.*,2007 ; Râpeanu et Bulancea,2005 ; Ünal et Şener,2006 ; Rapeanu *et al.*,2006 ; Strubiet *all.*,1975; Vámos-Vigyázó,1981).

Les différences dans la cinétique d'inactivation de la PPO dans différent produits, peut être due à la différence de leurs composition, qui reflet leur variété et due aussi aux conditions climatiques où ils ont développés (Chutintrasri et Noomhorm,2006).

En ce qui concerne l'aspect thermodynamique de la dénaturation de la PPO induite par l'augmentation de la température, les paramètres thermodynamiques ; l'enthalpie ( $\Delta H$ ), l'entropie ( $\Delta S$ ) et l'énergie libre ( $\Delta G$ ) ont été calculés en utilisant le pyrocatechol, comme substrat dans une intervalle de température comprise entre  $60-75^\circ\text{C}$ . Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans le tableau (6). L'énergie libre de Gibbs estime la limite de la barrière d'activation de l'enzyme,  $\Delta H$  l'enthalpie c'est la mesure de liaisons covalentes cassées, et  $\Delta S$ , l'entropie, implique le degré de distordre, de l'inactivation thermique de la PPO de Deglet Nour.

**Tableau 6 :** Les paramètres cinétiques estimés (L'énergie libre de Gibbs,  $\Delta H$  l'enthalpie et  $\Delta S$ , l'entropie) de l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase des dattes deglet nour à pH 5.

Température (°C)	Pyrocatechol					
	$\Delta H$ (kJ/mol)		$\Delta G$ (kJ/mol)		$\Delta S$ (J/mol/K)	
	$\Delta H_L$	$\Delta H_S$	$\Delta G_L$	$\Delta G_S$	$\Delta S_L$	$\Delta S_S$
60	237,7±2.0	294,2±1.0	109,4±0,2	120,5±0,3	385,1±5.0	521,7±5.0
65	237,6±2.0	294,2±1.0	108,6±0,2	119,6±0,1	382,0±4.0	516,6±4.0
70	237,6±2.0	294,2±1.0	105,3±0,3	116,8±0,2	385,7±5.0	517,1±4.0
75	237,6±2.0	294,1±1.0	104,1±0,1	112,7±0,1	383,4±4.0	521,2±4.0
Moyenne	950,5±2.0	1176,1±1.0	427,4±0,2	469,6±0,2	1536,2±4.5	2076,6±4.0

Les valeurs de  $\Delta G$  pour la fraction stable et labile sont comprises entre 104 à 120,5 kJ/mol, dans le même ordre de magnitude prévalons de la dénaturation des protéines et/ou enzymes. (100 kJ/mol) (Gouzi et al., 2012).

La diminution significative des valeurs de  $\Delta G$  de la PPO de Deglet Nour implique une déstabilisation de cette protéine avec augmentation de température (Table 6). Les valeurs de  $\Delta G$  obtenues pour la PPO de Deglet Nour sont comparables à celles obtenues pour PPOs de *Vanilla bean* (97.58 kJ/mol) (Waliszewski et al., 2009), des champignons (103 kJ/mol) (Liu et al., 2013).

Pour l'enthalpie, les valeurs de  $\Delta H$  pour la fraction stable sont supérieures à celles de la fraction labile. Les valeurs élevées de  $\Delta H$  sont proportionnelles au nombre des liaisons non-covalente dans l'enzyme ce qui offre plus de stabilité (Bruins et al., 2001).

Les valeurs d' $\Delta H$  trouvées dans cette étude sont élevées par rapport à celles rapportées par *Vanilla bean* PPO for (89.24 kJ/mol) (Waliszewski et al., 2009) et moins de celles de *Victoria grape* PPO (250 kJ/mol) (Râpeanu et al., 2006).

Toutes les valeurs de  $\Delta S$  pour l'inactivation de la PPO de Deglet Nour comprises dans l'intervalle de température entre 60 to 75°C étaient positives indiquant la présence d'un processus de ségrégation significatif avec l'augmentation de désordre, ou aléatoirement, le système enzyme/solvant lors de dénaturation, ce qui induit la réduction de valeur de  $\Delta G$  (Liu et al., 2013). En général, l'activation entropique a un rôle primordial dans l'inactivation thermique des protéines dans les solutions aqueuses dont une alternance aura lieu entre l'état enthalpie plus élevé et petite entropie à un état inverse avec une basse enthalpie et grande entropie (Gouzi et al., 2012).

# CONCLUSION

Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de ce mémoire s'est focalisé d'une part sur l'étude de l'effet de pH et de température sur la PPO extraite de la variété algérienne des dattes « *Phoenix dactylifera* L cv DegletNour » et d'autre part nous visons un approfondissement des connaissances dans le domaine agroalimentaire via la mise en place des moyens préventifs de brunissement enzymatique, dont nous avons étudié l'effet de deux inhibiteurs chimiques de synthèse avec de même une étude thermodynamique complémentaire via le suivi de l'inactivation thermique de la PPO en fonction du temps.

Ce qui nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes:

1-L'activité catéchol oxydase est maximale à pH **5** pour la variété : Deglet-Nour, de part et d'autre de ce pH, on assiste à une diminution de l'activité enzymatique.

2-L'étude de la stabilité thermique de l'activité de la PPO montre que sa température optimale apparente est comprise entre **30°C** et **40°C**. Une activité catéchol oxydase résiduelle non négligeable a été mesurée lorsque l'enzyme est incubée à 80°C. L'enzyme est presque totalement dénaturée à 90°C. Par conséquent, la PPO extraite de Deglet-Nour est plus thermostable.

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

4-D'après les résultats de calcul de l'IC 50, nous constatons qu'il y a plusieurs facteurs pouvant en la modifier y compris la source d'enzyme et le type de substrat choisi lors la mesure de l'activité de la PPO des dattes ainsi que le pH choisi

5-D'après les valeurs d'IC<sub>50</sub>, nous pouvons déduire que l'acide ascorbique est 100 fois plus puissant que l'acide citrique, ce qui rend leur utilisation très approprié pour le contrôle de brunissement enzymatique

6-Selon les valeurs du coefficient de corrélation des courbes ainsi obtenues le modèle biphasique ajuste parfaitement les résultats observés de la cinétique d'inactivation thermique de la PPO, ceci confirme la présence d'une fraction thermostable et d'une fraction thermosensible de la PPO des dattes

7-L'inactivation des enzymes est un processus chimique extrêmement complexe qui implique plusieurs phénomènes comprenant : l'agrégation, la dissociation en sous unité et la dénaturation.

8-Les paramètres cinétiques d'inactivation(K, D, t<sub>1/2</sub>, Zt) ainsi que les paramètres thermodynamiques(ΔG, ΔS, ΔH) ont été ainsi calculés afin de comprendre le processus

d'inactivation thermique et la corrélation entre stabilité thermique au fur et à mesure que la température augmente et la durée d traitement se prolonge.

Comme perspectives, nous proposons :

1-De faire une étude comparative entre les différentes variétés des dattes en étudiant l'effet de la source sur les valeurs des conditions optimales.

2-De faire une purification et caractérisation biochimique approfondie sur le PPO de cette source d'excellence.

3-d'approfondir l'étude de l'inactivation thermique en combinant cette fois ci l'effet de quelques inhibiteurs.

4-D'étudier l'effet des autres moyens de contrôle physique tels que la pression et/ou l'ultrason.

RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

- **Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J.**(2010). Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*. 55: 2363–2367
- **Aka,J.P.,Courtois,F.,Louarme,L.,Nicolas.,J,Billaud,C.**(2013).Modelling the interactions between free phenols, L-ascorbic acid, apple polyphenoloxidase and oxygen during a thermal treatment. *Food Chemistry* 138.1289–1297.
- **Ameer, Q & Adeloju, S.B.**(2009). Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B*. 140: 5–11
- **Anosike E.O & Ayaebene A.O.**(1982). Properties of polyphenol oxidase from tubers of the Yam (*Dioscorea bulbifera.*) *Phytochemistry*, 21, 1889-1893.
- **Anthon G. E & Barrett D. M.**(2002). Kinetics parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4119-4125.
- **Arslan O., Doğan S.**(2005). Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 85, 1499-1504.
- **Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I.**(1997). Polyphenol oxidase from *Allium* sp.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.45:2861–2863.
- **Arzu Z., Colak A., Dincer B., Guner S.**(2004). A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae). *Food Chemistry.*, 85, 431–437.
- **Asanuma,M,,Miyazaki,I, Ogawa,N.**(2003).Dopamine or-L-DOPA-induced neuro toxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 5 (3):165-176
- **Asav, E., Yorganci, E.,Akyilmaz,E.**(2009).An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.
- **Aydemir,A.**(2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chem.*, 87, 59-67.
- **Aydemir, T.**(2010). Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus officinalis* L. *International Journal of Food Properties*. 13: 475-485.
- **Aydemir T., Akkanli G.**(2006). Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens* L.) and the investigation of

the effects on the enzyme activity of some inhibitors. J. Food Sci. Tech., 41, 1090–1098.

- **Bach,A., Chodat,R.,(1904).**Studies about the function of peroxides in the Chimes of the living cell. II About peroxide formation in living cells. Ber., 35, 2466-24.
- **Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E. And Mayer, A.M.(1977).**Olive catechol oxidase-changes during fruit development. J. Sci. Food Agric. 28, 545-550
- **Benjakul, S., Visessanguan W., Tanaka M.(2005).** Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*).” Journal of Food Biochemistry. 29: 470-485.
- **Bertrand G.(1896 ).**Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelque champignon. C. R. Acad. Sc., 123, 463-465.
- **Bordner A., Nelson J.M.,(1939).** On the oxidation of p-cresol by means of tyrosinase. J. Amer. Chem. Soc., 61, 1507-1513.
- **Bradai,L., Bissati,S., Chenchouni,H.(2014).** Desert Truffles of the North Algerian Sahara: Diversity and Bioecology. Emir. J. Food Agric. 425-435.
- **Chan, H. T & Yang, H. Y.(1971).** Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the mcfarlin cranberry. Journal of food science. 35: 169.
- **Chang-Kui D,, Kazuo C, Yoshinori U, Chien Y.W.,(2002).** Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. Food Chemistry 76,213–218.
- **Chazarra,S., Cabanes,J., Escribano ,J., García-Carmona,F.(1997).** Kinetic study of the suicide inactivation of latent polyphenoloxidase from iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) induced by 4-tert-butylcatechol in the presence of SDS. Biochim Biophys Acta. 1339(2):297-303.
- **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.
- **Cheng,X.-F., M.,Zhang,M.,Adhikari,B.(2013).**The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments, Ultrasonics Sonochemistry 20,674–679.
- **Chutintrasri,B & Noomhorm,A.(2006).** Thermal inactivation of polyphenol oxidase in pineapple puree. Lebensmittel-wissenschft., 36, 492-495.
- **Claus, H & Decker,H.(2006).**Bacterial tyrosinases. Systematic and Applied Microbiology,29:13-14.

- **Cullere L., Ferreira, V., Chevret, B., Venturini, M. E., Sanchez-Gimeno, A. C., Blanco, D.** (2009). Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography–olfactometry. *Food Chem* 122:300–306.
- **Cowan, M., Horst, E. A., Luengpailin, S., Doyle, R. J.** (2000). Inhibitory effects of plant polyphenoloxidase on colonization factors of *Streptococcus sobrinus* 6715. *Anti microbial Agents and Chemotherapy* 44 (9):2578-2580.
- **Cuff M., Millerki E., Van Holdeke, Hendrick Sonwa.** (1998). Crystal structure of a functional unit from *Octopus dofleini* hemocyanin. *J Mol Biol* 1998 ;278 :855–70
- **Cui, Y., Barford, J. P., Renneberg, R.** (2006). A disposable, screen-printed electrode for the ampero-metric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*. 22 : 1279-1281.
- **Dalmadi, I., Rapean, G., Loey, A., Smout, C., Hendrickx, M.** (2006). Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. *Journal of Food Biochemistry*, V 30, p 56–76.
- **Dimick, K. P., Ponting, J. D., Makower, B.** (1951). Heat inactivation of polyphenol oxidases in fruit purees. *Food Technol.* 6: 237–240.
- **Díez J, Manjón JL, Martín F.** (2002). Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania* host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia* 94: 247–259,
- **Dogan S., Turan P., Dogan M., Alkan M., Arslan O.** (2007). Inhibition Kinetic of *Ocimum basilicum* L. Polyphenol Oxidase. 5, 46.
- **Dogan, M & Dogan, S.** (2003). Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. chaubardii*). *J Food Chem*. 39: 1-9.
- **Dogan, S., Turan, Y., Erturk, H., Arslan, O.** (2005). Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem.*, 53, 776–785.
- **Dođru, Y. Z. & Erat, M.** (2012). Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum*, *Apiaceae*) *Food Research international*, 49, 411-415

- **Duangmal, K., Owusu Apenten, R.K.**(1999). A comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). Food Chem. 64:351-359.
- **Dundar,A., Faruk,O, Acay,H, Okumus,V, Ozdemir,S, Yildiz,A** (2012) Antioxidant properties,chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (Chatin) from Turkey. FoodSci Technol Int 18:317–328
- **Duran,N.,Esposito,E.**(2000).Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. Appl. Catal. B Environ. 28: 83–99.
- **Eicken, C., Krebs, B .,Sacchettini, J.C.**(1999).Catechol oxidase:structure and activity.Catalysis and regulation.Current Opinion in Structural Biology. 9: 677-683.
- **Eidhin, N., Myrphy, E., O’Beirne, D.**(2006). Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh .cv Bramley’ Seedling) purification strategies and characterization. Journal Of Food Science. 71: 51-58.
- **Emilia ,S., Deirdre ,N ., Charlotte ,S C., Jacob, N ., Anne ,L. ,Sonia, Ha., Eric ,R., David ,O., Johanna ,B., Kristiina.**(2007). Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. Journal of Biotechnology 130, 471–480
- **Espin,J.C.,Morales,M.,& Varon,R,**(1996).Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and di-phenolase activities of pear polyphenoloxidase. J.FoodSci.61(6),1177.
- **Erat,M.,Nuri,Y.Gülşah,S,A.,Demirkol,A.**(2010). Partial characterization of polyphenol oxidase from a hybridized wheat (*Triticum aestivum L.*) European Food Research and Technology.23,6,899-905.
- **Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F.** (1997). Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. J. Agric. Foo Chemistry. 45: 1090-1094
- **Espin, J.C. & Wichers, H.J.**(1999). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS).Kinetic properties of the SDS-activated isoform. J. Agric. Food Chem. 47, 3518-3525.
- **Es-Safi, N.E., Cheynier, V.,Moutounet, M.**(2003).Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. J Food Comp Anal. 16:535–553.

- **Eze, S., Chilaka, F.C., Nwanguma, B.C.**(2010). Studies on Thermodynamics and Kinetics of Thermo-Inactivation of Some Quality-Related Enzymes in White Yam (*Dioscorea rotundata*). J Thermodyn Catal.
- **Fan, Y & Flurkey, W.H.**(2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portabella mushrooms. Phytochemistry. 65: 671-678.
- **Fante, L., & Zapata Noreña, C. P.** (2012). Enzyme inactivation kinetics and colour changes in Garlic ( *Allium sativum* L.) blanched under different conditions. Journal of Food Engineering, 108(3), 436 e 4 43.
- **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.(1999). Microorganisms as potential source of novel diphenol oxidase inhibitors. J. Food Biochem., 23, 1-15.
- **Fortas., Z., Gérard ,C.**(1992). Effet des conditions de culture sur la mycorhization de l'*Helianthemum guttatum* par trois espèces de Terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. Canadian Journal of Botany.,70(12): 2453-2460.
- **Fortea, M.I., Lopez-Miranda, S., Serrano-Martinez, A., Carreno, J And Nunez-Delicado, E.** (2009). Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (*Crimson seedless*). Food Chemistry. 113: 1008-1014.
- **Fujita, S., Saari, N., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N., & Tono, T.**(1995). Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). Journal of Agricultural Food Chemistry. 43(113)1138–1142.
- **Gandía-Herrero *Dioscorea cayenensis-rotundata* cv longbô, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F And Escribano, J.**(2005). Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. Biol. Chem. 386: 601-607.
- **Garcia-Borron ,J.C., Solano F.**(2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. Pigment Cell Res. 15: 162-173
- **Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., & Swieca, M.**(2008). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *Capitata* L.). *Food Chemistry*. 107: 129–135.

- **Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G.**(2010). Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci.* (3):369-385
- **Gioacchini, A. M., Menotta, M., Bertini, L., Rossi, I., Zeppa, S., Zambone Ili, A.** (2005). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , 19, 2365.
- **Gnangui,S,N.,Dué, E. A.,N’guessan Kouadio, J-P. E.,Kouamé, L. P.** (2009). Effect of heat treatment on edible yam polyphenol oxidase activity: kinetic and thermodynamic analysis. *Journal of animal & plant sciences.* 2,( 3),128 – 137.
- **Golan-Goldhirsh, A., Whitaker, J. R., Kahn, V.**(1984). Relation between structure of polyphenol oxidase and prevention of browning. *Adv. Exp. Med. Biol.*177:437-456.
- **Golbeck, J.H & Cammarata, K.V.**(1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67: 977-984.
- **Goldfeder,M., Kanteev,M., Adir,N., Fishman,A.** (2013).Influencing the monophenolase/diphenolase activity ratio in tyrosinase. *Biochim Biophys Acta.* 1834:629–633
- **Gouzi, H & 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., Coradin T., Delicado E.M., Ünal U., Benmansour A.,**(2010). Inhibition Kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach Polyphenol Oxidase. *The Open Enzyme Inhibition Journal.*, 3, 1-7.
- **Gouzi H.,Depagne C., Benmansour, A., Coradin .**(2013). First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle(*Terfezia leonis Tul.*) and its thermal behavior. *Eur Food Res Technol* .
- **Gouzi, H., Depagne, C., & Coradin, T.** (2012). Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 500–506.
- **Golan-Goldhirsh A. Whitaker J.R.; Kahn, V.**(1984).Relation between polyphenol oxidase and prevention of browning. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety*; Friedman, M., Ed.; Plenum: New York, 457-495.
- **Goyeneche,R., Di Scala,K , Roura.**(2013).Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish(*Raphanussativus var.sativus*) *Food Science and Technology.*(54), 57-62

- **Halaouili, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., Lomascolo, A.,(2006).** Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics,bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 100, 219–232
- **Haldane, J.B.S.(1930).** The enzymes. Green and Co Ed, Londres.
- **Hall, I. R., Brown, G. T., & Zambonelli, A. (2007).** Taming the truffle. Portland, Oregon, USA: Timber Press, Inc..
- **Harry,W.,Duckworth.,Joseph,E.,Colema.(1970).** Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *Biological. Chem.,* 7, 1613-1625
- **Hasegawa, S. and Maier, V. P. (1980).** Polyphenol oxidase of dates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 891-893.
- **Hernández-Romero,D, Sanchez-Amat,A, Solano,F.(2006).** A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio. *FEBS J.* 273(2):257-70.
- **Jaenicke, E & Decker, H.,(2003).** Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochem. J.* 371, 515–523.
- **Janakat, S., Al-Fakhiri, S., & Sallal, A. K. (2005).** Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia clavaryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Medical Journal*, 26(6), 952– 955.
- **Janakat, S., & Nassar, M. (2010).** Hepatoprotective activity of desert truffle(*Terfezia clavaryi*) in comparison with the effect of *Nigella sativa* in the rat. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9,52– 56
- **Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M. Nd Nicolas, J.J. (1990).** Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1437-1441
- **Jiang, Y. M.(1999).** Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chemistry.* 66:75–79.
- **Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G.(1998).** *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102 : 1459-1483
- **José H. Martinez, Francisco Solano, Rafael Pei-Iafiel, Jesijs D. Galindo, Josi L. Iborra And Joé A. Lozano.(1986).** Comparative study of tyrosinases from different sources: relationship between halide inhibition and the enzyme active site.
- **José L. Navarro, A,T., Miguel A,S, Enrique,S.(2014)** .Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. *Food Chemistry*, V 157,Pages 283-289.

- **Joy, R.W., Sugiyama, M., Fukuda, H. And Komamine, A.**(1995). Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol.* 107, 1083-1089.
- **Harel, E., Mayer, A.M., Shain, Y.**(1964). Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiologica Plantarum.* 17: 921-930
- **Hernández-Romero ,D., Sanchez-Amat ,A., Solano F.**(2006). A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio. *FEBS Journal*, V273, 257–270.
- **Hussain G., Al-Ruqaie, I.M.**(1999). Occurrence, Chemical Composition, and Nutritional Value of Truffles: An Overview. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* V2, 510-514.
- **Kahn, V.**(1997). Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *J. Food Sci.* 42: 38–43
- **Kahn, V. And Pomerantz, S.H.**(1980). Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidases. *Phytochemistry* 19, 379-385
- **Kagan-Zur, V., & Roth-Bejerano, N.** (2008). Dessert truffles. *Truffles* , 1, 32 – 37
- **Kanade, S.R., Paul ,B., Rao, A.G., Gowda, L.R.**(2006). The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid-pH activation. *Biochem J.* 2006 May 1; 395(3):551-62.
- **Krzysztof N. Waliszewski.**(2009). Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. (*Ofelia Márquez, Violeta T. Pardo*) . *Food Chemistry.* 117 196-203
- **Keilin, D & Mann, T.**(1938). Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.* 125: 187-204
- **Khatun, S., Absar, N ., And Ashraduzzaman, M.**(2001). Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera L.*) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 4: 1129-1132.
- **Kiattisak, D., Richard, K., Owusu, A.**(1999). A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum var. Romano*). *Journal of Food Chemistry*, 64, 351-359.

- **Kim,J., Marshall, M.R. And Wei, C.**(2000). Polyphenoloxidase. In Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality, (N.F. Haard and B.K. Simpson, eds.) pp. 271-315, Marcel Dekker, New York.
- **King, R.S. And Flurkey, W.H.**(1987). Effect of limited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. 9. Sci. Food Agric. 41, 231-240.
- **Klabunde,T.,Eicken,C.,Sacchetti,Jc,Krebs,B.**(1998.)Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center.NatStructBiol;5:1084–90.
- **Kochana,J.,Nowak, P.,Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M.**(2008). Tyrosinase/laccase biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. Microchemical Journal. 89: 171–174.
- **Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N.**(2006).Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). Food Chemistry.101:778-785.
- **Kovacs,G,M.,Trappe,J,M.,Alsheikh,A.,Hansen,K.,Healy,R,A.,Vági,P.**(2011). American truffle mycota as two new genera and *Mattirolomyces* species emerge. Mycologia. vol. 103 no. 4,831-840.
- **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.,& Katoh,Y.**(1999). Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. Plant Cell Physiol. 40: 1029-1035.
- **Læssøe T, Hansen K.**(2007). Truffle trouble:What happened to the Tuberales? Mycol Res 111:1075– 1099, doi:10.1016/j.mycres.2007.08.004
- **Laveda, F., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F. And Sanchez-Ferrer, A.**(2000). Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. Arch. Biochem. Biophys.379, 1-6.
- **Lax A.R & Vaughn K. C.**(1991).Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. Plant Physiol. 96: 26-31
- **Lerch, K.**(1983). *Neurospora sp* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. Mol. Cell. Biochem. 52, 125-138.

- **Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J.**(2010). Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B*. 144 : 18–22.
- **Lineweaver, H & Burk,D.**(1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658-666.
- **Liu,B.,Liu,HY.,Liu,ZH.**(2002).Hypogeous fungi from China. *Edible fungi of China* 21-1: 3-4 and 2:14-15
- **Loera,C,O.,Pérez,P,M.,Cristina ,I,B., Rodríguez,J,R and Villaseñor,O,F.**(2006). Advances in Agricultural and Food Biotechnology.323-340.
- **Loizides,M., Hobart.,C., Konstandinides,G E.,Yiangou Y.**(2012). Desert Truffles: the mysterious jewels of antiquity. *Field Mycology*,V 13(1), P 17-21
- **Luard, E.** (2006). *Truffles*. Childs Hill, London: Berry & Co., Ltd..
- **Ludwig B. J., Nelson,J. M.**(1939). Inactivation of Tyrosinase in the Oxidation of Catechol. *J. Am. Chem. Soc.*61 (10), pp 2601-2606
- **Madhavi ,V.,& Lele,S,S.**(2009).Laccase properties,use,,Bioresources.1694-1717
- **Majid,Y..Moridania,B.,Arnosiraki,A., Tatiana-Chevaldina,A., Hughscobie ,Peter.,O'brien J.**(2004). Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* .145(2):213-23.
- **March RE, Richards DS, Ryan RW.**(2006).Volatile compounds from six species of truffle—head-space analysis and vapor analysis at high mass resolution. *Int J Mass Spectrom* 249:60-67.
- **Marques, L., Fleuriet, A.,Macheix, J.**(1995). Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 193-200.
- **Martinez-Cayuela, M., Rodriguez-Vico, F., Faus, M.J. And Gil, A.** (1989). Partial purification and intracellular localization of cherimoya (*Annona cherimolia* Mill.) Polyphenol oxidase.*J.Plant Physiol.*133, 660-663.
- **Martínez.C, M., Corzo,N .,Villamiel,M., Del Castillo,M,D.**(2012).chapitre 4 Browning Reactions. *Food Biochemistry and Food Processing*, Second Edition.
- **Martinez V.M. & Whitakerj.R.**(1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, 6, 195-200.
- **Marusek, C.M., Trobough, N.M., Flurkey, W.H., Inlow, J.K.**(2006).Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Chem.* 100,108-123.

- **Mayer A.M.**,(2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. *Phytochemistry.*, 67, 2318–2331
- **Mayer, A.M.** (1987). Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants–Recent
- **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.**
- **Mayer,A.M.,Harel,E.**,(1979).Polyphenol oxidases in plants .*Phytochemistry* 18,193
- **Mcevely, A.J., Iyengar, R. And Otwell, W.S.** (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32,
- **Mccord, J. D & Kilara, A.**(1983). Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Science*, 48:1479–1483.
- **Mdluli, K. M.**(2005). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Scleorocarya birrea* subsp. Caffra). *Food Chemistry*, 92:311–323.
- **Mesquita,V,L,V.,Queiroz,C.**(2013).Chapter 10 ;Enzymatic Browning. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*,387-418.
- **Min, K., Yoo, Y.J.**(2009). Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta.* 80: 1007-1011.
- **Miranda, M., Bonfigli, A., Zarivi, O., Ragnelli, M., Pacioni, G., Botti, D.**(1992). Truffle tyrosinase: Properties and activity. *Plant Science.* 81: 175-182.
- **Miranda, M., Zarivi, O., Bonfigli, A., Ragnelli, M., Rocchina, P., Aimola, P., Pacioni, G.**(1996). White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science.* 120: 29-36.
- **Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R.** (2010). A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 64: 189–194.
- **Moore, B.M. And Flurkey, W.H.**(1990). Sodium dodecyl sulfatate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.* 265, 4982-4988.

- **Muller., L.A; Hinz, U; and Zrýd, J-P.** (1996). Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*, Vol. 42. No 6. pp. 1511-1515.
- **Muñoz-Muñoz ,Jl., Garcia-Molina,F., Varon,R., Tudela,J., Garcia,F., Rodríguez-López,Jn** .(2010) New features of the steady-state rate related with the initial concentration of substrate in the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase . *J Math Chem* .
- **Murcia MA, Martínez-Tome M, Jimenez A, Vera A, Honrubia M, Parras P** (2002) Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *J Food Protect* 65:1614–1622.
- **Nagai T & Suzuki N.**(2006). Polyphenol Oxidase from Bean Sprouts (*Glycine max* L.). *Jounal of Food Science* V 68, pages 16–20.
- **Nan-yi ,L., Wei-ming, C., Qun-li, J., Qiao-ping ,Q., Fu-lai ,R.**(2011). Molecular Cloning and Expression of Polyphenoloxidase Genes from the Mushroom, *Agaricus bisporus*. *AGRIC SCI CHINA*-2927.
- **Na-Na,L.,Wei L,Dai-Jie,W.,Yi-Bin Z.,Xiao-Jing ,L.,Xiao W A., Sheng-Bo ,Li.**(2013.) Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb.*Chemistry*, V 138,P478- 483.
- **Nazzaro, F., Fratianni, F., Picariello, G., Coppola, R., Reale, A., & Luccia, D. A.** (2007).
- **Neeley E., Fritch G., Fuller, A., Wolfe J., Wright J., Flurkey W.**( 2009). Variations in IC50 Values with Purity of Mushroom Tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 3811-3823
- **Nerya,A O.,Ben-Arie R, Luzzatto Tal., Musaa R Khativa S, Vaya J.,**(2006). Prevention of *Agaricus bisporus* postharvest browning with tyrosinase inhibitors. *Postharvest Biology and Technology* V 39, P 272–277
- **Nicolas J., Billaud C.**(2006). Prévention du brunissement enzymatique. in *Les polyphénols en agroalimentaire*. P. Sarni-Manchado et V. Cheynier Eds. Paris, Tec et Doc. Lavoisier., 173-210.
- **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.
- **Nozue, M., Souri, M., Arakawa, D.,Kojima, M. (1998).**Purification and characterization of two isoforms of chlorogenic acid oxidase from sweet potato cells in suspension culture. *J. Plant Physiol.* 153, 552-557.
- **O'Donnell, K.,Cigelnik, E.,Weber,N,S.,Trappe,J,M.(1997).** Phylogenetic Relationships among Ascomycetous Truffles and the True and False Morels Inferred from 18S and 28S Ribosomal DNA Sequence Analysis. *Mycologia* Vol. 89,pp. 48-65.
- **Önez Z., Karakuş E., Pekyardimci Ş.(2008).** Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera L.*): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry.* 32, 396–414.
- **Papa, G., Pessione, E., Leone, V., And Giunta, C.(1994).** Agaricus bisporus tyrosinase–I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215-221.
- **Patil, S.S And Zucker, M.(1965).** Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of Biological Chemistry.* 240: 3938-3943
- **Patnaik, P.R. (2002).** Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology,*( 31),198-200.
- **Perez-Gilabert M., Morte A., G-Carmona, F.(2004).**Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science.* 166: 365–370
- **Perez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M And Garcia-Carmona, F.(2001).** Monophenolase activity of latent *Terfezia claveryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum.* 133: 203-209
- **Pifferri P.G., Baldassari L., Cultrera R.(1974).** Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J. Sci. Food. Agric.,* 25, 263-270
- **Polaina, J & Maccabe,A P.(2007).**Industrial enzymes: structure, function and applications .Springer, XII, 642 p
- **.Quarta,A, Mita ,G., Durante,M., Arlorio,M., De Paolis,A.(2013).** Isolation of a polyphenol oxidase (PPO) cDNA from artichoke and expression analysis in wounded artichoke heads. *Plant Physiology and Biochemistry,* Volume 68,Pages 52-60

- **Queiroz ,C.,Maria,L M,Fialho ,E.,Vera.,Lúci,A.**(2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 24, 361–375
- **Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., & Hendrickx, M.** (2006). Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera ssp. Sativa*). *Food Chemistry*, 94, 253–261
- **Reinhammar B., Malmström B. G.**(1981)."Blue"copper-containing oxidases. in *Copper Proteins*. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons: 109-149.
- **Robert ,C., Rouch ,C., Cadet ,F.**(1997). Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem.*, 59, 355-60.
- **Robinson, S.P., Loveys, B.R. And Chacko, E.K.** (1993). Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Aust. J. Plant Physiol*. 20, 99-107.
- **Rodriguez C,S & Toca Herrera ,J.L.**(2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24 (5):500-13.
- **Rodriguez-Lopez J. N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F.** (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267: 3801-3810
- **Riousset ,G.,Chevalier,G., Riousset ,L., Bardet,M.C.**(2012). *Truffes d'Europe et de Chine*. Editions Quae,181 pages.
- **Saeidian ,S., Keyhani ,E., Keihani ,J .**(2007). Polyphenol oxidase activity in dormant saffron (*Crocus Sativus L.*) *Acta Physiol Plant*, 29: 463-471.
- **Saeidian S , Bahaaldin,R.**(2013).Effect of Sodium dodecyl sulphate on partial purified polyphenol oxidase activity in Red and Green tomatoes (*Solanum Lycopersicum*). *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*.V1(7),691-700.
- **Sakiroglu H., Kufrevioglu I.O., Kocacaliskan I., Oktay M., Onganer Y.,** (1996). Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis Rechst.*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 2982–2986.
- **Samborska, K.**(2007). Enhancement of thermal stability of *Aspergillus oryzea* alpha-amylase using stabilizing additives. *Acta Agrophysica*. 9: 233-244.
- **Sanchez Ferrer,A.,Rodriguez-Lopez,J.N.,Garcia Canovas,F.,Garcia Carmona,F.** (1995) .Tyrosinase:a comprehensive review of its mechanism.*Biochim.Biophys .Acta* 1247 ,1–11.

- **Saltarelli R, Ceccaroli P, Cesari P, Barbieri E, Stocchi V** (2008) Effect of storage on biochemical and microbiological parameters of edible truffle species. *Food Chem* 109:8–16.
- **Serrdell,M.,Rozenfeld,P,A.,Martínez,G,A.,Civello,P,M.,Chaves,A,R.,Añón,M,C.b** (2000) . Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv *Selva*): characterisation and partial purification. *J of the Scie of Food and Agric* V80, pages 1421–1427.
- **Seo, S.-Y., Sharma, V.K., Sharma, N.,**(2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.
- **Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S.**(2004).Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183
- **Sharma, N.M., Kumar, S., Sawhney, S.K.**(2003). A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38: 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 Y-L., Benzie I.F.F., Buswell J A.,**(2002). Role of tyrosinase in the genoprotective effect of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Life Sciences.* 70 : 1595–1608.
- **Schwartz B., Olgin A.K., Klinman J.P.**(2001). The role of copper in topa quinone biogenesis and catalysis, as probed by azide inhibition of a copper amine oxidase from yeast. *Bio. Chem.*, 40, 2954-2963
- **Siegbahn, P.E.M.**(2003). The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem.* 8: 567-576.
- **Simsek, S., & A. Yemenicioglu.**(2007).Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry.*
- **Slama,A.,Neffati,M.,Boudabous,A.**(2010).Biochemical composition of desert truffle *Terfezia boudieri* Chatin. *Acta Horticulturae* 853:285–289, Proceedings of the International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, 2009
- **Smith,S.E.,Read,D.J.,**(2008).MycorrhizalSymbiosis.3rdedn.AcademicPress,London
- **Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y.**(2000). Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2071–4.

- **Sojo, M.M., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A.**(1998). Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 800 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4924-4930.
- **Solomon, E.I., Chen, P., Metz, M., Lee, S-K., and Palmer, A.E. (2001).** Oxygen binding, activation and reduction to water by copper proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 4570-4590.
- **Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., Thipyapong, P.**(1998). Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 23-250.
- **Suriyan ,S , Pattama,P., Racha ,T.(2012).** Browning inhibition in fresh-cut rose apple fruit *cv. Taaptimjaan* using konjac.glucomannan coating incorporated with pineapple fruit extract. *Postharvest Biology and Technology.*v73.p46–49.
- **Suttirak W., Manurakchinakorn S.**(2010). Potential Application of Ascorbic Acid, Citric Acid and Oxalic Acid for Browning Inhibition in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. *Walailak . J. Sci. Tech.,*7(1), 5-14.
- **Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J.**(2010). Amperometric Catechol Biosensor Based On Polyaniline–Polyphenol Oxidase. *Biosensors And Bioelectronics.* 25: 1681–1687.
- **Todaro,A.,Cavallaro,R.,Argento,S., Brancand,F.,Spagna,G.**(2011).Study and Characterization of Polyphenol Oxidase from Eggplant (*solanum melongena L.*) *.J. Agric. Food Chem,*59 (20),11244–11248.
- **Tomita Y, Hariu A, Mizuno C, Seiji M.**(1980). Inactivation of tyrosinase by dopa. *J Invest Dermatol.*75(5):379-82.
- **Tony C, De Rigal,D, Mbeguie,D, Gaillard,F, Richard-Forgetand,F,Bernard R.**(1999).Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol Oxidase ,*Plant Physiology*,vol. 119 no. 4 1261-1270
- **Trappe,J.M.,Claridge,A.W.**(2010).The hidden life of truffles .*Sci. Am .*302 (4),78
- **Trebst, A et Depka, B.**(1995). polyphenol oxydase and photpsynthesis research. *Photosynththesis Research* 46:41-44.
- **Tuena De Gomez-Puyou, M & Gomez-Puyou, A.**(1998). Enzymes in Low Water Systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 33, No. 1, pp. 53-89

- **Tulin, A. (2004).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *heads Food Chemistry* 87:59–67.
- **Ullah, M.R.(1991).** Tea. In *Food Enzymology*, (P.F. Fox, ed.) pp. 163-187, Elsevier Science Publishing, New York
- **Umit,U.(2007).** Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry* ., 100, 909–913.
- **Ünal M.Ü.(2007.)** Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*., 100, 909-913.
- **Ünal, M. Ü & Şener, A. (2006).** Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *J Sci Food Agric.* Vol. 86, pp. 2374–2379.
- **Urszula G ., Urszula Z., Michal W.(2007).** Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) *Food Chem.*, 8, 20-704
- **Vámos-Vigyázó, L..(1981).** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- **Van Gelder,C.,W.G., Flurkey, W.H, Wichers, H.J.(1997).** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phyto-chemistry* 45, 1309- 1323.
- **Virador,V,M.,Grajeda,J,P,R.,Blanco-Labra,L.,Mendiola-Olaya,E.,Smith,M ,G.,Moreno,A., Whitaker.,J,R.(2010).** Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. *Agric. Food Chem.* , 58, 1189–1201.
- **[Voet,D.](#), [Voet ,J,G.](#)(2011).** *Biochemistry*, 4th Edition. Courier/Kendallville.USA.
- **WANG, J., JIANG, W., WANG, B., LIU, S., GONG, Z., AND LUO, Y.(2007).** Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. “Tainong”) pulp. *Journal of Food Biochemistry.* 31: 45–55.
- **Webb KJ1, Cookson A, Allison G, Sullivan ML, Winters AL.(2013).** Gene expression patterns, localization, and substrates of polyphenol oxidase in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 61, 7421 – 7430.
- **WEEMAES C.A.,LUDIKHUYZE L.R, VANDENBROECK I,HENDRICKS M.E.,P.P.TOBBACK.(1998).**Activity ,electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphen oloxidases from apples, avocados ,grapes, pearsandplums, *Lebensm.Wiss. Technol.*31 :440e449.

- **WEI L , LI-QIANG Z, JUN-PING L, ZHAO-QIN Z, CHENG-MEI L, RUI-HONG L.**(2013)The effect of citric acid on the activity, thermodynamics and conformation. *Food Chemistry* 140,289–295.
- **Wichers, H.J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C.F.M., Biancone, G., Hoerberichts, F.A.,**(2003). Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 336–341
- **Whitaker, J.R.**(1994). *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, second ed. Marcel Dekker, New York. 271–556.
- **Whitaker ,J & Lee,C,Y.**(1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker,C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society : 2-7.
- **Xu, Y. M., A. H. Stokes, R. Roskoski, And K. E. Vrana.**(1998). Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *Journal of Neuroscience Research* 54 (5):691-697.
- **Xuan, L., Yanxiang, G., Honggao, X., Qinfeng, H., Guangmin, L., Qi, W.**(2010).Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris L.*) extract with continuous high pressure carbon dioxide. *Food Chemistry* 119:108–113
- **Yağar, H.**(2004). Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Celery. – Wong, T.C; Luh, B.S; and Whitaker, J.R. 1971. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes of Clingstone Peach. *Plant Physiol.* 48:19-23
- **Yagar, H.,& Sagiroglu, A.** (2002) Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk. J. Chem.* Vol. 26, pp. 97-103.
- **Yakup K.**(2012). Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentia*). *Process Biochemistry* 12/2012; 47-2449–2454.
- **Yamada, K., Akiba,Y.,Shibuya,K., KashiwadA, A., Matsuda, K., and hirata, M.**(2005).Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829
- **Yang, C., Fujita, S., Ashraf-Uzzaman, M., Nakamura, N. And Hayashi, N.** (2000).Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum L.*) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48,2732-2735

- **Yang, Y & Wang, Z.**(2008). Some Properties Of Polyphenol Oxidase From Lily. *International Journal Of Food Science And Technology* 43: 102-107.
- **Yemenicioglu,A.,Zkan,M,Cemeroglu,B.**(1997). Heat inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510
- **Yemenicioglu, A & Cemeroglu, B.**(2003).Consistency of Polyphenol Oxidase (PPO) Thermostability in Ripening Apricots (*Prunus armeniaca* L.): Evidence for the Presence of Thermostable PPO Forming and Destabilizing Mechanisms in Apricots. *J. Agric. Food Chem.* 51:2371-2379.
- **Yemenicioglu, A.**(2002). Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.
- **Ylostalo, J., Srivastava, K and Flurkey, W.H.**(2001). Characterization of a tyrosinase isoform from the cap skin of Portabella mushrooms. *Journal of Food Biochemistry.* 25: 493-507.
- **Yoruk, R & Marshall, M.R.,**(2003). Physiochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Chem.* 27,361–422.
- **Yue-Ming, J., Zauberman, G., and Fuchs, Y.**(1997). Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biology and Technology.* 10: 221–228.
- **Zawistowski,J., Biliaderis, C.G.,Eskin, N.A.M.**(1991). Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods.* D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- **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.
- **Zarivi,O.,Bonfigli,A.,Colafarina,S.,Aimola,P.,Ragnelli,AM.,Pacioni,G.,Miranda M.**(2011). Tyrosinase expression during black truffle development: from free living mycelium to ripe fruit body. *Phytochemistry.*72(18):2317-24.
- **Zinkernagel V.**(1986). Untersuchungen zur Anfalligkeit und resistenz von kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltan (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydse Aktivitaten. *J. Phytopathol.* 115, 257-266

- **Zhang,G,H., Wang,Y,F., Zhang,X,Q, ,Nag,T,Z., Wang,H,X.**(2010). Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. *Process Biochemistry*.V45, Pages 627–633
- **Zhang,Y.,Wang,Y., Zhou,L., Liao,X.**(2010). A comparative study of inactivation of peach polyphenol oxidase and carrot polyphenol oxidase induced by high-pressure carbon dioxide. *International Journal of Food Science & Technology*,V(45,11), p 2297–2305.
- **Zhou,H,W & Feng,X.**(1991). Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*,V57, p 307–313.
- **Ziyan, E & 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.

---

## Résumé

---

Ce travail rapporte une étude de l'effet de pH, de température d'inhibition et d'inactivation thermique de la polyphénol oxydase « PPO » des dattes algériennes « *Phoenix dactylifera* L cv DegletNour ». La PPO de cette variété des dattes possède une activité pyrocatechol oxydase, mesurée par spectrophotométrie à 410 nm en présence de pyrocatechol comme substrat. L'étude de la stabilité thermique a montré que le pyrocatechol oxydase est relativement thermostable jusqu'au 60°C au-delà de cette température l'activité de cette enzyme diminue progressivement, de plus la valeur de pH optimum a été également estimée à une valeur équivalente à pH=5,0.

L'étude de la cinétique de l'inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) de « *Phoenix dactylifera* L cv DegletNour. » à été réalisée en présence de pyrocatechol comme substrat et ceci pour l'acide citrique et l'acide ascorbique. Ce dernier est considéré comme l'inhibiteur le plus puissant avec un rapport de 100 fois plus. La cinétique de l'inactivation thermique des dattes « *Phoenix dactylifera* L cv DegletNour » peut être correctement décrite par un modèle biphasique à des températures comprises entre 60°C et 75°C avec les différents temps de traitement. Les valeurs de l'énergie d'activation ( $E_a$ ) et  $Z_T$  sont égales, respectivement à 240,49 kJ/mol et 9,23°C pour la fraction labile et à 297,04 kJ/mol et 7,45°C pour la fraction stable. Une diminution significative des valeurs de  $\Delta G$  de la PPO de DegletNour a été remarqué impliquant une déstabilisation de cette protéine fonction de température avec en revanche, des valeurs positifs de  $\Delta S$  et  $\Delta H$  indiquant la présence d'un processus de ségrégation significatif avec l'augmentation de désordre sous l'effet thermique dénaturant

**Mot clés :** *Phoenix dactylifera*, Polyphénoloxydase, Inhibition, Inactivation thermique, Brunissement enzymatique

---

## Abstract

---

This work is a reports of study of the effect of pH, temperature, inhibition and thermal inactivation of the "PPO" polyphenol oxidase of Algerian dates "*Phoenix dactylifera* L cv Deglet Nour". The PPO of this date variety has a pyrocatechol oxidation activity, measured spectrophotometrically at 410 nm in the presence of pyrocatechol as substrate. The study of thermal stability has shown that pyrocatechol oxidase is relatively thermostable up to 60 °C. Beyond this temperature, the activity of this enzyme gradually decreases, moreover the optimum pH value has also been estimated at value equivalent to pH = 5.0.

The study of the kinetics of inhibition of polyphenol oxidase (PPO) of "*Phoenix dactylifera* L cv Deglet Nour. Has been realized in pyrocatechol as substrate for citric acid and ascorbic acid. This is considered to be the most potent inhibitor with a 100-fold increase. Kinetics of thermal inactivation of dates' *Phoenix dactylifera* L cv Deglet Nour "can be correctly described by a biphasic model at temperatures between 60 °C and 75 °C with the different treatment times. The values of the activation energy ( $E_a$ ) and  $Z_T$  are equal to 240.49 kJ / mol and 9.23 °C respectively for the labile fraction and 297.04 kJ / mol and 7.45 °C. for the stable fraction. A significant decrease in the Deglet Nour PPO  $\Delta G$  values has been observed involving a destabilization of this protein as a function of temperature, with on the other hand, positive values of  $\Delta S$  and  $\Delta H$  indicating the presence of a significant segregation process with the increase of disorder under the thermal effect denaturant.

**Keyword :** *Phoenix dactylifera*, Polyphenoloxydase, Inhibition, thermic Inactivation, enzymatique Brunissement,

---

## ملخص

---

هذا العمل هو عبارة على دراسة تأثير درجة الحموضة، ودرجة الحرارة، وتثبيط الإنزيم والتعطيل الحراري للبوليفينول أوكسيداز بحيث عملت هذه الدراسة على نوع من التمور الجزائرية "دقلة نور" « *Phoenix dactylifera* L cv DegletNour » حيث هذا النوع يحتوي على خاصية نشاط أكسدة بيروكسيدات بولي PPO مقاسة بجاز باعث طيفي على 410 نانومتر في وجود البيروكسيدات على شكل ركيزة. دراسة الاستقرار الحراري بينت ان البوليفينول أوكسيداز مستقر حراريا إلى درجة حرارة 60°C وعليه هذه الدرجة في النشاط لهذا الإنزيم تنقص نسبيا، و زيادة على ذلك قيمة الحموضة المثلى قد قيمت =5.0.

دراسة الاستقرار الحراري بينت ان البوليفينول أوكسيداز في وجود البيروكسيدات على شكل ركيزة لحمض الليمون و حمض الاسكوربيك و هذا الأخير يعتبر أقوى بمئة مرة من حمض الليمون. أما حركية التعطيل الحراري للتمر يمكن ان يكتب بشكل صحيح بواسطة نموذج ثنائي الطور في حرارة تتراوح بين 60 درجة مئوية و 75 درجة مئوية مع أوقات المعالجة المختلفة. قيم طاقة التثبيط ( $E_a$ ) و ( $Z_T$ ) متساوية على التوالي مع 240.49 كيلو/مول و 9.23 للجزء الأضعف و على 297,04

كيلو/ مول و 7,45 للجزء المستقر, انخفاض ملحوظ في قيم  $\Delta G$  للبوليفينول اوكسيداز لدقلة نور التي تنطوي على زعزعة الاستقرار من البروتين اعتمادا على درجة الحرارة مع جهة أخرى، والقيم الإيجابية، والقيم الإيجابية ل  $\Delta G$  و  $H\Delta$  تشير إلى وجود عملية الفصل كبيرة مع زيادة اضطراب تحت تأثير حراري يخل بطبيعتها.

الكلمات المفتاحية: *Phænixdactylifera*. للبوليفينول أوكسيداز. تثبيط. الاستقرار الحراري. استمرار انزيمي.