

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie des produits naturels

THEME

**Etude cinétique et thermodynamique de
l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase
de « *phoenix dactylifera* »**

Présenté par :

M^{elle} : Aouissi Fatma Zohra

Devant le jury :

Président : Mr Ghermaoui Mohammed

Rapporteur : Mr Benaceur Farouk

Examineur : Mr Leboukh Mourad

Année universitaire :2015/ 2016.

Liste des figures

Figure 1	: Datte et noyau du palmier dattier.	4
Figure 2	: montre une coupe réelle au niveau de datte	4
Figure 3	: La répartition des cultivars de palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera L.</i>) dans le Sud Algérien	7
Figure 4	: Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases	12
Figure 5	: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan)	15
Figure 6	: Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> . Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé)	15
Figure 7	: L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> . Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge	15
Figure 8	: Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la PPO	23
Figure 9	: Protocole d'extraction et de purification partielle de la polyphénol oxydase des dattes (<i>Phoenix dactylifera L.</i>).	32

Figure 10	: Représentation graphique de la détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol par la PPO	34
Figure 11	: Représentation graphique de la variation de l'activité enzymatique de la PPO des dattes Deglet Nour en fonction du pH.	38
Figure 12	: Stabilité thermique de l'activité catécholase de l'extrait brut de la polyphénol oxydase des dattes Deglet Nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 80mM de pyrocatechol dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.0.	40
Figure 13	: Les graphes représentatifs de l'inactivation thermique de l'extrait brut de la polyphénol oxydase de (<i>Phoenix dactylifera</i> L)	42
Figure 14	: Graphique d'Arrhenius de la vitesse d'inactivation thermique de la polyphénol oxydase des deux fractions (stable et résistante) des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L).	45
Figure 15	: L'effet de la température sur la valeur- <i>D</i> de l'inactivation de l'activité polyphénol oxydase des deux fractions (stable et résistante) des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L).	45

Liste des Tableaux

Tableau 1	:	Stades de développement des dattes	5
Tableau 2	:	Représentation botanique des dattes étudiées	31
Tableau 3	:	: Les paramètres cinétiques estimés de l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase de (<i>Phoenix dactylifera</i> L).	43
Tableau 4	:	Les paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de l'extrait brut de la PPO de datte Deglet nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) à différentes températures.	46

Liste des abréviations

PPO :	Polyphénol oxydase
PVPP :	Poly(vinylpolypyrrolidone)
PVP :	polyvinylpyrrolidone
PEG :	Le polyéthylène glycol
E :	Concentration en enzyme.
S :	Concentration en substrat
EC :	Enzyme commission
°K :	Degré kelvin
°C :	Degré Celsius
K_m :	Constante de Michaelis.
PM :	Poids moléculaire
UI :	Unité international
V₀ :	Vitesse initiale
V_{max} :	Vitesse maximale.
D :	Temps de réduction décimale
t_{1/2} :	Temps de demi-vie (min ⁻¹)
K :	Constante de vitesse d'inactivation (min ⁻¹)
A :	Constante d'Arrhenius
E_a :	Énergie d'activation (J.mol ⁻¹)
R :	Constante des gaz parfaits (8.314 J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
R² :	Erreur relative ajusté

Sommaire

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Les dattes Deglet Nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L)	
I.1. Généralités sur le palmier dattier.....	3
I.2. La datte.....	3
I.2.1. Définition.....	3
I.2.2. Formation et maturation de la datte.....	4
I.2.3. Composition biochimique de la datte.....	5
I.2.4. Les enzymes des dattes.....	6
I.3. La répartition de Deglet Nour en Algérie.....	6
I.4. Utilisation des dates et de palmier dattier.....	7
Chapitre II : La polyphénol oxydase	
II.1. Historique et perspectives.....	9
II.2. Définition, classification et nomenclature.....	9
II.2.1. Définition.....	9
II.2.2. Nomenclature.....	9
II.2.3. Classification.....	10
II.3. Caractéristiques réactionnelles et structurales.....	10
II.3.1. Caractéristiques réactionnelles.....	10
II.3.1.1. La polyphénol oxydase.....	11
II.3.1.1.1. Activité monophénoloxydase (EC 1.10.3.1).....	11
II.3.1.1.2. Activité o-diphénoloxydase (EC 1.10.3.2).....	11
II.3.1.1.3. Activité laccase (E.C. 1.10.3.2).....	11
II.3.2. Caractéristiques structurales.....	12
II.3.2.1. Architecture moléculaire globale.....	12
II.3.2.2. Le site actif.....	14
II.4. Source, localisation et rôle des PPOs	16
II.4.1. Source et localisation.....	16
II.4.2. Rôle.....	17
II.5. Extraction	19
II.6. Mécanismes réactionnels.....	22
II.7. Les méthodes de détermination de l'activité PPO.....	25

II.8. Les substrats de la PPO.....	26
II.9. Effet du pH sur l'activité PPO.....	26
II.10. Effet de la température sur l'activité PPO.....	27
II.11. Les effecteurs de la PPO.....	27
II.11.1. Les activateurs.....	27
II.11.2. Les inhibiteurs.....	28
II.11.2.1. Méthodes physiques.....	29
II.11.2.2. Méthodes chimiques.....	29
II.11.3. Les inhibiteurs de synthèse.....	30
II.11.4. Les inhibiteurs naturels.....	30
Chapitre III : Matériels et méthodes	
III.A. Matériels.....	31
III.A.1. Matériels biologique.....	31
III.A.2. Produits chimiques.....	31
III.B. Méthodes.....	32
III.B.1. Extraction et purification partielle de la PPO.....	32
III-B-2- Mesure de l'activité PPO.....	33
III-B-3- Effet du pH sur l'activité de la PPO.....	34
III-B-4. Etude de la stabilité thermique de la PPO.....	34
II-B-5- Etude cinétique et thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO	34
Chapitre IV : Résultats et discussion	
IV-1-Le pH optimal de l'activité de la PPO.....	38
IV-2- Etude de la stabilité thermique de la PPO.....	39
IV-3- Etude cinétique et thermodynamique de l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase de Phoenix dactylifera L.	41
IV-3-1- Etude cinétique.....	41
IV-3-2-Analyse thermodynamique	45
Conclusion.....	46
Les références bibliographiques.....	48

La datte et plus particulièrement la variété Deglet Nour, est un fruit du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. le plus exploité en Afrique méditerranéenne. Dans le sud Algérien, les dattes constituent un aliment fondamental pour les musulmans durant toutes les saisons et particulièrement pendant le mois sacré de Ramadhan. La datte est une source riche en glucides, en fibres alimentaires, en composés phénoliques, en vitamines et en macroéléments faisant d'elle un aliment naturel nutritif pour l'humanité (**Kulkarni et al., 2008 ; Dowson et al., 1963**).

L'un des problèmes majeurs des dattes et leurs dérivés c'est les réactions de brunissement enzymatique et non enzymatique qui se produisent durant le développement des dattes, la récolte, traitement et le stockage (**Al-Bekr, 1972 ; Hasegawa et Maier, 1980 ; Sachde et al., 1989**). Ces réactions provoquent le plus souvent des pertes de la qualité sensorielle, de la couleur et de la valeur nutritionnelle et économique des dattes. La PPO est la principale enzyme responsable du brunissement des dattes. La prévention de cette réaction constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires (**Matheis, 1987a, b**).

Le brunissement enzymatique est provoqué principalement par l'activité polyphénol oxydase (PPO ; EC 1. 14. 18. 1) en présence de l'oxygène moléculaire (Martinez et Whitaker, 1995). La PPO est largement distribuée dans la nature et a été détectée dans la plupart des fruits et légumes (**Vámos-Vigyázó, 1981**).

La PPO catalyse deux réactions bien distinctes : l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2) qui se polymérisent pour former un colorant brun, rouge ou noir (**Gouzi et Benmansour, 2007**).

Plusieurs méthodes ont été proposées afin de résoudre le problème de brunissement enzymatique, parmi lesquelles l'utilisation des composés chimiques de synthèse. La toxicité de ces composés chimiques limite leurs utilisations, par conséquent ce contrôle chimique, n'est pas acceptable par les consommateurs et ne peut pas être utilisé donc pour contrôler le brunissement dans les fruits et les végétaux intacts (**Rapeanu et al., 2005 ; Whitaker et Lee, 1995**). Par conséquent, la recherche d'autres méthodes alternatives de contrôle du brunissement est nécessaire.

Le traitement thermique est généralement considéré comme un moyen très efficace pour inactiver la PPO et par conséquent d'inhiber le brunissement enzymatique (**Golan-Goldhirsh et al., 1984 ; McEvily et al., 1992 ; Sapers, 1993**). En générale, la PPO n'appartient pas au groupe des enzymes thermostables, l'incubation de l'enzyme à des températures comprises entre 70 à 90°C, détruit son activité catalytique (**Vamos-Vigyazo, 1981**).

Le traitement thermique est responsable le plus souvent d'une perte de la qualité nutritionnelle et sensorielle des fruits et des végétaux (**Lund, 1977 ; Sapers, 1993 ; Anthon et Barrett, 2002**). Par conséquent, il est préférable d'effectuer le traitement thermique à température élevée et pendant une courte durée suffisante pour inactiver totalement la PPO (**Awuah et al., 2007**).

D'après nos connaissances peu de travaux qui ont été menés sur l'inactivation thermique de la PPO des dattes. Pour cela, l'objectif principal de notre travail est d'étudier la cinétique d'inactivation de la PPO extraite de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) et de déterminer les principaux paramètres caractérisant ce processus d'inactivation. Une analyse thermodynamique est entreprise afin de mieux comprendre le comportement structural de l'enzyme après son traitement thermique.

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

La première partie concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur les dattes, la polyphénol oxydase et sur le contrôle du brunissement enzymatique. Dans la deuxième partie, nous décrivons les procédures expérimentales mises en jeu dans cette étude. La troisième partie est consacrée à une discussion des résultats expérimentaux obtenus. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO des dattes, sont regroupées dans la dernière partie.

I.1. Généralités sur le palmier dattier

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

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

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

I.2. La datte

I.2.1. Définition

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair Figure (1). La partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, est constituée d'un :

- *péricarpe* ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau ;
- *mésocarpe* généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et de couleur soutenue ;
- *endocarpe* de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau Figure (1) et (2) (**Espiard., 2002**).

Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouges, brunes plus ou moins foncées (**Djerbi., 1994**). La chair et le noyau représentent environ 85 à 90% du poids total du fruit (**Hussein et al., 1998**).

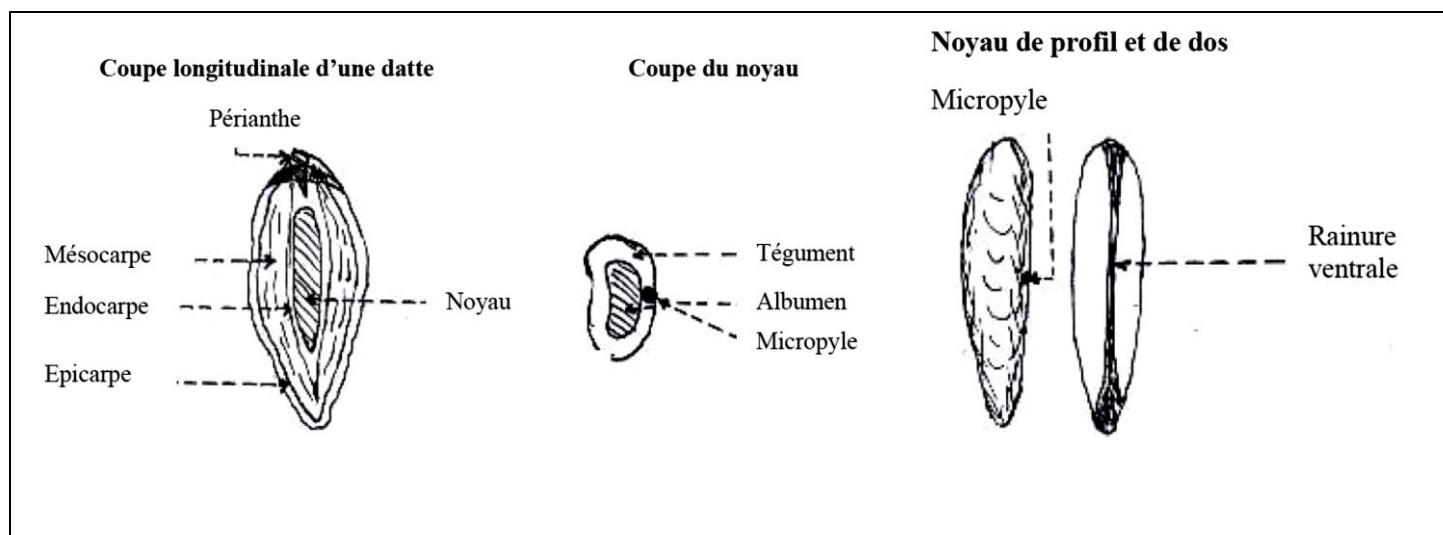


Figure 1 : Datte et noyau du palmier dattier (Buelguedj., 2001).



Figure 2 : montre une coupe réelle au niveau de datte (**Chibane., 2008**).

I.2.2. Formation et maturation de la datte

Les fleurs fécondées, à la nouaison, donnent un fruit qui évolue en taille, en consistance et en couleur jusqu'à la récolte (**Gilles., 2000**). La datte passe par différents

stades d'évolution (Sawaya *et al.*, 1983 ; Benchabane., 1996 ; Al-Shahib et Marshall., 2002).

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

Tableau .1 : Stades de développement des dattes (Djerbi., 1994).

Pays	Stades de développement de la datte				
	I	II	III	IV	V
Irak	Hababouk	Kimiri	Khlal	Routab	Tamr
Algérie	Loulou	Khlal	Besr	Martouba	Tamr
Libye	-	Gamag	Bser	Routab	Tamr
Mauritanie	Zeï	Tefejena	Engueï	Blah	Tamr

1.2.3. Composition biochimique de la datte

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

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

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

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

I.2.4. Les enzymes des dattes

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

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

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

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

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

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

I.3. La répartition de Deglet Nour en Algérie

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

Comme c'est indiqué dans la Figure (3) le palmier dattier Deglet Nour est réparti dans les quatre régions d'Algérie suivante : Saoura (Igli et Beni Abbes), Touat (Adrar et

Timimoun), centre (Chardaia et El Golea), et Rhir-Zibans (Biskra, (Ferfar), Touggoun (Touggourt, El Arfiane et Sidi Mahdi) et Ouargla).

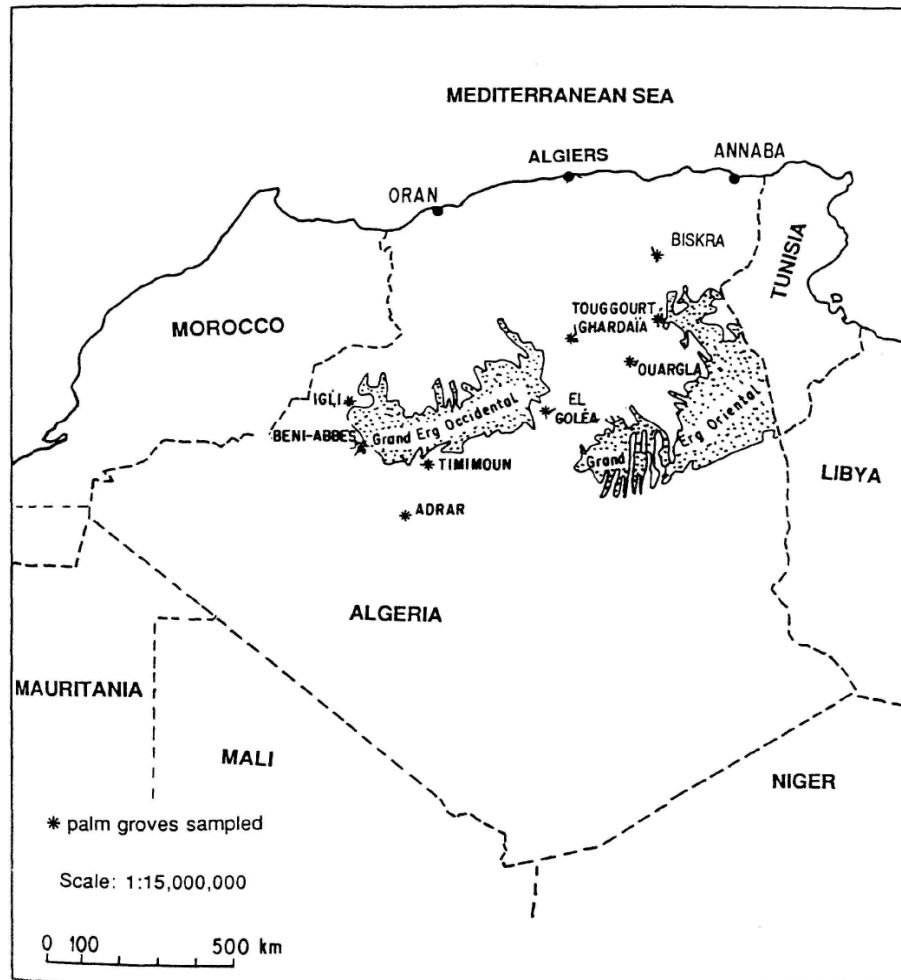


Figure 3 : La répartition des cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) dans le Sud Algérien (Bennaceur et al., 1991).

I.4. Utilisation des dates

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

Les sous-produits des dattes ont été utilisé comme substrat de fermentation pour la production de biomasse (Al obaidi et Berry., 1982 ; Nacib et al., 1999), ou la production de divers métabolites tels que l'acide citrique, l'oxytetracycline ou l'éthanol

(Abou Zied et *al.*, 1991; Abou Zied et Baghlef., 1983; Abou Zied et Khoja., 1993; Al obaidi et Berry., 1982).

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

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

II.1. Historique et perspectives sur la polyphénol oxydase

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes (Whitaker., 1995 ; Zawistowski et al., 1991 ; Vámos-Vigyázó., 1981). La première étude sérieuse de cette enzyme a suivi la production à grande échelle de la polyphénol oxydase de pomme de terre par Kubowitz (1938). C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch., 1981). La polyphénol était également la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule organique (phénolique), et elle fournit un exemple de ce qui s'appelle maintenant « inactivation suicide », mais qui s'est à l'origine nommé inactivation de réaction. Des recherches considérables ont été publiées sur l'enzyme depuis lors (Zawistowski et al., 1991 ; Robb., 1984 ; Escribano et al., 1989). Depuis sa découverte, la polyphénol oxydase a été le sujet de recherches intensives. Ces recherches ont porté d'une part sur la nature physique et chimique de l'enzyme elle-même et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans la respiration des végétaux inférieurs et supérieurs (Bonner., 1956). Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte et purifiée il y'a bien longtemps (Keilin et Mann., 1938 ; Schoenbein., 1856), c'est tout récemment qu'une image claire de cette enzyme a commencé à émerger (Jolivet et al., 1998).

II.2. Définition, classification et nomenclature de la polyphenol oxydase

II.2.1. Définition

Le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animale et humaine, et se rapporte au substrat 'typique', tyrosine qui était le premier substrat expérimental. La polyphénol oxydase est peut-être la dénomination générale la plus appropriée, et sera employée sous l'acronyme PPO dans ce présent travail (Dawson et Magee., 1955 ; Rescigno et al., 2002).

II.2.2. Nomenclature

Plusieurs noms ont été associés à la PPO dont la tyrosinase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'o-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est la polyphénol oxydase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme

substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des *o*-quinones dans les deux cas.

Les noms « tyrosinase », « phénol oxydase » et « polyphénolase » sont aussi généralement employés interchangeablement avec « la polyphénol oxydase » (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Burton., 1994 ; Rivas et Whitaker., 1973).

II.2.3. Classification

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

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB) a mis à jour la nomenclature et a placé la polyphénol oxydase dans deux catégories principales comme EC 1.14.18.1-monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase (cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 *o*-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 *p*-diphénol oxydase ou laccase) et EC 1.10.3.2 *o*-diphénol :O₂ oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Mayer., 1987 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

De nos jours, on accepte généralement que la PPO (PPO: monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine: oxygène oxydoréductase ; EC 1.14.18.1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions différentes en présence d'oxygène moléculaire : l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des *o*-diphénols aux *o*-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase) (Cho et Ahn., 1999a).

II.3. Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPOs

II.3.1. Caractéristiques réactionnelles

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

II.3.1.1. La polyphénol oxydase

II.3.1.1.a. Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. Cette enzyme est appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat.

L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons (Varoquaux., 1978).

II.3.1.1.b. Activité *o*-diphénoloxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase. Les *o*-quinones sont des composés fortement réactifs qui peuvent soit subir spontanément en solution aqueuse des polymérisations et cyclisations non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène, noir, brun ou rouge généralement appelé mélanine soit réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés (Dicko et al., 2002 ; Cho et Ahn., 1999a ; Burton., 1994).

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

II.3.1.1.c. Activité laccase (E.C. 1.10.3.2)

La laccase se caractérise par son activité *p*-diphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité *o*-diphénoloxydase. L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme ping-pong (Reinhammar et Malmström., 1981). Les laccases sont présentes dans de nombreux champignons phyto-pathogènes et dans certaines plantes mais on ne trouve pas de laccase dans les fruits et légumes à part dans les pêches (Harel et al., 1970) et les abricots (Dijkstra et Walker., 1991).

On peut distinguer les *o*- des *p*- diphénoxydases en fonction de leurs spécificités de substrats et d'inhibiteurs. Un taux d'oxydation différent pour le cuivre du site actif ainsi que les différences des mécanismes réactionnels de catalyse enzymatique peuvent en partie expliquer les taux différents d'inhibition de ces deux enzymes pour un même inhibiteur. Par exemple, la laccase n'est pas inhibée par le monoxyde de carbone, la phénylhydrazine ou le 2,3-naphtalènediol qui sont de puissants inhibiteurs de la catécholoxydase (**Keilin et Mann., 1940**).

Un résumé de ces différentes activités PPO est présenté dans la Figure 4.

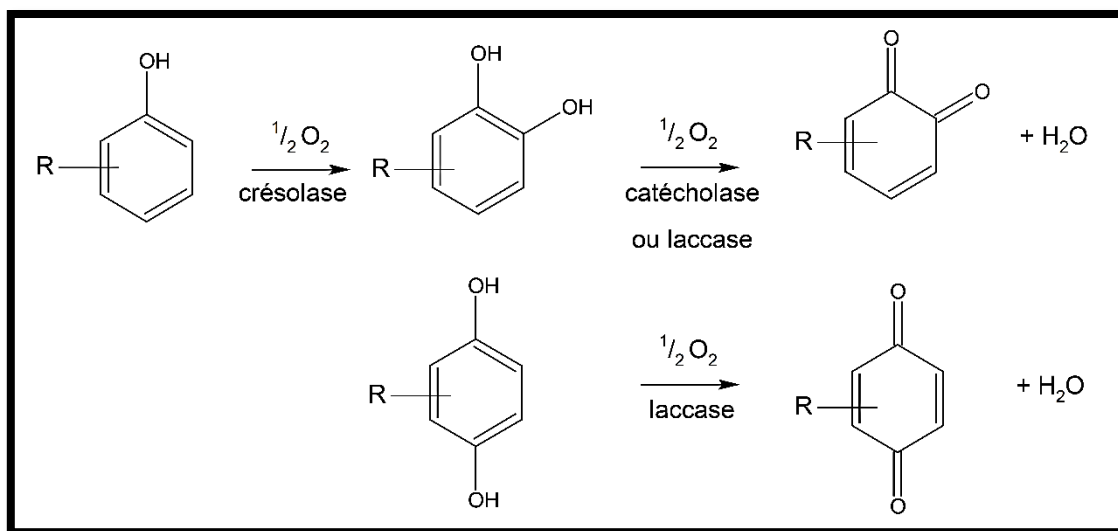


Figure 4 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases.

II.3.2. Caractéristiques structurales

II.3.2.1. Architecture moléculaire globale

La structure cristallographique de la PPO n'a pas été élucidée. Cependant, on peut supposer que la PPO, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce possèdent des sites actifs de structures comparables (**Claus et Decker., 2006 ; Siegbahn., 2003**). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (**Della Longa et al., 1996**). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (**Himmelwright et al., 1980**), et des similitudes de séquence primaires (**Van Gelder et al., 1997**). Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO comme une sphère hydrophile délimitée par 4 hélices α contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile est située dans une poche hydrophobe formée par des résidus aromatiques. La configuration du site

actif des PPOs est maintenue par des forces électrostatiques ou par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (**Lerch., 1982**). Une telle liaison covalente cystéine-histidine est également rapportée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomea batatas*) (**Klabunde et al., 1998**). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des o-diphénols et permet ainsi un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox et est responsable de la régulation de l'activité enzymatique (**Mayer., 1987**). Seule, la structure cristalline de la PPO de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active a été résolue (**Klabunde et al., 1998**).

La PPO native du champignon de couche (*Agaricus bisporus*) est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire et dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa, qui diffèrent par leur composition en acides aminés, formant ainsi une structure tétramérique de la forme H_2L_2 ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L demeure inconnue. Ces sous-unités pourraient contribuer à la stabilité ou à l'activité de la préparation d'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa) a la structure H_2L_2 , alors que la forme active de l'enzyme (montrant l'activité crésolase et catécholase) a la composition en sous-unités L_2H . Le poids moléculaire de la sous-unité de base de la polyphénol oxydase des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (**Strothkamp et al., 1976 ; Robb., 1984 ; Zawistowski et al., 1991 ; Whitaker, 1995 ; Solomon et al., 1996 ; Van Gelder et al., 1997 ; Jolivet et al., 1998 ; Fan et Flurkey., 2004**). Selon Wichers et al. (1996) les sous-unités isolées H et L ne possèderaient aucune activité enzymatique. D'autres PPOs des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux contiennent seulement un type de sous-unité. Elles sont souvent monomériques. Ces enzymes sont actives à l'état monomérique. Dans le cas de la PPO d'*A. bisporus*, la sous-unité H qui est responsable des activités catalytiques peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (**Robb., 1984 ; Jolivet et al., 1998**). Dans beaucoup de cas, les PPOs des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentes sous différentes formes multiples d'isoenzymes (**Mayer et Harel., 1979 ; Anosike et Ayaebene., 1982**). Ces formes d'enzyme peuvent être différenciées par leur

spécificité de substrat, leur pH optimum, leur stabilité thermique, et leur réponse aux inhibiteurs.

II.3.2.2. Le site actif

Il a été montré que la PPO peut avoir un site actif semblable à celui de l'oxyhémocyanine (**Rodakiewicz-Nowak et Ito., 2003 ; Baldwin et al., 1996**).

La PPO est une métalloenzyme vraie contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et est trouvé également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (**Mayer et Harel., 1991 ; Turner., 1974**).

La structure secondaire de la PPO est principalement α -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$) (**Jolivet et al., 1998 ; Ros et al., 1994 ; Decker et Terwilliger., 2000 ; Eicken et al., 1999 ; Haghbeen et al., 2004 ; Claus et Decker., 2006**). Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire de cuivre et qui est entouré par les hélices, $\alpha 1$ et $\alpha 4$, et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aide à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50) à l'hélice $\alpha 2$. La paire du cuivre (CuA et CuB) du site actif est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α figure (5). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice $\alpha 2$, tan disque l'His 109 et His 118 sont au début et au milieu de l'hélice $\alpha 3$. Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines sont localisés au milieu d'hélices $\alpha 6$ et $\alpha 7$ (**Klabunde et al., 1998**). La paire de cuivre (CuA et CuB) est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (**Van Gelder et al., 1997**).

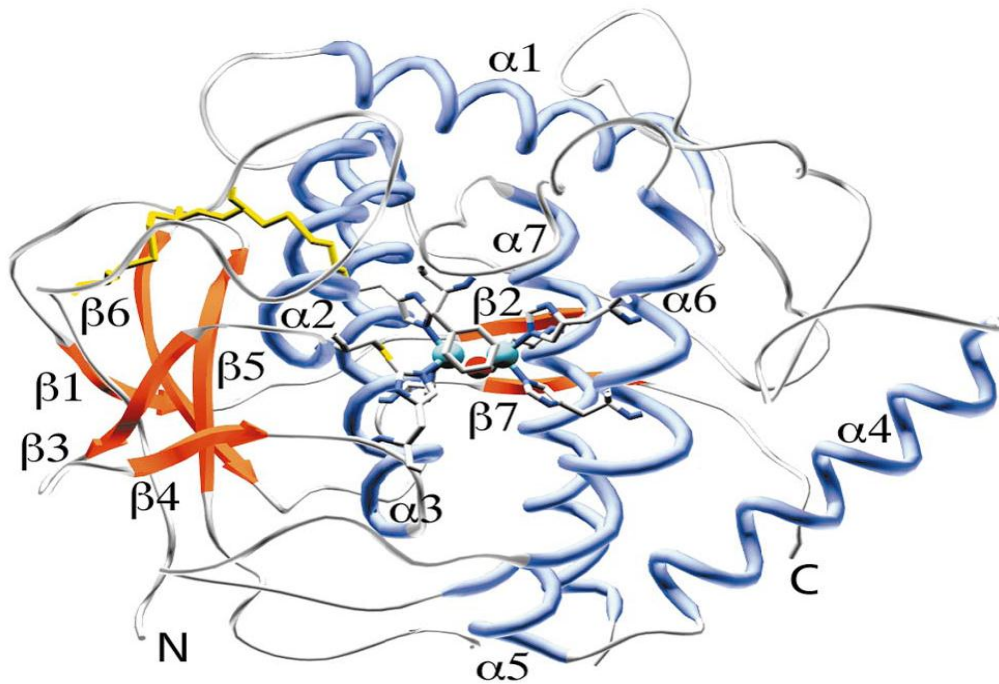


Figure 5: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et *al.*, 1999).

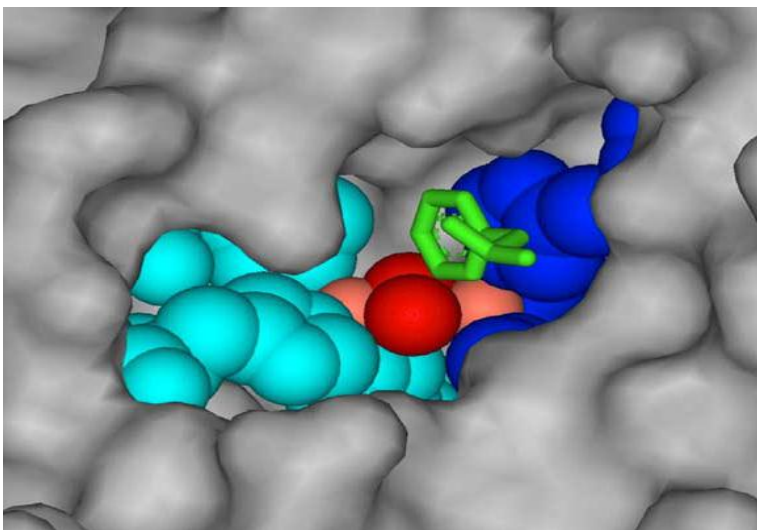


Figure 6: Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (Decker et Jaenicke., 2004).

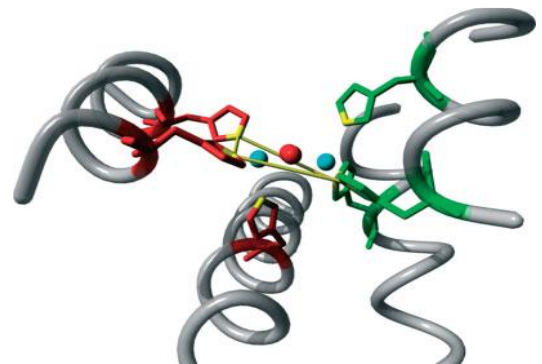


Figure 7: L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Claus et Decker., 2006).

II.4. Source, localisation et rôle des PPOs

II.4.1. Source et localisation

Les PPOs ont été découvertes initialement dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être trouvée dans les mycètes (**Burton, 1994 ; Whitaker., 1995 ; Chen et Flurkey., 2002 ; Claus et Decker., 2006**). La localisation subcellulaire de la PPO n'est pas clairement comprise. On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (**Zawistowski et al., 1991 ; Mayer et Harel., 1979**).

Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides, tandis qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (**Vaughn et Duke., 1984 ; Mayer et Harel., 1979 ; Zawistowski et al., 1991 ; Whitaker et Lee., 1995**). Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (**Claus et Decker., 2006**).

Les meilleures préparations des PPOs sont issues à partir de *Streptomyces glaucescens* et des mycètes (*Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus*) (**Solomon et al., 2006**). Le champignon commun de couleur blanchâtre *Agaricus bisporus* est reconnu comme étant la source naturelle majeure de la PPO (**Chen et Flurkey., 2002 ; Burton., 1994**). La PPO est présente dans les différentes parties du champignon avec des proportions variables (**Zhang et Flurkey., 1997**). La localisation intracellulaire de la PPO d'*Agaricus bisporus* n'a pas encore été établie avec certitude (**Jolivet et al., 1998**). Bonner (1955) a suggéré qu'elle est présente dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon. Van Gelder et al. 1997 ont supposé qu'elle est soluble dans le cytosol.

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes peut être considérablement inégale et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble. Elle dépend de l'espèce, de l'âge, et dans les fruits ou les légumes- de la maturité (**Vámos-Vigyázó., 1981**). Le niveau de l'activité de la PPO dans les plantes dépend de l'espèce, du cultivar, de

la maturité, de l'âge et le stockage et peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables dans certains cas. L'activité PPO est très basse dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer et Harel, 1991).

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés par les PPOs de diverse sources telles que : les truffes (Miranda et al., 1992 ; Miranda et al., 1996; Perez-Gilabert et al., 2001; Zarivi et al., 2003), les champignons (Frieden et Ottesen., 1959; Smith et Krueger., 1962; Duckworth et Coleman, 1970; Papa et al., 1994a,b; Gouzi et Benmansour, 2007), la banane (Palmer, 1963; Ôba et al., 1992 ; Sojo et al., 1998; Thomas et Janave, 1986), le tubercule de pomme de terre (Patil et Zucker., 1965; Matheis., 1987a,b ; Pathak et Ghole., 1994; Cho et Ahn., 1999a,b; Marri et al., 2003), les épinards (Golbeck et Cammarata., 1981), l'artichaut (Ziyan et Pekyardimci., 2003), la poire (Ziyan et Pekyardimci., 2004), le coing (Yağar et Sağiroğlu., 2002), la pêche (Wong et al., 1971), l'abricot (Chevalier et al., 1999), les feuilles de tabac (Shi et al., 2002) et le cerise (Kumar et al., 2008).

II.4.2. Rôle

Depuis la découverte en 1895, la PPO reste une énigme physiologique (Vaughn, et Duke., 1984). Cependant, plusieurs hypothèses ont été proposées au sujet de sa fonction (Thygesen et al., 1995 ; Steffens et al., 1998). Selon Walker et Ferrar (1995), la localisation spécifique de ses formes actives laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara et Katoh., 1999). En support à cette hypothèse, Lax et Vaughn (1991) ont montré que la PPO était structuralement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*).

Dans les plantes, les PPOs jouent un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker., 1995). Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPO sont cependant largement controversés (Vaughn et al., 1988 ; Mayer et Harel., 1991 ; Walker et Ferrar, 1998) et plusieurs hypothèses sont émises. Les polyphénols, ont des propriétés anti-fongiques (Friedman., 1997). La polyphénoloxydase catalyse l'oxydation de ces composés phénoliques en quinones, elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel.,

1986), qui se polymérisent ensuite pour former des polymères bruns insolubles. Ces derniers forment une barrière, et grâce à leurs propriétés anti-microbiennes, limitent la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante (**Zawistowski et al., 1991**). Selon Craft et Audia (1962), ces barrières de protection ont été observées dans les patates douces, les carottes, les betteraves, les courges, les navets et les pommes de terre.

La PPO est impliquée dans divers processus tels que la pigmentation des vertébrés et le brunissement des fruits et des légumes (**Fenoll et al., 2004**). Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine. Chez les mammifères, elle est responsable de la pigmentation de peau (**Whitaker., 1995**).

La PPO peut induire des modifications anti-nutritive des protéines végétales pour en faire des antinutritionnels décourageant les herbivores ou les microbes pathogènes (**Steffens et al., 1998**). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (**Vámos-Vigyázó., 1981; Vaughn et Duke., 1984 ; Zawistowski et al., 1991**).

L'activité PPO joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (**Mayer et Harel., 1991**). Elle est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé (**Whitaker et Lee., 1995**).

II.5. Extraction de la PPO

Le premier compte rendu d'extraction et de caractérisation de la PPO date il y a quelques décennies (**Wichers et al., 1995**). Cette enzyme a été pour la première fois préparée presque simultanément par Kubowitz (1938) à partir de la pomme de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir du champignon de couche (*Agaricus bisporus*). Plusieurs méthodes d'extraction de la PPO de champignon de couche ont été développées. Parmi les méthodes cités dans la littérature, les plus largement utilisées et qui donnent de bon rendement d'activité enzymatique sont celles : de Dawson et Magee (1955), de Frieden et Ottesen (1959), de Bouchilloux et al. (1963), de Nelson et Mason (1970), d'Atlow et al. (1984), de Papa et al., (1994), et de Fan et Flurkey (2004).

Trois problèmes doivent être traités avant d'extraire la PPO à partir du matériel végétal : (1) latence, (2) la solubilisation de l'activité liée à la cellule, et (3) la prévention de l'oxydation enzymatique des phénols endogènes et par conséquent les produits se polymérisent et se précipitent, sur la protéine enzymatique (**Vámos-Vigyázó., 1981**). La latence est un problème mineur avec la polyphénol oxydase végétale, comme dans la plupart des espèces l'enzyme est présente sous la forme active.

La PPO représente moins de 1% des protéines totales dans les fruits et les végétaux. Dans les champignons, qui sont considérés comme étant la meilleure source de la PPO, la concentration de l'enzyme est de l'ordre de 0.004% ce qui implique l'utilisation de 1 kg de champignon pour avoir un rendement de 40 mg de PPO purifiée (**Zawistowski et al., 1991**).

Les PPOs liées peuvent être solubilisées dans un milieu hypotonique, par l'utilisation des agents chimiques tel que les détergents (Tween-80®, Triton X-100®, SDS : Sodium Dodecyl Sulfate), ou au moyen des agents physiques comme les ultrasons (**Vámos-Vigyázó., 1981 ; Robb., 1984**). L'extraction détersive des tissus augmente substantiellement le niveau de l'activité PPO (**Whitaker., 1995**).

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

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

Pendant l'extraction de la PPO, des réactions de tannage peuvent être avoir lieu, et ont comme conséquence la modification des propriétés de l'enzyme (**Mayer et Harel., 1991**). Pour réduire au minimum ces risques, toutes les étapes d'extraction de la PPO devraient être effectuées à basse température, probablement à -20°C voire -30°C ; en tout cas à des

températures inférieures à 0°C (**Vámos-Vigyázó., 1981 ; Zawistowski et al., 1991**). Le morcellement et l'homogénéisation sont souvent faits dans l'azote liquide ou dans l'azote atmosphérique pour réduire le plus possible les interactions protéine- phénol. Dans certains cas, la congélation rapide et la lyophilisation du matériel sont recommandées comme premières étapes de l'extraction de l'enzyme. La précipitation par l'acétone suivie de l'extraction par un tampon, est l'une des méthodes le plus souvent appliquées.

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

L'élimination des composés phénoliques endogènes des extraits de plantes peut réduire la formation des quinones, des pigments et des mélanines indésirables dans l'extrait de polyphénol oxydase. Elle peut être effectuée par l'addition dans l'extrait enzymatique des adsorbants de composés phénoliques tels que les résines échangeuses d'ions et le polyvinylpyrrolidone (PVPP). Nous avons constaté que ce procédé change les caractéristiques cinétiques de la polyphénol oxydase de champignon dans le milieu organique, dans une certaine mesure, mais il n'affecte pas les produits de réaction dans les milieux aqueux ou organiques (**Burton., 1994**).

Un moyen très efficace de prévention contre l'oxydation et la polymérisation des phénols pendant l'extraction de l'enzyme est leur élimination par fixation à un polymère insoluble. Les pièges à phénol le souvent utilisés pendant l'extraction sont la polyvinylpyrrolidone (PVP), les résines échangeuses d'ions en raison de leurs capacités fixatrices des composés phénoliques. Elles sont utilisées pendant la séparation des fractions subcellulaires et dans les étapes initiales de purification de l'enzyme (**Mayer et Harel., 1991 ; Zawistowski et al., 1991; Ziyen et Pekyardimci., 2004**). En même temps le PVP

est un inhibiteur partiellement compétitif de la PPO (**Vámos-Vigyázó., 1981 ; Zawistowski et al., 1991**). Le polyéthylène glycol (PEG) est parfois préféré, peut-être parce que sa solubilité dans l'acétone présente certains avantages pour l'obtention d'une préparation enzymatique brute. Malheureusement, le déplacement de ces phénols par des résines d'échange ionique ou d'autres composés se liant aux phénols (**Bonner., 1955**) peut avoir comme conséquence la perte de quelques isoformes (**Smith et Montgomery., 1985**). Ainsi, le séchage par l'acétone, souvent appliqué comme première étape d'extraction d'enzymes, est, en même temps, un moyen puissant d'élimination des phénols, particulièrement quand ils contiennent environ 20% d'eau.

Le déplacement des substances pectiques des tissus de fruit peut être réalisé par précipitation par l'acétone ou l'acétate de calcium (**Vámos-Vigyázó., 1981**).

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

II.6. Mécanismes réactionnels de la PPO

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après Sánchez-Ferrer et al. (1995), le site actif des PPOs peut exister sous trois formes selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* (CuI-CuI), *oxy* (CuII-O₂-CuII) et *met* (CuII-CuII). La forme *met* est convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy* résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy* (Figure 8). In vivo, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme *met*, incapable de fixer l'oxygène moléculaire (Lerch., 1981). Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence décrite par Cabanes et al. (2002). Bien que le mécanisme exact des réactions catalysées par les PPOs soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols catalysée par les PPOs suit une cinétique de Michaelis-Menten, tandis que l'hydroxylation des monophénols est caractérisée par une phase de

latence (**Sanchez-Ferrer et al., 1995**). Cette phase de latence peut être supprimée par un faible ajout d'*o*-diphénols (**Espin et Wichers., 1999**).

Le modèle des mécanismes réactionnels des PPOs incluant l'activité catécholase (Figure 8, cycle A) et crésolase (Figure 8, cycle B) est basé sur des informations quant à la structure électronique et géométrique du complexe de cuivre binucléaire et sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (**Siegbahn., 2003 ; Lerch., 1995**).

Les formes *oxy* peuvent réagir avec les mono- et les diphénols tandis que la forme *met* ne peut réagir qu'avec les diphénols (**Claus et Decker., 2006**). Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des *o*-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (**Rodriguez-Lopez et al., 1992**). Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme *oxy* semble beaucoup plus instable que dans le cas des PPOs, ce qui réduit fortement l'affinité des PPO pour les mono-phénols (**Eicken et al., 1999**). L'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (**Janovitz-Klapp et al., 1989**).

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

Dans l'activité crésolase, l'O₂ est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du *deoxy*PPO pour donner l'*oxy*PPO dans laquelle l'O₂ a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'*oxy*PPO, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau et l'intermédiaire conduisant à la formation de l'*O*-quinone (**Solomon et al., 1996 ; Solomon et al., 2001 ; Fenoll et al., 2004 ; Whitaker., 1995 ; Mayer et Harel., 1991 ; Siegbahn., 2004 ; Sánchez-Ferrer et al., 1995 ; Jolivet et al., 1998**).

Les étapes limitantes dans l'hydroxylation des monophénols pourraient être :

- 1) L'attaque nucléophile du groupement OH en C-4 sur l'ion cuivre du site actif de la tyrosinase ;
- 2) L'attaque électrophile du peroxyde du site actif de l'oxytyrosinase sur le C-3 du substrat monophénolique ;
- 3) L'oxydation du o-diphénol formé à partir du monophénol (Fenoll et *al.*, 2000).

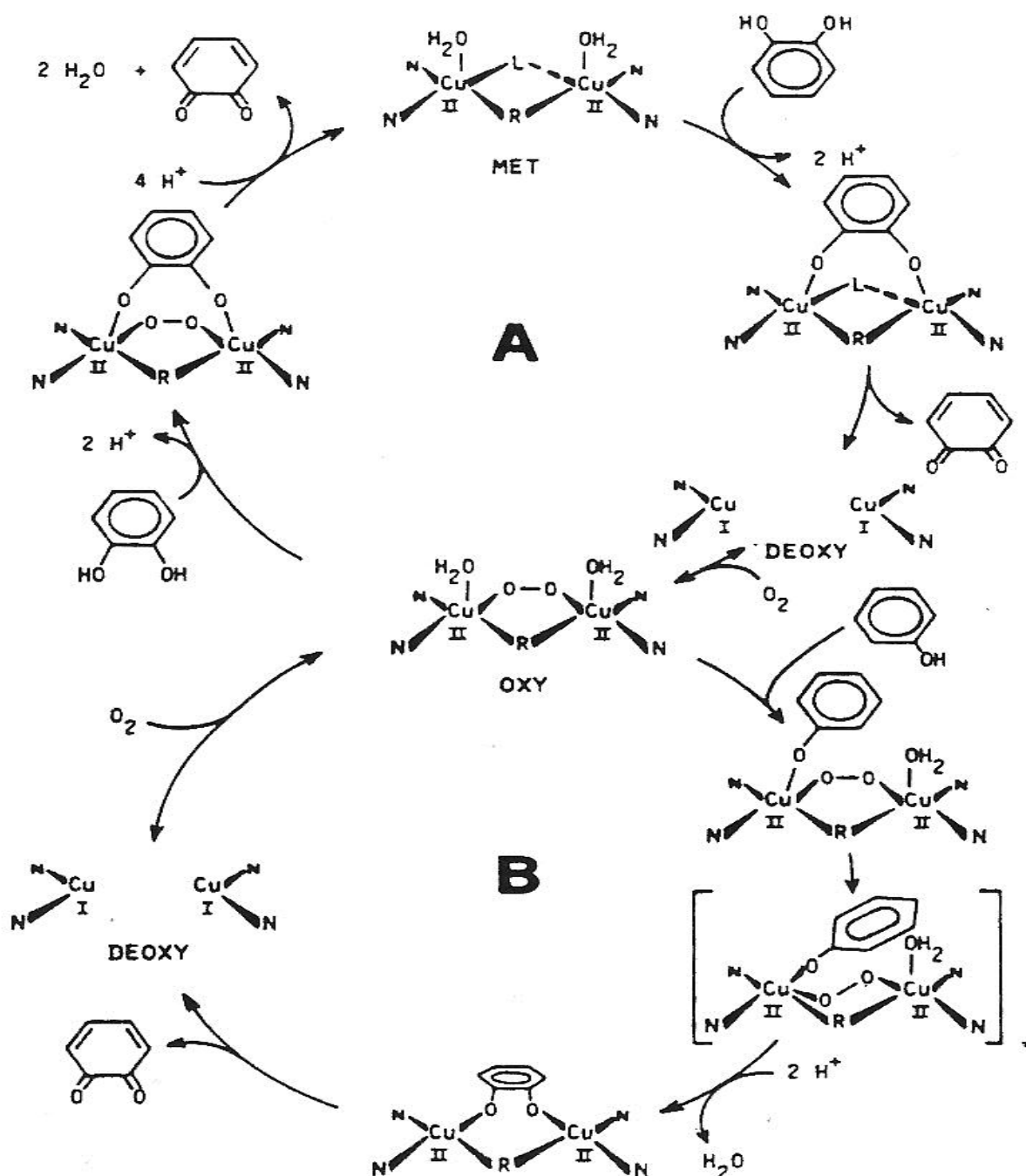


Figure 8 : Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la PPO (Lerch., 1995 ; Mayer et Harel., 1991).

II.7. Les méthodes de détermination de l'activité PPO

La détermination de l'activité enzymatique de la PPO n'est pas aussi simple qu'elle peut apparaître. Un certain nombre de facteurs doivent être pris en considération pendant la détermination de l'activité enzymatique afin d'éviter une surestimation ou des résultats faux.

L'activité de la PPO peut être déterminée en mesurant la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit. Il est nécessaire de limiter la mesure à la phase initiale de la réaction afin d'éviter l'inactivation de l'enzyme par le produit de la réaction (o-quinone), la diminution de la concentration du substrat, et la polymérisation du produits (Vámos-Vigyázó., 1981).

La vitesse de disparition du substrat peut être mesurer par l'absorption de l'oxygène dissout, par la technique de Warburg ou par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (Vámos-Vigyázó., 1981 ; Mayer et Harel., 1991 ; Gauillard et al., 1993 ; Naish-Byfield et Riley., 1992). La vitesse de formation de produit peut être déterminée par méthode spectrophotométrique en mesurant la densité optique des composés colorés (o-quinones) formés à partir des substrats. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphenolase de la PPO (Vámos-Vigyázó., 1981 ; Zawistowski et al., 1991 ; Espín et al., 1995). Une grande variété de substrats de synthèse peut être utilisée dans ce cas, par exemple : le catéchol, le 4-méthylcatéchol, le pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique (Vámos-Vigyázó., 1981). La meilleure méthode pour étudier la réaction crésolase est la mesure de la production de l'eau dans le milieu contenant du tritium à partir du [2.6- ^3H] monophénol tel que la [3.5- ^3H] tyrosine (Mayer et Harel., 1991 ; Jolivet et al., 1998). Il est également plus commode de déterminer la vitesse de perte d'agents réducteurs tel que l'ascorbate à 265 nm ($\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ou le NADH à 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Mayer et al., 1966 ; El-Bayoumi et Frieden., 1957 ; Zawistowski et al., 1991). Plusieurs méthodes pour la mesure de l'activité PPO sont proposées et les chercheurs travaillant sur cette enzyme définissent leur propre méthode. Il est par conséquent difficile de comparer entre les activités de la PPO des diverses sources.

II.8. Les substrats de la PPO

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

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

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

La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine, et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels de la PPO trouvés dans les fruits et légumes (**Zawistowski et al., 1991, Vámos-Vigyázó., 1981 ; Trebst et Depka., 1995**).

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

II.9. Effet du pH sur l'activité PPO

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la PPO varie avec la source de l'enzyme et en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des PPOs étudiées il est compris entre pH 4 et 8 (Mayer et Harel., 1979). Plusieurs paramètres affectent cette valeur : (1) le type de tampon ; (2) la pureté de la préparation enzymatique et (3) le stade de maturité du fruit ou du végétal. L'étude du pH peut nous fournir des informations sur l'identification des

activateurs ou sur les résidus du substrat susceptibles d'être ionisés nécessaires pour sa fixation et sa transformation (**Kuby., 1991**).

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

II.10. Effet de la température sur l'activité PPO

L'effet de la température sur l'activité des PPOs n'a pas été étudié intensivement par rapport à l'effet du pH (**Joslyn et Ponting., 1951; Vámos-Vigyázó., 1981**). Amiot et *al.* (1997) ont proposé que «la PPO n'est pas une enzyme très thermostable».

Les traitements thermiques de courtes durées de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction irréversible partielle ou totale de sa fonction catalytique (**Vámos-Vigyázó., 1981; Zawistowski et al., 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu., 2003**). La diminution d'une partie de l'activité de la PPO à une basse température de chauffage n'est pas étonnante (**Yemenicioğlu., 2002**). Sa tolérance thermique dépend également de la spécificité de substrat, du 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**). L'inactivation thermique de la PPO peut être considérée comme étant une forme d'inhibition de l'enzyme (**Mayer et Harel., 1991**).

II.11. Les effecteurs de la PPO

II.11.1. Les activateurs

La PPO peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), les acides gras, les alcools, le choc acide et les protéases (**Seo et al., 2003 ; Espín et al., 2002 ; Gandía-Herrero et al., 2005**). Le SDS peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la PPO de champignon de couche (*Agaricus bisporus*). Il a été également montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées. L'addition des ions du Cu^{2+} dans

le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (**Vámos-Vigyázó., 1981; Fan et Flurkey., 2004; Van Leeuwen et Wichers., 1999**).

II.11.2. Les inhibiteurs

Le contrôle de l'activité de la PPO est d'une importance dans la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux et fruits (**Jolivet et al., 1998; Qiu et al., 2009**). En outre, les inhibiteurs de la PPO ont été employés en tant qu'agents de dépigmentations pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation. Par conséquent, les inhibiteurs de la PPO sont censés d'avoir de larges applications dans les industries médicales (**Mosher et al., 1983**) et cosmétiques (**Maeda et Fukuda., 1991**). Dans l'industrie alimentaire, les inhibiteurs de la PPO peuvent être employés comme des conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale. En outre, la PPO est l'une des plus importantes enzymes clés impliquée dans le processus muant d'insecte, et la découverte des inhibiteurs de cette enzyme peut être ainsi importante pour le développement de nouvelles alternatives pour le contrôle des insectes (**Likhitwitayawuid., 2008**).

L'inhibition de la PPO responsable du brunissement de la plupart des produits alimentaires est une préoccupation majeure des industries alimentaire. Dans l'industrie alimentaire, la toxicité relative au mode d'inhibition choisie, le coût de la méthode et/ou des composés chimiques, et l'acceptation de la méthode par le consommateur, des composés chimiques et le produit final aident à la sélection de la méthode d'inhibition (**Barthet., 1997**). En théorie, le brunissement des fruits et des légumes par la PPO peut être empêcher par l'inactivation thermique de l'enzyme, par l'élimination de l'un des deux substrats nécessaires pour la réaction (O_2 et/ou les composés phénoliques), par l'abaissement du pH de 2 unités ou plus au-dessous du pH optimum, par des réactions d'inactivation de l'enzyme ou par l'addition des composés qui inhibent la PPO ou qui empêchent la formation de la mélanine (**Vámos-Vigyázó., 1981 ; Whitaker et Lee., 1995**). Des centaines de composés ont été examinées comme des inhibiteurs du brunissement enzymatique (**Whitaker et Lee., 1995**). Les inhibiteurs du brunissement enzymatique doivent être non toxiques, et ne modifie pas le goût, la saveur ni la texture du produit (**Vámos-Vigyázó., 1981**). Beaucoup d'études ont eu pour but d'inhiber la PPO et plusieurs méthodes ont été développées.

II.11.2.1. Méthodes physiques

Les traitements thermiques sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique. Les traitements thermiques de courtes durées aux températures comprises entre 70- 90°C, de la PPO en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction catalytique (**Vámos-Vigyázó., 1981; Zawistowski et al., 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu., 2003**).

Plusieurs études ont montré que la PPO obtenue à partir de diverses source est inactivée thermiquement (**Yemenicioğlu et al., 1997 ; McCord et Kilara., 1983 ; Weemaes et al., 1998 ; Soysal., 2008**). L'inconvénient majeur du traitement thermique réside dans la production du mauvais goût et l'apparition d'une coloration indésirable causés par la réaction de Maillard.

La combinaison du traitement thermique avec d'autres méthodes physiques tels que la pression, les micro-ondes ou les ultrasons pouvons induire une inactivation réversible ou irréversible de la PPO à des températures relativement basses, en particulier lorsqu'il s'agit d'un produit sensible à la chaleur (**Terefe et al., 2009 ; Weemaes et al., 1998 ; Buckow et al., 2009 ; Rapeanu et al., 2005 ; Devece et al., 1999**).

II.11.2.2. Méthodes chimiques

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la PPO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source de l'enzyme, de la disponibilité de substrat (O₂ et substrat phénolique), du pH et de la température (**Zawistowski et al., 1991**).

Il est commode de diviser les inhibiteurs de la PPO en trois catégories : (1) les agents de chélation généraux pour le cuivre : petites molécule ou ions qui se lient au centre de cuivre dans le site actif compétitives en ce qui concerne l'oxygène ; (2) les inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique ; et (3) les analogues des phénols compétitives vers des substrats (phénol et/ou diphénol) (**Robb., 1984 ; Burton., 1994**).

II.11.3. Les inhibiteurs de synthèse

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

Les ions inorganiques, y compris les halogénures, sont également capables d'inhiber les PPOs de beaucoup de sources. Les inhibiteurs potentiels de des PPOs de champignon, de cerises, de pommes, de poire, d'abricot et de pommes de terre sont principalement les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques, les acides carboxyliques, le dihydrate de phloridzine et certains acides cinnamiques substitués. Les ions halogénures se comportent comme étant des inhibiteurs purement compétitives vis-à-vis de la fixation du dioxygène (Rescigno *et al.*, 2002; Robb., 1984).

L'acide ascorbique peut également agir directement sur la PPO du champignon par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu^{2++} en Cu^+ (Vámos-Vigyázó., 1981; Zawistowski *et al.*, 1991).

En outre, les composés qui ne ressemble pas à la structure de substrat (exemple : le 4-nitrophenol, la phénylalanine et le 4-chlorophénol) et qui sont lentement oxydés, ont été identifiés comme des inhibiteurs compétitifs de la PPO. Les analogues de substrat tels que les acides aromatiques (exemple : l'acide benzoïque et l'acide cinnamique) se comportent habituellement comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du substrat phénolique (Robb., 1984 ; Jolivet *et al.*, 1998; Gasowska *et al.*, 2002 ; Janovitz-Klapp *et al.*, 1990).

L'inhibition de la PPO est également provoquée par des agents réducteurs parmi lesquels, les sulfites ; SO_2 ; l'acide ascorbique, l'acide érythorbiqes et les composés à fonction thiol (Kahn., 1985 ; Zawistowski *et al.*, 1991). Les composés à fonction thiol, comme la L-cystéine, le glutathion, le dithiotreitol, le mercaptoéthanol et le thiourée, sont des inhibiteurs efficaces de la PPO de plusieurs sources (Zawistowski *et al.*, 1991 ; Burton., 1994 ;Rescigno *et al.*, 2002).

Les polymères solubles tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP) agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs de la PPO mais on sait pas s'il agissent sur l'enzyme liée au phénol ou sur l'enzyme (**Jolivet et al., 1998 ; Vámos-Vigyázó., 1981**).

Les acides aminés, peptides et protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement la PPO, soit en réagissant avec les *o*-quinones (**McEvily et al., 1992 ; Ates., 2000**). Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu^{2+} du site actif de la PPO (**O'Sullivan., 1969**).

Les cyclodextrines peuvent inhibées la PPO par fixation au substrat phénolique (Irwin et al., 1994). L'acide citrique inactive la PPO par deux mécanismes : élimination du cuivre du site actif et par la diminution du pH du milieu (**McEvelly et al., 1992**). La grande majorité de ses inhibiteurs n'est pas seulement spécifique pour les PPO (**Mayer et Harel., 1991**).

II.11.4. Les inhibiteurs naturels

Plus récemment, les plantes sont considérées comme étant une source potentielle des inhibiteurs de la PPO (**Baurin et al., 2002**). Un certain nombre d'inhibiteur de la PPO des sources naturelles ont été identifiés. Ils appartiennent à deux grand groupes : les polyphénols et les aldéhydes et d'autres dérivés (**Rescigno et al., 2002**). Parmi les composés isolés le cuminaldéhyde, l'oxyrésveratrol, le kaempferol, la quercetine, la morine, la lutéoline, l'anisaldéhyde, la kurarinone et l'acide gallique sont des inhibiteurs puissants de la PPO (**Parvez et al., 2007**).

II-A-Matériels

II-A-1. Matériels biologique

Les dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) sont utilisées comme source de la polyphénol oxydase (PPO), Tableau 2.

Les dattes sont achetées à maturité du marché local de la Wilaya de Laghouat dans la semaine précédant leurs utilisations (la deuxième semaine du mois de Décembre 2015). Elles sont lavées avec de l'eau distillée, séchées et conservées à -15°C.

Tableau 2. Représentation botanique des dattes étudiées

Appellation	Photo
Nom commun : Deglet Nour Nom scientifique : <i>Phoenix dactylifera</i> L. Famille : Palmacées	

II-A-2. Produits chimiques

Le pyrocatechol est fournis par Fluka. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

II-B- Méthodes

II-B-1- Extraction de la PPO

L'extraction de la PPO de datte (*Phoenix dactylifera* L.) est réalisée selon le protocole décrit par (Hasegawa et Maier., 1980). Les dattes sont lavées avec de l'eau distillée et sont séchées à l'air libre. 200 g de chair de dattes préalablement refroidie à -15°C sont découpés et homogénéisés pendant 2 min à l'aide d'un mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E) dans 300 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de sodium 0.05 M à pH 7.0 contenant 5g de polyvinylpolypyrrolidone. Le broyat est ensuite filtré à travers quatre couches de la gaze. Le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000 trs/min dans une centrifugeuse (Sigma Fischer Bioblock Scientific). Le surnageant récupéré d'un volume total de 150 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait brut de la PPO. L'extrait enzymatique brut est conservée à -15°C

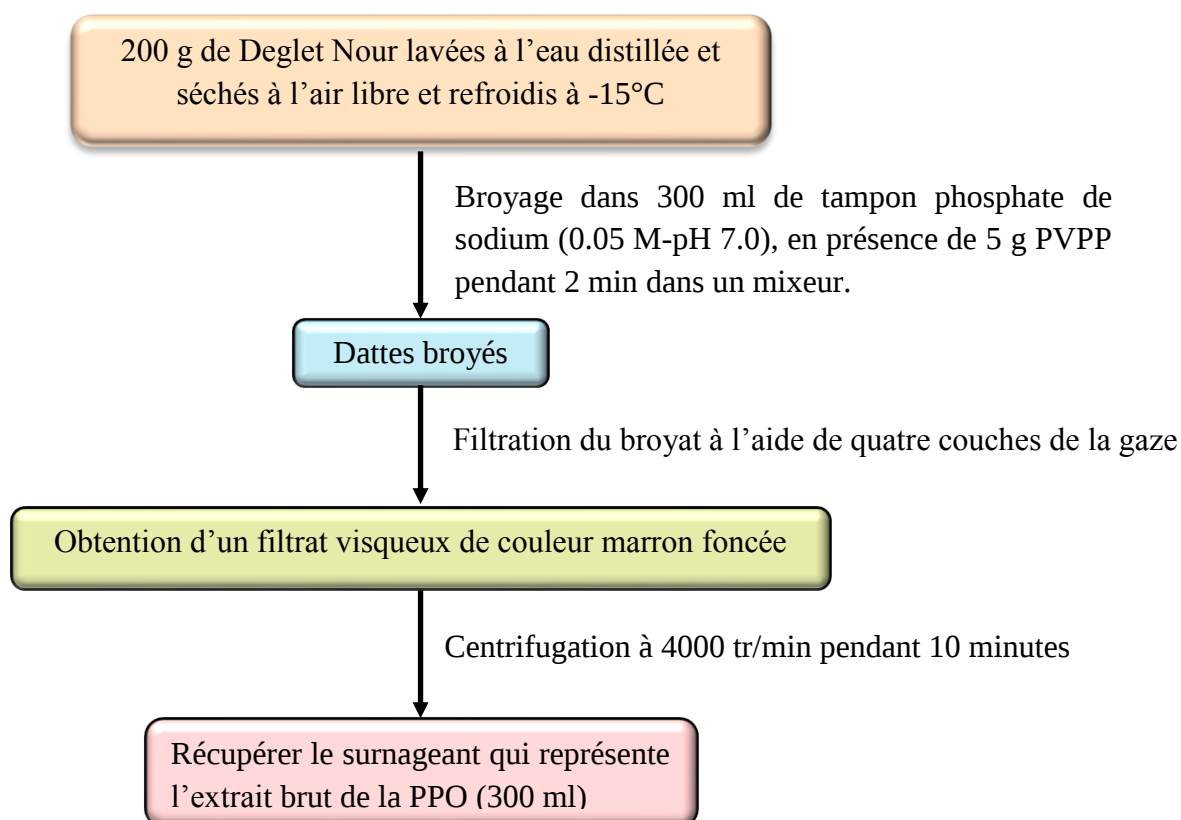


Figure 9 : Protocole d'extraction de la polyphénol oxydase des dattes (Deglet Nour ; *Phoenix dactylifera* L.).

La PPO de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) a été extraite par le tampon phosphate de sodium (pH 7.0-0.05 M). Le pyrocatechol a été utilisé comme substrat pour mesurer l'activité enzymatique.

II-B-2- Mesure de l'activité PPO

L'activité de la PPO est mesurée à 410 nm en utilisant le pyrocatechol comme substrat par la mesure directe de la formation des o-quinones à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeLIOS γ) en présence oxygène/aire (**Fan et Flurkey., 2004 ; Espín et al., 1995**).

La solution mère de pyrocatechol à 0.2 M est préparée dans de l'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM (**Fan et Flurkey., 2004**).

Le milieu réactionnel. contient 200 μ l de substrat à 80 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 20 μ l de solution d'enzyme. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant deux minutes après l'ajout de l'extrait enzymatique.

La vitesse initiale (v_0) représente la pente de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps Figure 10 (**Ünal., 2007**).

Les solutions d'enzyme et de substrat doivent être préincubées pendant 5 min dans un bain marie à 30°C avant d'être mélangées.

En spectrophotométrie une unité enzymatique (UE) est définie comme la quantité d'enzyme qui cause l'augmentation de l'absorbance de 0.001 min^{-1} (**Zheng et al., 2004 ; Erat et al., 2006 ; Gawlik-Dziki et al., 2007 ; Kumar et al., 2008**). Toutes les expériences ont été réalisées trois fois et leurs valeurs moyennes ont été représentées.

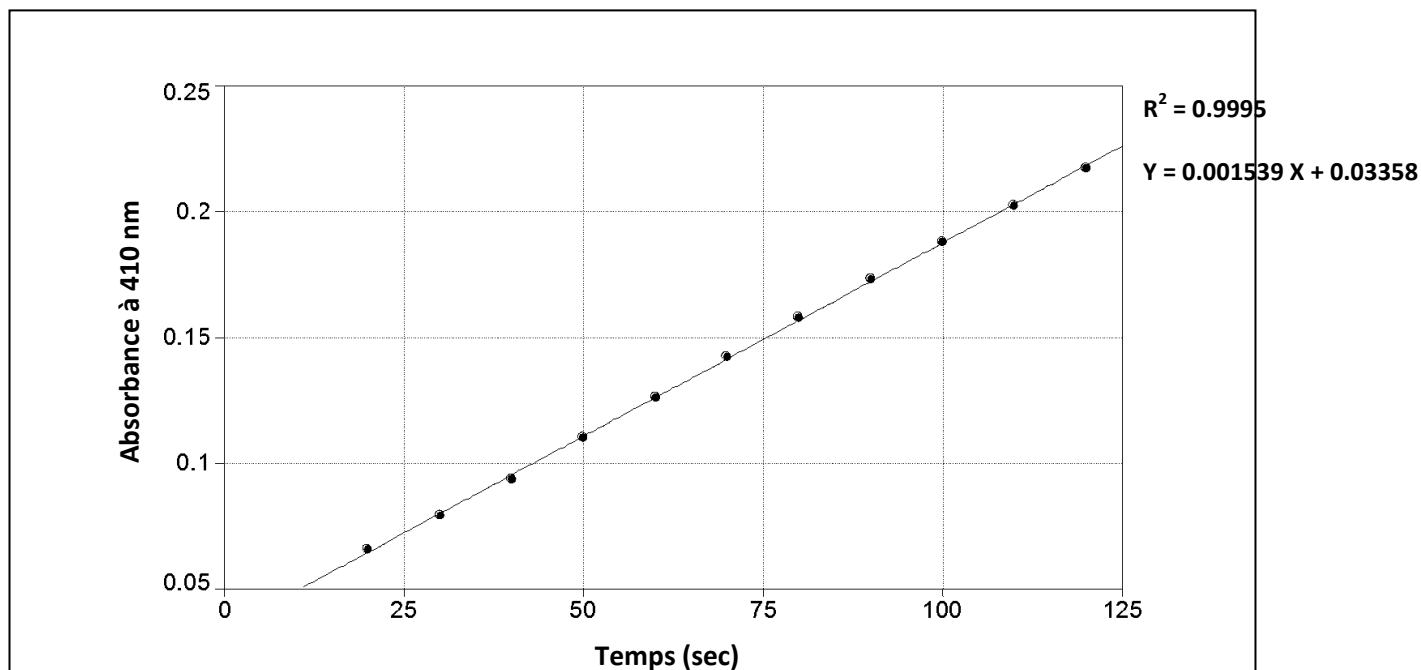


Figure 10 : Représentation graphique de la détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol par la PPO

II-B-3- Effet du pH sur l'activité de la PPO

L'activité catécholase de la PPO est mesurée à 30°C dans les intervalles de pH 3.6-8. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (0.05 M ; pH 3.6-5.6) et le tampon phosphate de sodium (0.05 M ; pH 5.8-8). Le pyrocatechol à 80 mM est utilisé comme substrat.

Une autoxydation négligeable du pyrocatechol a été produite dans les essais standards au pH inférieur ou égale à 7.0. Les activités enzymatiques mesurées à des pH supérieurs à 7.0 ont été corrigées à cause de l'autoxydation du pyrocatechol en o-benzoquinone (Palmer., 1963).

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

II-B-4-Etude de la stabilité thermique de la PPO

L'activité résiduelle de la PPO a été évaluée après incubation des tubes en verre de 1 mm d'épaisseur, contenant 2 ml d'extrait enzymatique brut pendant 10 minutes dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 et 90°C.

Après chauffage, les échantillons sont refroidis rapidement dans l'eau glacée et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à pH 5.8 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) et à 30°C, en présence de 80 mM de pyrocatechol comme substrat.

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

$$(AR)\% = \frac{(A)_t}{(A)_o} \times 100$$

Où $(A)_o$ est l'activité avant traitement thermique (activité de l'enzyme mesurée à 30°C) et $(A)_t$ est l'activité après traitement thermique.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

II-B-5- Etude cinétique et thermodynamique 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 4 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.

Les analyses des données cinétiques de l'inactivation thermique de l'enzyme peuvent être décrites par la réaction d'ordre un (**Râpeanu et al., 2006**):

$$\frac{dA_t}{dt} = -k \cdot A_t$$

Avec A_t est l'activité résiduelle de l'enzyme à l'instant t et k est la constante cinétique de la réaction à une température étudiée.

Pour des facteurs extrinsèque/intrinsèque constants, dans le cas d'une réaction de premier ordre, la cinétique peut être décrite par l'équation suivante :

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -k \cdot t$$

Le constante de vitesse d'inactivation (k) est calculée à partir de l'équation de régression linéaire suivante, (Anthon et Barrett., 2002 ; Râpeanu et al., 2006 ; Samborska, 2007) :

$$\log\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = \left(-\frac{k}{2.303}\right) \times t$$

La valeur du temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de l'activité de l'enzyme est donnée par l'expression suivante :

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

La valeur D est le temps (min) nécessaire pour réduire l'activité initiale à 90%. Elle est liée avec les valeurs de k par l'équation suivante et mathématiquement exprimée par (Espachs Barroso et al., 2006):

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

La valeur Z_T est l'augmentation de la température nécessaire pour une réduction de 90% de la valeur D (paramètre de sensibilité à la température). Il suit l'équation (Gnangui et al., 2009):

$$\log\left(\frac{D_1}{D_2}\right) = \left(\frac{T_2 - T_1}{Z_T}\right)$$

Avec T_1 et T_2 représentant respectivement la température la plus faible et la plus élevée, °C ou °K.

D_1 et D_2 sont les valeurs de D aux températures faible et élevée en minute.

La loi d'Arrhenius est souvent utilisée pour décrire la dépendance thermique des valeurs de k , et elle est algébriquement donnée par :

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E_a}{R \cdot T}$$

Avec k_0 est la constant d'Arrhenius, E_a est l'énergie d'activation ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), R est la constantes universelle des gaz parfaits ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) et T est la température absolue.

L'énergie d'activation peut être estimée à partir de la pente de l'analyse de régression linéaire du logarithme naturel de la constante de vitesse en fonction de l'inverse de la température absolue.

Les valeurs de l'énergie d'activation (E_a) et la constante d'Arrhenius (k_0) permettent de déterminer les différents paramètres thermodynamiques (**Marin et al., 2003**) comme la variation de l'enthalpie, de l'entropie et l'énergie libre de Gibbs, ΔH , ΔS et ΔG , respectivement, selon les expressions suivantes (**Galani & Owusu Apenten, 1997**).

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

$$\Delta H = E_a - R.T$$

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T}$$

Avec K_B est la constant de Boltzmann ($1.3806 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), h_P est la constant de Planck ($6.6262 \times 10^{-34} \text{ J.s}$), T est la température absolue en Kelvin (K), et k la constante cinétique d'inactivation thermique pour chaque température (s^{-1}).

IV-1-Le pH optimal de l'activité de la PPO

La (Figure 11) représente le profil de l'activité enzymatique relative en fonction du pH de l'oxydation du pyrocatechol par la PPO des dattes Deglet Nour qui a l'aspect d'une courbe en cloche.

L'activité de la PPO est maximale à pH 5.8 et de part et d'autre de cette valeur de pH l'activité enzymatique diminue progressivement. Cette diminution de l'activité enzymatique peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation du substrat et/ou des résidus des acides aminés du site actif qui donnent naissance aux interactions défavorables entre l'enzyme et son substrat.

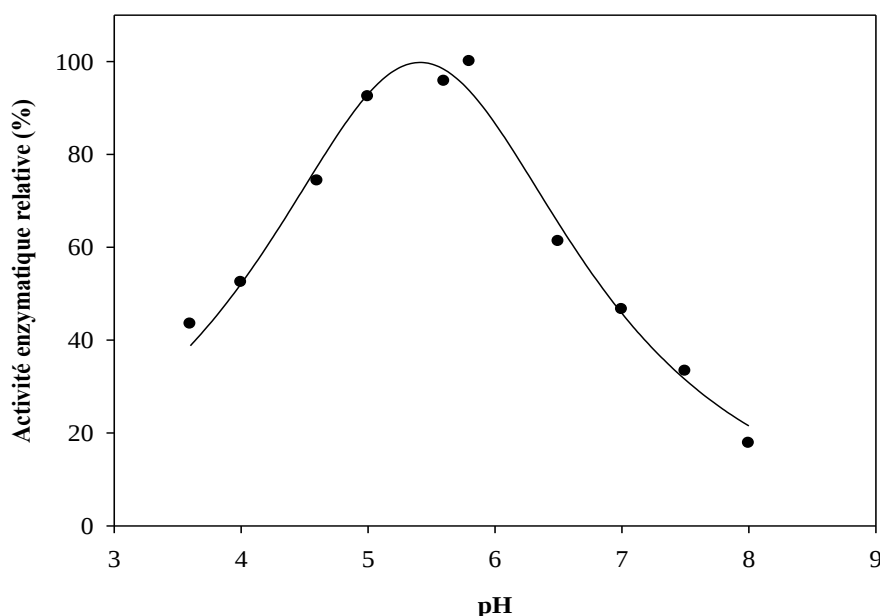


Figure 11 : Représentation graphique de la variation de l'activité enzymatique de la PPO des dattes Deglet Nour en fonction du pH.

Nos résultats sont en accord avec ceux mentionnés dans la littérature. Hamdan (1975) a initialement signalé que l'activité de la PPO des dattes Deglet Nour d'Iraq est optimale à pH 6.8. Hasegawa et Maier (1980) ont constaté que le pH optimal de la PPO des dattes Deglet Nour d'Amérique est compris entre 4.5-6.5.

Sachde et *al.* (1989) ont trouvés que le pH optimal de la PPO des dattes Deglet Nour d'Iraq égale à 6.1. Les valeurs des pK_{a1} et pK_{a2} apparents sont respectivement 4.6 et 7.1.

Lourenço et *al.* (1990) ont trouvé que les valeurs des pKs sont 4.6 et 6.7 de l'oxydation de l'acide chlorogénique par la PPO de palme.

Park et *al.* (1980) ont remarqué que l'activité de la PPO de la mangue est optimale entre le pH 5.6 et 6 en présence de pyrocatechol comme substrat.

Le pH optimal de l'activité PPO varie avec la source de l'enzyme de la méthode d'extraction et d'une manière générale du substrat utilisé (**Luh et Phithalopol., 1972 ; Vámos-Vigyázó., 1981 ; Gouzi et Benmansour., 2007 ; Kolcuoğlu et al., 2006**). Le type de tampon et la pureté de l'enzyme affectent aussi la valeur du pH optimal (**Vámos-Vigyázó., 1981**). Le pH optimal de la plupart des PPOs étudiées est entre pH 5 et 7 (**Mayer et Harel, 1979**).

IV-2- Etude de la stabilité thermique de la PPO

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) sont représentés dans la (Figure 12). Après 10 min de chauffage, une augmentation non négligeable de l'activité catécholase a été observée lorsque l'enzyme est traitée à 40°C pendant 10 min. Cet augmentation de l'activité enzymatique peut être due à l'activation par le choc thermique des formes d'enzyme liée ou latente. L'activation thermique des PPOs latentes obtenues à partir d'avocat (**Kahn., 1977**), de la pomme (**Vámos-Vigyázó., 1981**), de la mangue (**Robinson et al., 1993**), et de la poire (**Gauillard et Richard-Forget., 1997**) a été mise en évidence.

Les températures supérieures à 50°C provoquent une diminution progressive de l'activité enzymatique due d'une part aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire ou de la destruction du site actif de l'enzyme (**Khatun et al., 2001**) d'autre part à la présence des formes multiples de la PPO dont certaines d'entre eux sont extrêmement thermolabiles Il est également probable que le chauffage doux cause la dissociation de quelques formes oligomères de la PPO aux monomères moins actifs (**Yemenicioğlu., 2002**).

Après 10 min de traitement à 55, 65 et 70°C, l'activité de la PPO est réduite par 15.34, 34.9 et 50 %, respectivement. Une activité catécholase résiduelle négligeable a été mesurée lorsque l'enzyme est incubée à 80°C. L'enzyme est presque totalement

dénaturée à 90°C. Par conséquent, il semble que la PPO des dattes Deglet Nour d'Algérie est plus thermostable par rapport aux PPOs obtenues à partir de la fraise (*Fragaria ananassa*) (Dalmadi et al., 2006), de la mangue (*Mangifera indica* L. CV. "Tainong") (Wang et al., 2007), du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (Gouzi et Benmansour., 2007), du raisin (*Vitis vinifera* ssp. sativa) (Rapeanu et al., 2005).

Sachde et al. (1989) ont trouvés que les PPOs obtenues à partir de deux variétés de dattes de l'Iraq (Barhee et Zahdi ou Deglet Nour) sont moins stables à des températures supérieures à 35°C, et sont complètement inactivées à 70°C, après incubation pendant 10 min. Par contre, Hasgawa et Maier (1980) ont constatés que la PPO de Deglet Nour d'Amérique retient son activité initiale après 10 min de traitement à 60°C, mais elle est complètement inactivée après incubation à 80°C.

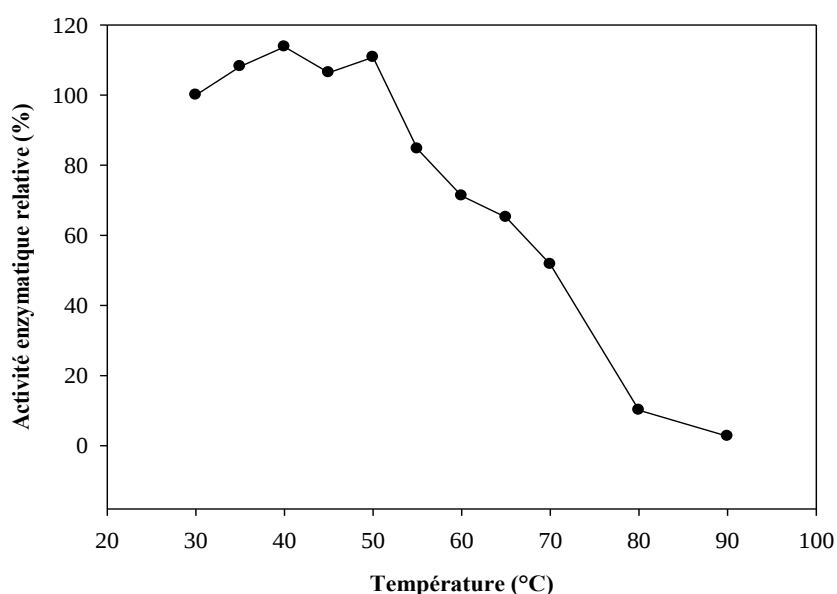


Figure 12 : Stabilité thermique de l'activité catécholase de l'extrait brut de la polyphénol oxydase des dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 80mM de pyrocatechol dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.0.

IV-3- Etude cinétique et thermodynamique de l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase de *Phoenix dactylifera* L.

IV-3-1- Etude cinétique

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 par **Aymard et Belarbi (2000)** :

$$\frac{A_t}{A_0} = A_L \exp(-K_L t) + A_R \exp(-K_S t)$$

Avec :

A_R et A_L : Représentent l'activité enzymatique résiduelle des deux fractions résistante et labile respectivement ;

K_S et K_L (min^{-1}) : Représentent les constantes de vitesse d'inactivation de la réaction du premier ordre des deux fractions résistante et labile respectivement ;

t (min) : temps de traitement thermique.

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; Polakovic et Vrabel., 1996 ; Padron et Lozano., 1975**).

D'après la (Figure 13), on remarque 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 al., 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).

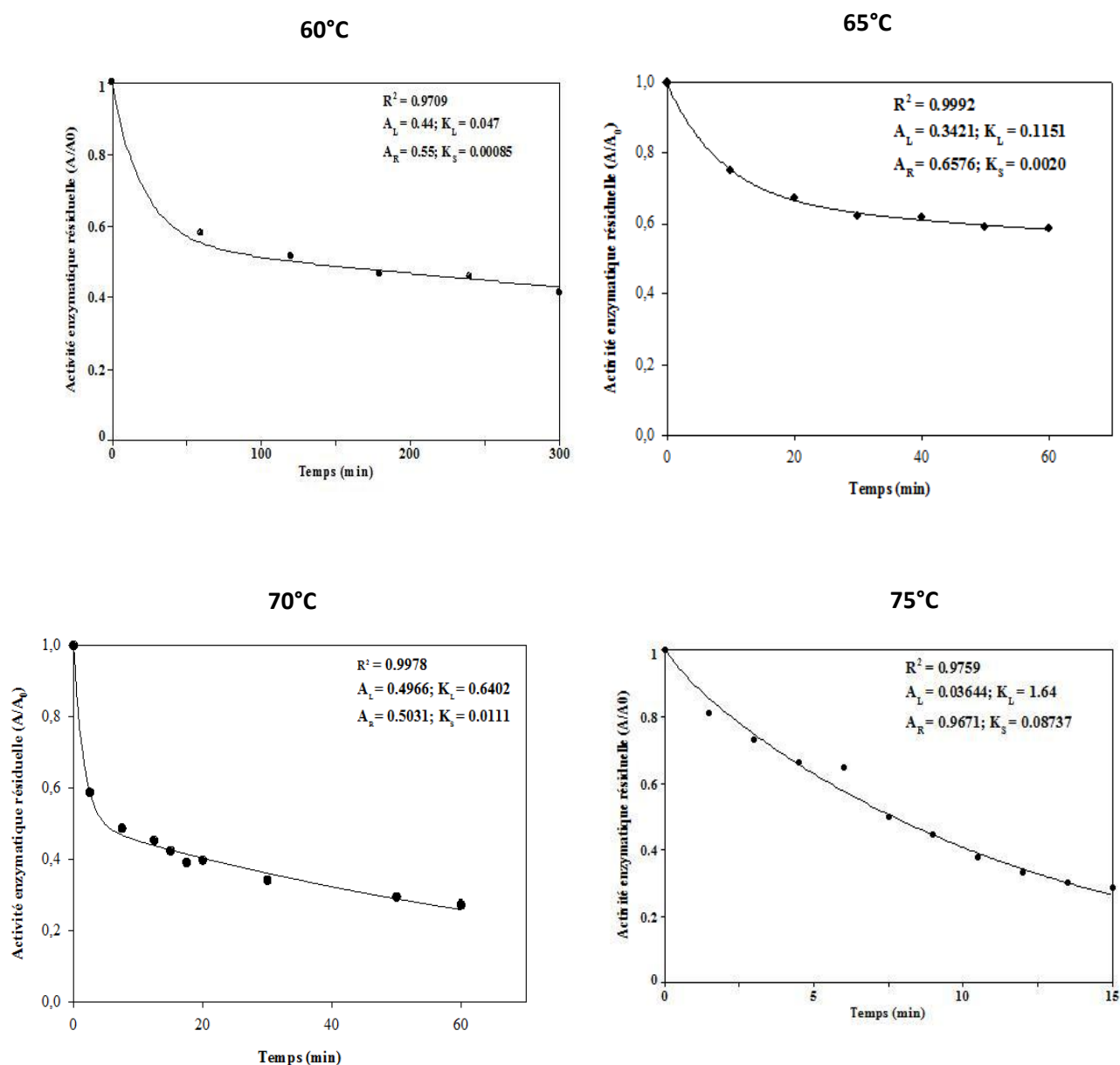


Figure 13 : Les graphes de l'inactivation thermique de l'extrait brut de la polyphénol oxydase de (*Phoenix dactylifera* L) dans des températures comprises entre 60-75°C. Les conditions expérimentales sont : catéchol 80 mM, pH 5.8 (tampon acétate 0.05 M).

Le (Tableau 3) 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 (**Rapeanu et al., 2005 ; Dalmadi et al., 2006**).

Tableau 3 : Les paramètres cinétiques estimés de l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase de (*Phoenix dactylifera* L).

Température (°C)	A_L	$K_L(\text{min}^{-1})$	$D_L(\text{min})$	$t_{1/2}$	A_R	$K_s(\text{min}^{-1})$	$D_s(\text{min})$	$t_{1/2}$	R^2
60	0.44	0.047	48.991	14.747	0.55	0.00085	2708.92	815.46	0.9709
65	0.3421	0.115	20.005	6.022	0.657	0.0020	1151.29	346.57	0.9992
70	0.496	0.640	3.596	1.082	0.503	0.0111	207.44	62.44	0.9978
75	0.0364	1.64	1.404	0.422	0.967	0.08737	26.35	7.93	0.9759
	$E_{aL}=238.35 \text{ kJ/mol}$ $Z_T=9.31$				$E_{aS}=300.100 \text{ kJ/mol}$ $Z_T=7.37$				

On remarque d'après le (Tableau 3) 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 al., 2006 ; Gnangui et al., 2009**).

Le $t_{1/2}$ 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*) ($t_{1/2} = 11.08 \text{ min}$; 60°C, $t_{1/2} = 0.56 \text{ min}$; 70°C) mais moins thermostable par rapport à la PPO obtenu à partir de l'ananas ($t_{1/2} = 79.67 \text{ min}$; 60°C, $t_{1/2} = 63.01 \text{ min}$; 70°C) (**Chutintrasria et Noomhorm., 2006**).

La (Figure 14) 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.

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 : $E_{aL} = 238.35$ kJ/mol et $E_{aS} = 300.1$ kJ/mol. Ces deux valeurs d'énergie d'activation sont différentes par rapport à celle trouvée par Sachde et al. (1989) (112.86- KJ/mol, mais sont presque similaires par rapport à celles obtenues par Rapeanu et al., (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 al., 1998; Sachde et al., 1989 ; Chutintrsri 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 (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 al., 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 al., 1951).

La (Figure 15) 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 obtenu à partir des fruits sont comprises entre 8.5 à 10.95°C (Ünal et al., 2007 ; Rapeanu et Bulancea, 2005 ; Ünal et Şener, 2006 ; Rapeanu et al., 2006 ; Strubi et al., 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 reflète leur variété et due aussi aux conditions climatiques où ils ont développés (Chutintrsri et Noomhorm., 2006).

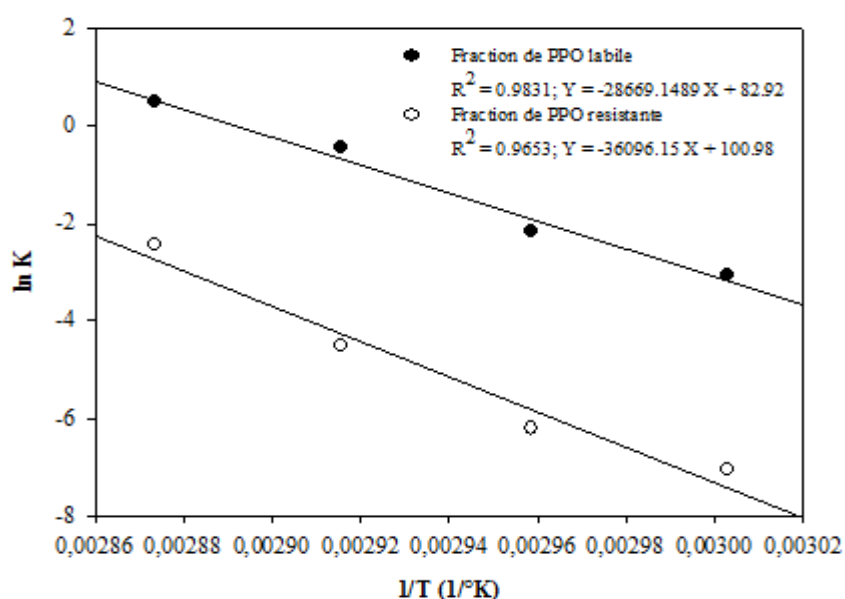


Figure 14 : Graphique d'Arrhenius de la vitesse d'inactivation thermique de la polyphénol oxydase des deux fractions (stable et résistante) des dattes (*Phoenix dactylifera* L.).

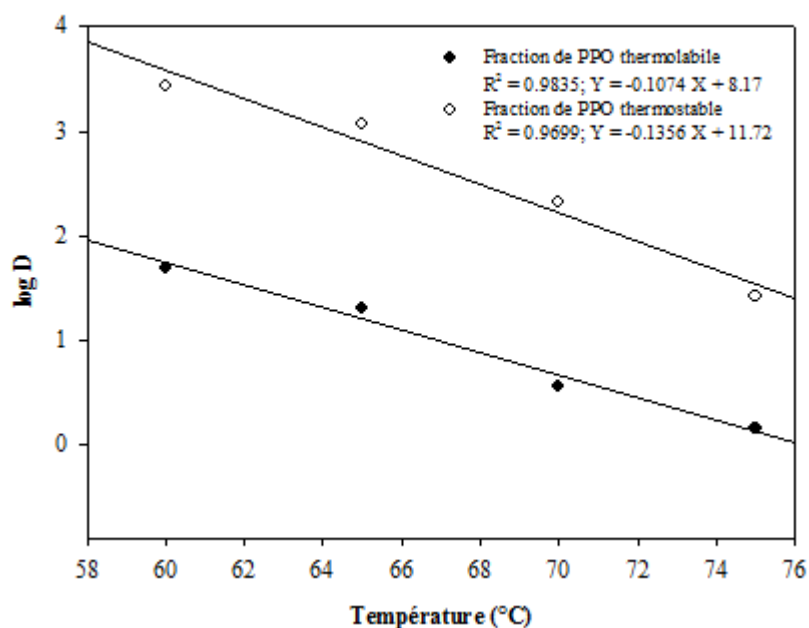


Figure 15 : Représentation graphique de l'effet de la température sur la valeur-D de l'inactivation de l'activité polyphénol oxydase des deux fractions (stable et résistante) des dattes (*Phoenix dactylifera* L.).

IV-3-2- Analyse thermodynamique

Dans toutes les températures testées, la valeur moyenne de ΔG pour les deux formes sensible et résistante de la PPO de datte (*Phoenix dactylifera* L.) est presque similaire à une

valeur de 98.95 et 109.59 kJ/mol, respectivement (Tableau 4). Toutes les valeurs de ΔG dans le (Tableau 4) sont en accord avec la valeur constante relative de 100 kJ/mol caractéristique de la réaction de dénaturation d'une protéine (Busto et al., 1999; Yun et al., 2007). La valeur ΔG est directement liée à la stabilité de la protéine : une ΔG élevée indique une stabilité élevée de l'enzyme (Longo & Combes, 1999). Cependant, il peut être conclu que l'activité de la PPO_S de datte est plus thermostable par rapport à l'activité de la PPO

Les changements d'enthalpie (ΔH) et d'entropie (ΔS) des activités PPO_S et PPO_L de la PPO de datte ont été calculées et les résultats sont présentés dans le (Tableau 4). Les valeurs moyennes de ΔH de l'inactivation thermique de la PPO de datte sont 235.52 kJ/mol pour la forme labile et 297.27 kJ/mol pour la forme résistante. Ces résultats suggèrent que la PPO_S plus thermostable par rapport à l'activité de la PPO_L, apparemment en raison de la valeur élevée de ΔH pour l'inactivation (Gnangui et al., 2009). La valeur de ΔH value trouvée dans cette étude est beaucoup élevée par rapport à celles reportées par Colak et al. (2007) pour la PPO des champignons comestibles (*Lepista nuda* (13 kJ/mol), *Hypholoma fasciculare* (36 kJ/mol) et *Armillaria mellea* (64 kJ/mol), par Duangmal et Owusu Apenten (1999) pour la PPO de pomme de terre (98.02 kJ/mol), par Waliszewski et al. (2009) pour la PPO d'haricot de vanille (89.24 kJ/mol) et par Mdluli (2005) pour la PPO de marula (35.79 kJ/mol). La valeur ΔS trouvée dans cette étude pour l'activité catécholase est élevée par rapport à celles trouvées pour les isoenzymes de la PPO du sagoutier (*Metroxylon sagu*) (137.71-222.87 J/mol.K ; Onsa et al., 2011), mais relativement similaire par rapport à celle de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (382.06 J/mol.K; Gouzi et al., 2012).

Tableau 4 : Les paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de l'extrait brut de la PPO de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) à différentes températures.

Température (°C)	ΔH (kJ/mol)		ΔG (kJ/mol)		ΔS (J/mol/K)	
	ΔH_L	ΔH_S	ΔG_L	ΔG_S	ΔS_L	ΔS_S
60	235.58	297.33	101.66	112.77	402.16	554.23
65	235.54	297.28	100.71	112.10	398.88	547.89
70	235.50	297.24	97.35	108.91	402.75	549.07
75	235.45	297.20	96.09	104.57	400.47	553.54
	235.52	297.27	98.95	109.59	401.07	551.18

Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de ce mémoire s'est focalisé d'une part sur l'étude cinétique de l'inactivation thermique de la PPO de datte et d'autre part de déterminer les paramètres thermodynamiques de cette enzyme.

Le traitement thermique de l'extrait aqueux de datte aux températures comprises entre 60°C et 75°C montre que l'activité de la PPO dépend non seulement de la température du milieu mais dépend également du temps d'incubation de l'enzyme.

Les résultats cinétiques de l'inactivation thermique de la PPO pourront être décrits correctement par un modèle cinétique biphasique. Ce comportement cinétique est dû à la présence d'une fraction d'enzyme thermostable et d'une fraction d'enzyme non thermostable.

Les paramètres thermodynamiques suggèrent que la PPO dans l'extrait aqueux de datte est structurellement robuste puisque le processus d'inactivation est principalement entropique.

Un traitement thermique efficace pourra réduire l'activité de la PPO et par conséquent le brunissement enzymatique des dattes.

En perspectives, il serait envisageable de réaliser le traitement thermique de l'enzyme avec d'autres méthodes physiques par exemples la pression, les ultrasons ou l'irradiation UV.

Abou zied, A. A., & Baghlef, A. O. (1983). Utilization of date seeds and cheese whey inproduction of citric acid by *Candida lipolytica*. *Agricultural Wastes* V8, P131–142.

Abou zied, A. A., & Khoja, S. M. (1993). Utilization of dates in the fermentative formation of citric acid by *Candida lipolytica*. *Zentral Microbiology* V 148, P213–221.

Abou zied, A. A., Abderrahman, N., & Baghlef, A. O. (1991). The formation of oxytetracycline in date-coat medium. *Bioresource Technology* 37, P179–184.

AL-BEKR, A.J. (1972). The date palm. Ed: Horticulturist M.S, Univ. of Califor nia, pp1084

Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., & Shahidi, F. (2005). Compositional and sensory characteristics of three native sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal ofAgricultural and Food Chemistry* V53, P7586–7591.

Al-Hooti, S., J.S. Sidhu and H. Qabazard. (1995). Studies on the physico-chemical characteristics of date fruits of five UAE cultivars at different stages of maturity. *Arab Gulf J. Sci. Res* V 13. P553-569.

Al-hooti, S., Sidhu, J. S., Al-otaibi, J., Al-ameeri, H., & Qabazard, H. (1996). Quality and acceptability of processed products from date fruits cultivars grown in the United Arab Emirates. *Journal of scientific research* V14, P383–403.

Al-obaidi, Z. S., & Berry, D. R. (1982). Saling up of citric acid fermentation using fermenters. *Date Palm Journal* V2, P19–33.

Al-Shahib, W., Marshall, R.J. (2002). Dietary fibre content of dates from 13 varieties of date palm *Phoenix dactylifera* L. *International Journal of Food Science and Technology* V37, P719-721.

Amiot, MJ., Flueriet, A., Chenynier, V., Nicolas, J. (1997). Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: *Phytochemistry of fruits and vegetables*. (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) *Clarendon Press, Oxford*. P51-85.

Anderson, J.V and Morris, C.F. (2001). An improved Whole-Seed Assay for Screening Wheat Germ plasm for Polyphenol oxidase activity. *CROP SCIENCE* V41, P1697-1705.

Anosike, E.O. and Ayaebene, A.O. (1982). Propenies ofpolyphenol oxidase trom yam tubers *Dioscorea bu/bifera*. *Phytochem* V 21(8), P1889-1893.

Anthon, G.E., and 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.

Anwar-Shinwari, M. (1987). Iron content of date fruits. *Journal of theCollege of Science-King-Saud-University* V18 (1), P5–13.

- Arar, K ; Ziani, A.** (2009). Thèse d'ingénieur sur l'étude de l'effet de traitement thermique sur l'activité de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* : analyse cinétique et thermodynamique. Université de Laghouat. P58.
- Ardestani A., Yazdanparast R.** (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem* V 104, P21-29.
- Ates, K., Koc, R., Nergizoglu, G., Erturk, S., Keven, K., Sen, A., Karatan, O.** (2000). The longitudinal effect of a single peritonitis episode on peritoneal membrane transport in CAPD patients. *Perit Dial Int* V 20. P220–226
- Atlow, S.C., Bonadonna, M., Apero, L.C., Klivanov, A.M.** (1984). Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *J. Biotechnol. Bioeng* V26. P599-603.
- Aymard, C., and Belarbi A.** (2000). Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. *Enzyme and microbial technology* V 27, P612-618.
- Balasundram, N., Sundram, K., et Samman, S.** (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. P191–203.
- Baldwin, E.A., Nispero-Carriedo, M.O., Chen, X., Hagenmaier, R.D.**(1996). Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biol. Technol* V 9, P151–163.
- Barreveld, W.H.** (1993). Date palm products; FOA Agricultural services bulletin. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome .N° 101M-17;ISBN 92-5-103251-3
- Barthet, V. J.** (1997). Polyphenol Oxidases from Cassava (*Manihot esculenta C.*) Root: Extraction, Purification and Characterization. A Thesis Submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in Partial Fulfilment of the Requirements for the degree Philosophiae Doctor in the Department of Food Science and Agricultural Chemistry University McGill (Macdonald Campus) Montreal, PQ, Canada, pp. 179.
- Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q. T., Bernard, P.** (2002). Preliminary screening of some tropical plants for antityrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology* V82, P155- 158.
- Belarbi, A., Aymard, C., Meot, J.M., Themelin, A., Reynes, M.** (2000). Water desorption isotherms for eleven varieties of dates. *Journal of Food Engineering* 43, 103–107..

- Benchabane, A.** (1996). Rapport de synthèse de l'atelier "Technologie et qualité de la dattes". In Options méditerranéennes, série A, N° 28. Séminaires méditerranéens. Ed. IAM, Zaragoza, Spain, pp. 205-210.
- Benchelah A. C., M.Maka.** (2006). Les dattes de la préhistoire à nos jours Ethnobotanique phytothérapie. Numéro 1, P43-47
- Bennaceur, M., Lanaud, C., Chevalier, M.H., Bounaga, N.** (1991). Genetic Diversity of the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) from Algeria Revealed by Enzyme Markers. Plant Breeding V107, P56-69.
- Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., Bahloul, N., Lognay, G., Drira N.E., and Attia, H.** (2004). Date seed oil: phenolic, tocopherol and Sterol profiles, Journal of Food Lipids V 11, P251–265.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., et Berset, C.** (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH. Free Radical Method. Lebensm.-Wiss. u.-Technol V 30, P609–615.
- Bonner, W.D.** (1955). Phenol oxidase reduction of cytochrome c. Plant Physiol. V 30, suppl. XXIX, XXX.
- Bouchilloux, S., McMahonill, P., and Mason, H.S.** (1963). J. Biol. Chem V 238, P1699-1707.
- Brac de la Perrière, R.A.** (1995). Le Palmier-dattier. Édisud Tunis, Aix-en-Provence, P450.
- Buckow, R., Weiss, U., Knorr D.** (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. Innovative Food Science and Emerging Technologies V 10, P441-448.
- Buelguedj, A., Nacib, N.** (2001). Production d'acide lactique par lactobacillus Rhamnosus sur milieu à base de jus de dattes .Rev.Enreg.Ren.production et valorisation biomasse. P41-46.
- Burton, S.G.** (1994). Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. Catalysis Today V 22, P 459-487.
- Busto, M., Iyengar, B., Campos, A.R.** (1999). Genetic dissection of behavior: modulation of locomotion by light in the *Drosophila melanogaster* larva requires genetically distinct visual system functions. J. Neurosci V 19(9), P 3337--3344.
- Cabanes J., Chazarra S., Garcia-Carmona F.** (2002). Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. J. Theor. Biol V214, P321-325

Chan, H. T and Yang, H. Y. (1971). Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the mcfarlin cranberry. *Journal of food science* Vol 35, P169.

Cheikh-Rouhou, S., Baklouti, S., Hadj-Taieb, N., Besbes, S., Chaabouni, S., Blecker, C., Attia, H. (2006). Elaboration d'une boisson à partir d'écart de triage de dattes:Clarification par traitement enzymatique et microfiltration. *Fruit V* 61, P389–399.

Chen, L and Flurkey, W.H. (2002). Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current topics in phytochemistry. V* 5, P109-120.

Chevalier, T., Rigal, D.D; Mbéguié-A-Mbéguié, D., Gauillard, F., Richard-Forget, F., Fils-Lycaon, B.R. (1999). Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol oxidase. *Plant Physiology V* 119, P1261-1269.

Cho, Y.K and Ahn, H.K. (1999a). Purification And Characterization Of Polyphenol Oxidase From Potato: I. Purification And Properties. *Journal of Food Biochemistry V* 23, P577-592.

Cho, Y.K and Ahn, H.K. (1999b). Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry V* 23, P593-605.

Chutintrasri, B and Noomhorm, A. (2006). Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. *Lwt V* 39, P492-495.

Claus, H and Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology V* 29. Issue 1, P3-14.

Claus, H., Decker, H. (2006). *Syst. Appl. Microbial V*29. P3-14.

Colak, A., Kolcuoglu, Y., Sesli, E., & Dalman, O. (2007). Biochemical composition of some Turkish fungi. *Asian Journal of Chemistry V*19, P2193–2199

Craft C. C., Audia W. M. (1962). Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Bot. Gaz V*123, P211-219

Dalmadi, I., Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., & Hendrickx, M. (2006). Characterisation and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: A kinetic study. *Journal of Food Biochemistry V* 30, P56–76.

Dawson, C.R and Magee, R.J. (1955). Plant tyrosinase (polyphenol oxidase). *Methods in enzymology V* 2, P 817-831.

Dowson, V.H.W et Aten, A. (1963). Récolte et conditionnement des dattes Ed: F.A.O, Rome, pp20

Decker, H., & Jaenicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology* V28, P673-687.

Decker, H., Schweikardt, T., and Tuczek, F. (2006). The first crystal structure of tyrosinase. All questions answered? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* V 45, P4546–4550.

Della Longa, S., Ascone, I., Bianconi, A., Bonfigli, A., Congiu Castellano, A; Zarivi, O and Miranda, M. (1996). The Dinuclear Copper Site Structure of *Agaricus bisporus* Tyrosinase in Solution Probed by X-ray Absorption Spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry* V271, N° 35, P 21025–21030.

Devece, C., Rodriguez-Lopez, J. N., Fenoll, L. G., Tudela, J., Catala, J. M., de los Reyes, E., Garcia-Canovas, F. (1999). Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem* V47, P4506-4511.

Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H; Laane, C., Van Berkel, W.J.H and Voragen, A.G.J. (2002). NOTE & TIPS. Zymography of Monophenolase and o-Diphenolase Activities of Polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry* V306, P336-339.

Dijkstra L., Walker J. R. L. (1991). Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric* V 54, P 229-234.

Dimick, K.P., Ponting, J.D and Makower, B. (1951). Heat inactivation of polyphenolase in fruit purees. *Food Technology* V6, P 237-241.

Ditchfield, C., Tadini, C.C., Machoshvili, I.A and Penna, T. C. V. (2006). Polyphenol oxidase and peroxidase thermal inactivation kinetics used as indicators for the pasteurization of acidified banana puree (*Musa cavendishii*, Lamb.). *Braz. J. Food Technol* V9, N°1, P 77-82.

Djerbi, M. (1994). Précis de phoeniciculture. FAO, pp.192

Dogan, S., Turan, Y., Ertlrk, H., Arslan, O. (2005). "Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.)." *J. Agric. Food Chem.*, V53, P776-785.

Duangmal, K., Apenten R.K.O. (1999). A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry* V 64, P351-359.

Duckworth, H.W and Coleman, J.E. (1970). Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry* V245, N° 7, P 1613-1625.

Eicken C., Krebs B., Sacchettini J. C. (1999). Catechol oxidase - structure and activity. *Curr. Opin. Struct. Biol* V9, P 677-683.

- El-Bayoumi, M.A and Frieden, E.** (1957). A Spectrophotometric Method for the Determination of the Catecholase Activity of Tyrosinase and Some of its Applications V79, P4854-4858.
- Erat, M., Halis, S.O., Irfan, K.** (2006). Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. Food Chemistry V95, P503–508
- Escribano, I., Tudela, I., Garcia-Carmona, F., and Garcia-Canovas, F.** (1989). A kinetic study of the suicide of the inactivation of an enzyme measured through coupling reactions: application to the suicide inactivation of tyrosinase. Biochem V 262. P597-603.
- Espachs-Barroso, A.V. Loey, M. Hendrickx, O. Martín-Belloso.** (2006). Inactivation of plant pectin methylesterase by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. Innovative Food Science & Emerging Technologies V7, Pp 40–48
- Espiard, E.** (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc Lavoisier, pp.147-155.
- 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 V47, P 3518-3525.
- Espín, J.C., Morales, M and Varón, R.** (1995). A continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple Polyphenol Oxidase. Analytical Biochemistry V231, P 237-246.
- Fan, Y., and Flurkey, W.H.** (2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. Phytochemistry V65, P 671-678.
- Fang, Z., Zhang, M., & Wang, L.** (2007). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.). Food Chemistry V 100, P845–85.
- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F and Tudela, J.** (2000). Action Mechanism of Tyrosinase on *meta*- and *para*-Hydroxylated Monophenols. BioChem V381, P 313-320
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F., Tudela, J.** (2004). Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. J Biol chem V380, P643-650.
- Flurkey, W.H.** (2002). 'Laccase'. In Handbook of Food Enzymology (J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, and D.W.S. Wang, Eds.) Marcel Dekker, Inc. Chapter 40, P525-538.
- 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 V113. P1008-1014.

- Frieden, E and Ottesen.** (1959). A Simplified method for the purification of mushroom polyphenol oxidase. Short Communications V34, P248-251.
- Friedman, M.** (1997). Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. J. Agric. Food Chem V45, P1523-1540.
- Galani, D. et Owusu Apenten, K. R.** (1997). The Comparative Heat Stability of Bovine - Lactoglobulin in Buffer and Complex Media. Journal of the science of food and agriculture V74 (1), Pp 89-98;
- Gamil-Abdel-Hafez, M., Shalaby, A.F., & Akhal, I.** (1980). Chemical composition of 15 varieties of dates grown in Saudi Arabia. Fourth Symposium on biological aspects of Saudi Arabia, P89–91.
- Gandia-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F and Escribano, J.** (2005). Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. Biol. Chem V 386, P601-607.
- 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 V15, P162-173
- Gasowska, B., Wojtasek, H., Hurek, J., Drag, M., Nowak, K and Kafarski, P.** (2002). Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl)methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase. Eur. J. Biochem V 269, P4098-4104.
- Gauillard, F. and Richard-Forget, F.** (1997). Polyphenoloxidases from Williams pear (*Pyrus communis* L., cv. Williams): activation, purification and some properties. Journal of Science of Food and Agriculture V74, P49-56.
- Gauillard, F; Richard-Forget, F and Nicolas, J.** (1993). New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. Analytical Biochemistry V215, P 59-65
- Gawlik-Dziki, U; Szymanowska, U; Baraniak, B.** (2007). Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. botrytis italica) florets. Food Chemistry V105, P1047-1053.
- Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., Sweica, M.** (2007). characterization of Polyphenol Oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.). J Food Chemistry V107, P129-135.
- Gheibi, N., Saboury, A. A., Haghbeen, K and Moosavi-Movahedi, A. A.** (2006). The effect of some osmolytes on the activity and stability of mushroom tyrosinase. J. Biosci V31 (3), P355-362.
- Gilles, P.** (2000). Cultiver le palmier dattier .Ed. CIRAS, P110.

- Gnangui, S. N., Dué, E. A., N'guessan Kouadio, J-P. E and Kouamé, L. P.** (2009). Effect of heat treatment on edible yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata* cv longbô) polyphenol oxidase activity: kinetic and thermodynamic analysis. Journal of animal & plant sciences V2, Issue 3, P128 -137.
- Golbeck, J.H and Cammarata, K. V.** (1981). Spinach Thylakoid Polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. Plant Physiol V67, P977-984.-
- Gouzi, H. et Benmansour, A.** (2007). Partial purification and characterization of Polyphenol Oxidase Extracted from *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbatch. International Journal Of Chemical Reactor Engineering V5.Article A76.
- 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 V60, P500-506.
- Haghteen, K., Saboury, A.A., Karbassi, F.** (2004). Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. Biochimica et Biophysica Acta V1675. P139-146.
- Hamdan, AM.** (1975). Date polyphenol oxidase. M.Sc. Thesis, College of Agriculture, University of Baghdad.
- Hannachi, S., Khitri, D., Benkhalifa, A., Brac de Perrière, R.A.** (1998). Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. P225.
- Harel, E., Mayer, A. M. and Lerner, H. R.** (1970). Change in the level of catechol oxidase and laccase activity in developing peach. J. Sci. Food Agric V21, P542-544.
- Hasegawa, S., and Maier, V. P.** (1980). Polyphenol oxidase of dates. J.Agric. Food Chem V28, P891-893.
- Hibane, Hayet .** (2008). Thèse de doctorat sur : l'Aptitudes Technologiques de Quelques Variétés Communes de Dattes : Formulation d'un Yaourt Naturellement Sucré et Aromatisé ; Spécialité : Génie Alimentaire, université de Boumerdes. P131.
- Himmelwright, R. S., Eickman, N. C., Solomon E. I.** (1980). Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. J. Am. Chem. Soc. P102.
- Hobani, A. I.** (1998). Rheological behaviour of date-water concentrates. Journal of Food Engineering 36, P349–357.
- Hussein, A. S., Alhadrami, G. A., & Khalil, Y. H.** (1998). The use of dates and date pits in broiler starter and finisher diets. Bioresource Technology V66, P219–223.
- Irwin, P.L., Pfeffer, P.E., Doner, L.W., Sapers, G.M., Brewster, J.D., Nagahashi, G., Hicks, K.B.** (1994). Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomalto-

cligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydr. Res* V 256, P 13-27.

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

Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Nicolas J. (1989). Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry* V 28, P 2903-2907.

Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J and Pellon, G. (1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res* V102, N°: 12, P1459-1483.

Joslyn, M.A and Ponting, J.D. (1951). Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res* V3, P 1- 44.

Kahn, V. (1985). Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on *o*-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci* V50, P111-115.

Kahn, V. (1977). Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning. *Journal of Food and Agriculture* V28, P 233.

Keilin, D and Mann, T. (1938). Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B* V125, P 187-204.

Kertesz, D., Zito, R. (1962). Phenolase. In *Oxygenases*, ed. O. Hayaishi. Academic Press, New York, pp.307-354.

Khatchadourian, H. A., Sawaya, W. N., Khalil, J., & Mashadi, A. S. (1983). Processing of five major Saudi Arabian date varieties into dates butter and dates in syrup. *Date Palm Journal*, 1, P103–119.

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* V 4, Issue 9, P 1129-1132.

Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C and Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *nature structural biology* V5, N° 12, P 1084-1090.

Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N. (2006). “Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*).” *Food Chemistry* V101, P778-785

Kubowitz, F. (1938). Spaltung und resynthese der polyphenoloxydase und des hamocyanins. *Biochem. Z.* V299, P 32-57.

- Kuby, S.A.** (1991). Effect of pH and temperature. In: "A study of enzymes", Mechanism of enzyme action, CRC Press, V1, P163-190.
- Kulkarni, S.G., Vijayanand, P., Aksha, M., Reena, P., Ramana, K.V.R.** (2008). Effect of dehydration on the quality and storage stability of immature dates (*Phoenix dactylifera*). LWT–Food Sci. Technol V 41, P278–283.
- Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T. C., Murugan. K.** (2008). Purification and kinetic characterization of Polyphenol Oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra* L.) Food Chemistry V110, P 328-333.
- Kuwabara, T., Katoh, Y.** (1999). Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. Plant Cell Physiol V 40, P1029-1035
- Lax, A. R., Vaughn, K. C.** (1991). Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. Plant Physiol V96, P 26-31.
- Lerch, K.** (1981). Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine-monoxygenase. in Metal ions in biological systems. H. Siegel. New York, Marcel Dekker V 13, P143-186.
- Lerch, K.** (1982). Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. J. Biol. Chem V 257, P6414–6419
- Lerch, K.** (1995). Tyrcsinase: Molecular and Active-Site Structure. In Enzymatic browning and its prevention. C. Y. Lee, J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society: P64-80.
- Lerman, L.S.** (1953). A biochemically specific method for enzyme isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* V39, P232-236.
- Likhitwitayawuid, K.** (2008). Stilbenes with tyrcsinase inhibitory activity. Curr. Sci V 94, P44-52.
- Luh, B. S., & Phithakpol, B.** (1972). Characteristic of polyphenol oxidase related to browning in cling peaches. Journal of Food Science V 27, P264–268.
- Maeda, K and Fukuda, M.** (1991). *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. J Soc Cosmet Chem V42, P361-368.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., & Kefalas, P.** (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). Food Chemistry V89, P411–420.
- Marangoni, A.G.** (2003). *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*. Wiley, Hoboken, New Jersey, P140–158
- Marin, A., Carias, D., Maria Cioccia, A., Hevia, P.** (2003). Nutritive value of leaves of *Musa paradisiaca* and *Clitoria ternatea* as dilutents in diets for broilers. Interiencia V 28 (1), Pp 51-56.

- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A and Poggi, V.** (2003). Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry* V63, P745-752.
- Martinez, M.V and Whitaker, J. R.** (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology* V6, P195–200.
- Matheis, G.** (1987a). Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm* V11, P5-12.
- Matheis, G.** (1987b). Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic Browning and Potato Constituents. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm* V11, P33-41.
- Mayer, A. M.** (1966). Catechol Oxidase: enzymic liberation from sugar beet chloroplast. *Phytochemistry* V5, P1297-1301.
- Mayer, A.A., Harel, E.** (1991). Phenoloxidasés and their significance in fruits and vegetables. *Food Enzymology*, Edited by P.F. Fox (Elsevier Publisher), pp.373-397
- Mayer, A.M and Harel, E.** (1979). Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry* V18, P193-215.
- Mayer, A.M.** (1987). Review article n°22. Polyphenol oxidases in plants – recent progress *Phytochemistry* V26, N° 1, P11-20.
- Mazoyer, M.** (2002). La rousse agricole, le monde agricole au XXI^{ème} siècle. Ed. Mathilde Majorel, P224.
- McCord, J. D, Kilara, A.** (1983). Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Food Sci* V 48, P1479-1483.
- McEvily, A. J., Iyengar R., Otwell W. S.** (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci.Nutr* V32, P253-273
- Miranda, M., Bonfigli, A., Zarivi, O., Ragnelli, M., Pacioni, G., Botti, D.** (1992). Truffle tyrosinase : Properties and activity. *Plant Science* V81, P175-182.
- Miranda, M., Zarivi, O., Bonfigli, A., Ragnelli, M., Rocchina, P., Aimola, P., Pacioni, G.** (1996). White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science* V120, P29-36.
- Mosher, D.B., Pathak, M.A., Fitzpatrick, T.B eds.** (1983). Update: dermatology in general medicine; McGraw Hill, New York. . P205-225.
- Mdluli, K. M.** (2005). Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). *Food Chemistry* V 92(2), P 311-323.

- Munier, P.** (1981). Origine de la culture sur palmier dattier et sa propagation en Afrique. *Fruits*, V36. n° 7-8, P437-450.
- Nacib, N., Nacib, A., Mostefa, G., Larbi, L., Adimi, L., Remmal, M., et al.** (1999). Use of date products in production of thermophilic dairy starters strain *Streptococcus thermophilus*. *Bioresource Technology* V 67, P291–295.
- Naish-Byfield, S and Riley, P.A.** (1992). Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J* V288, P 63-67.
- Nelson, R.M and Mason, H.S.** (1970). Tyrosinase (mushroom). In *Methods in Enzymology* (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.). Academic Press, New York V17, P626-632.
- Noui, Y.** (2007). Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Thèse de Magister spécialité génie alimentaire, Université de Boumerdès. Pp. 62.
- Onsa, G.H., Abdul-Hamid, A., Selamat, J., Bakar J, Manap, M.Y., Bin Saari, N.** (2011) Analysis of thermal inactivation kinetics of membrane-bound polyphenol oxidases and peroxidases from *Metroxylon sagu*. *J Food Biochem* V35, P819–832.
- O’Sullivan, W. J.** (1969). Stability constants of metal complexes. in *Data for biochemical research*. R. M.C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot, K. M. Jones. Oxford, England. pp 423-434.
- Ôba, K., Iwatsuki, N., Uritani, I., Alvarez, A.M., and Garcia, V.V.** (1992). Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes in Banana Bud. *Biosci. Biotech. Biochem* V56, N° 7. P1027-1030.
- Padron, M.P., Lozano, J.A and Gonzalez, A.G.** (1975). Properties of *o*-diphenol:O₂ oxidoreductase from *Musa cavendishii*. *Phytochemistry* V14, P1959–1963.
- Palmer, J.K.** (1963). Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology*, P508-513.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C.** (1994a). *Agaricus bisporus* Tyrosinase –I. Progress Made In Preparative Methods. *Int. J. Biochem* V26. N°2, P 215-221.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C.** (1994b). *Agaricus bisporus* Tyrosinase –II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities. *Int. J. Biochem* V26, N°2, P223-228.
- Park, Y.K., Sato, H.H., Almeida, T.D. and Moletti, R.H.** (1980). Polyphenol oxidase of Mango. *J. Food Sci* V 45, P1619-1624.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S., Bac, H.** (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *PhytotherRes* V 21, P805-816.

- Pathak, S.U and Ghole, V.S.** (1994). affinity purification and properties of polyphenoloxidase from *solanum tuberosum*. *Phytochemistry* V36, N° 5, P1165-1167.
- Patil, S.S., and Zucker, M.** (1965). Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of Biological Chemistry* V240, N°. 10, P3938-3943.
- Patnaik, P.R.** (2002). Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology* 31, P198-200.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M and Garcia-Carmona, F.** (2001). Monophenolase activity of latent *Terfezia clavervyi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum* V133, P203-209.
- Polakovic, M and Vrabel, P.** (1996). Analysis of the mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes: critical assessment of isothermal inactivation experiments. *Process Biochemistry* V 31, N°8, P787- 800.
- Powell, A., Siu, N., Inlow, J., and Flurkey, W.H.** (2007). Immobilized metal ion affinity chromatography of mushroom tyrosinase. *Scientific Journals International: Journal of Physical and Natural Sciences* V1, P1-13.
- Qiu, L., Chen, Q.H., Zhuang, J.X., Zhong, X., Zhou, J.J., Guo, Y.** (2009). Inhibitory effects of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chem* V 112, P609-613.
- Rapeanu, G., Loey, A.V., Smout, C and Hendrickx, M.** (2006). Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape. *Food Chem* V94, P253–261.
- Rapeanu, G., Mircea, B.** (2005). Thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase extracted from white grapes food technology IX, n°1.
- Reinhammar B., Malmström B. G.** (1981). "Blue" copper-containing oxidases. *in* Copper Proteins. T.G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons, P109-149.
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A and Sanjust, E.** (2002). Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* V17, N° 4, P 207-218.
- Rivas, N.D.J and Whitaker, J.R.** (1973). Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol* V52, P501-507.
- Robb, D.A.** (1984). Tyrosinase. In copper Proteins and Copper Enzymes, ed. R. Lontie. CRC Press, Boca Raton, Florida, P207-241.
- 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* V20, P 99–107.

Rodakiewicz-Nowak, J and Ito, M. (2003). Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* V78, Issue 7, P809-816

Rodríguez-López, J.N., Tudela, J., Varón, R., García-Carmona, F and García-Cánovas, F. (1992). Analysis of a Kinetic Model for Melanin Biosynthesis Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* V267, N° 6. P3801-3810.

Ros, J.R, Rodriguez-Lopez, J.N, Garcia-Canovas, F. (1994). Tyrosinase:kinetic analysis of the transient phase and the steady-state. *Biochim Biophys Acta* V1204, P33–42

Sachde, A. G., Al-Bakir, A. Y. and Abdul- Raheem, J.A.K. (1989). Polyphenol oxidase from Barhee and Zahdi dates. I. Purification *J. Food Biochem* V12, P227-240.

Samborska, K. (2007). Enhancement of thermal stability of *aspergillus oryzae* alpha-amylase using stabilizing additives. *Acta Agrophysica* V9, pp 233-244.

Sánchez-Ferrer A., Rodriguez-Lopez J. N., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F. (1995). Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* V 1247, P1-11.

Sawaya, W.N., Khatchadourian, W.A., Khalil, J.K., Safi, W.M. & Alshalhat, A. (1982). Growth and compositional changes during the various developmental stages of some Saudi Arabian date cultivars. *Journal of Food Science* V47, P1489–1492.

Sawaya, W.N., Safi, W.M., Khalil, J.K. & Mashadi, A.S. (1983). Physical measurements, proximate analyses and nutrient elements content of twenty-five date cultivars grown in Saudi Arabia at the Khalaal (mature colour) and tamr (ripe) stages. In: *Proceedings of the First Symposium on the Date Palm, Saudi Arabia*. King Faisal University. Pp.454–467

Schoenbein, C.F. (1856). On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine* V11, P137-141.

Seo, S.Y., Sharma, V.K. (2003). Mushroom tyrosinase recent prospects. *Journal of agricultural food chemistry* V 51, P2837-2853.

Shi, C., Liu, Q., Dai, Y., Xie., Y., Xu, X. (2002). “The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco.” *Acta Biochimica Polonica.*, Vol.49, 1029-1035.

Shi, C; Dai, Y; Xia, B; Xu, X; Xie, Y and Liu, Q. (2001). The Purification and Spectral Properties of Polyphenol Oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter* V19, 381a-381h.

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* V8, P567-576.

Siegbahn, P.E.M. (2004). The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem* 9, P577-590.

- Smith, D. M et Montgomery, M.W.** (1985). Improved methods for extraction of polyphenol oxidase from d'Anjou pears. *Phytochemistry V 24*, P901-904.
- Smith, J.L and Krueger, R.C.** (1962). Separation and Purification of the Phenolases of the Common Mushroom. *The Journal of Biological Chemistry V237, N° 4*. P1121-1128.
- Sojo, M.M., Nufiez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., and Séxichez-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 V46*, P4924-4930.
- 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*, P4570-4590.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M and Machonkin, T.E.** (1996). Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev V96, N°7*, P 2563-2605.
- Solomon, M., Bamossy, G., Askegaard, S. and Hogg, M. K.** (2006). Consumer Behaviour: A European Perspective, 3rd edition, Prentice Hall-Financial Times, Harlow. p 700
- Soysal, Ç.** (2008). Kinitics and thermal activation /inactivation of starking apple polyphenol oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation V 32*, P1034–1046.
- 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). P223-250.
- Strothkamp, K.G; Jolley, R.L and Mason, H.S.** (1976). Quaternary structure of mushroom tyrosinase biochemical and biophysical research communication V70, N° 2. P 519-524.
- Strubi, P., Escher, F., and Neukom, H.** (1975). Neuere arbeiten uber die technologie der apfelnektar herstellung. *Industry Obst-Gemuseverwert V60*, P349-351.
- Terefe, N. S., Yang, Y. H., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C.** (2009). High pressure and thermal inactivation kinetics cf polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry *puree*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies V11*, P52-60.
- Terwilliger, N and Decker, H.** (2000). Cops And Robbers: Putative Evolution Of Copper Oxygen-Binding Proteins. *The Journal of Experimental Biology V203*, P1777-1782.
- Thomas, P and Janave, M.T.** (1986). Isoelectric Focusing Evidence for Banana Isoenzymes with Mono and Diphenolase Activity. *Journal of Food Science V51, N° 2*, P384-387.
- Thygesen, P.W; Dry, I.B; and Robinson, S.P.** (1995). Polyphenol oxidase in Potato. *Plant Physiol V109*, P525-531.

- Trebst, A and Depka, B.** (1995). Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research* V46, P41-44.
- Turner, E.M.** (1974). Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society* V63, P541-547.
- Ünal, M. Ü.** (2007). Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa cavendishii*). *J Food chemistry* V100, P909-913.
- Ünal, M. Ü; and Şener, A.** (2006). Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *J Sci Food Agric* V86, P 2374-2379.
- Vámos-Vigyázó, L.** (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crc crit. Rev. Food sci. Nutr* V15, P49-127.
- Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H and Wichers, H.J.** (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* V45, N° 7, P1309-1323.
- Van Leeuwen, J, Wichers, H.J.** (1999). Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol Res* V103, P413–418.
- Varoquaux, P.** (1978). Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse de doctorat. Faculté des sciences de la vie et de l'environnement. Dijon. P131.
- Vaughn K. C., Lax A. R., Duke S. O.** (1988). Polyphenol oxidase : The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant* V 72, P659-665
- Vaughn, K.C and Duke, S.O.** (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol Plant* V60, P106-112.
- Vayalil, P.K.** (2002). Antioxidant and antimutagenic properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera*. L. Arecaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* V50, P610–617.
- Vieille, C and Zeikus, G. J.** (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* V65, N° 1, P1-43
- Vinson, J.A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N. & Proch, J,** 2005. Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition* V24, P44–50.
- Walker, J. R. L., et Ferrar, P. H.** (1998). Diphenol oxidase, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* V15, P457-498.

- Walker, J.R.L.** (1995). Enzymatic browning in fruits: its biochemistry and control. In: Lee, C.Y., Whitaker, J.R., Enzymatic Browning and Its Prevention. Washington: ASC Symposium Series 600. P 8–22.
- Wang, J., Jiang, W., wang, B., Zhengli, G., Liu, S., Luo, Y.** (2007). Partial purification of Polyphenol Oxidase in Mango (*Mangifera indica* L.cv. TAINGONG) Pulp. *Jornal of Food Biochememistry* V31, P45-55.
- Waliszewski, K.N., Mârquez, O., Pardio, V.T.** (2009). Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry* V 117, P196-203.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, I.V and Hendrickx M.E.** (1998). Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and bioengineering* V60, N° 3, P292-300.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, IV., Hendrickx, M .E and Tobback, P.P.** (1998). Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Lebensm.-wiss. U.-Technol* V31, P44-49.
- 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, P 2-7.
- Whitaker, J.R.** (1994). Principles of Enzymology for the Food Sciences, second ed. Marcel Dekker, New York. 271-556.
- Wichers, H. J., Gerritsen, Y. A. M., & Chapelon, C. G. J.** (1996). Tyrosinase isoforms from 392 the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry* V43, P333-337.
- Wichers, H.J., Van den Bosch, T., Gerritsen, Y.A.M., Oyevaar, J.I., Ebbelaar, M.C.E.M; Recourt, K and Kerrigan, R.W.** (1995). Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Science and Cultivation of Edible Fungi, Elliott (ed.)* © Balkema, Rotterdam. pp. 723-728.
- Wong, T.C., Luh, B.S and Whitaker, J.R.** (1971). Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes of Clingstone Peach. *Plant Physiol* V48, P19-23.
- Wuyts, N., De Waele, D., Swennen, R.** (2006). Research article Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots, *Plant Physiology and Biochemistry* V44, P308–314
- Yağar, H and Sağiroğlu, A.** (2002). Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince. *Turk J Chem* V26, P97-103.

- Yemenicioğlu, A and Cemeroğlu, 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*, V51, N° 8, P2371-2379.
- Yemenicioğlu, A.** (2002). Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol* V214, P313-319.
- Yemeniciogolu, A., Zkan, M and Cemerogolu, B.** (1997). Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation its latent form. *J. Food Sci* V 62, P508-510.
- Youssif, A. K., & Alghamdi, A. S.** (1999). Suitability of some date cultivars for jelly macking. *Journal of Food Science & Technology* V 36, P515–518.
- Youssif, A. K., Abou Ali, M., & Bou Idreese, A.** (1990). Processing, evaluation and storability of date Jelly. *Journal of Food Science and Technology* V27, P264–267.
- Youssif, A. K., Alghamdi, A. S., Hamad, A., & Mustafa, A. I.** (1996). Processing and evaluation of a date juice-milk drink. *Egyptian Journal of Dairy Science* V24, P277–288.
- Yun, K.W., Maun, A., Kim, J.H.** (2007). Effects of the aqueous extract from *Artemisia campestris* ssp *caudata* on mycorrhizal fungi colonization and growth of sand dune grasses. *Journal of plant biology* V 50(3), P358-361.
- Zarivi, O., Bonfigli, A., Cesare, P., Amicarelli, F., Pacioni, G., Miranda, M.** (2003). Truffles thio- flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters*, V220, P18-88.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M.** (1991). Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). pp 217-273.
- Zhang, X and Flurkey, W.H.** (1997). Phenoloxidas in *Portabella Mushrooms*. *Journal Of Food Science* V62, N°1, P 97-100.
- Zheng ,Xu, J., T; Meguro, S.** (2004). Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Catanea henryi*). *J Wood Sci* V50, P260-265.
- Zinkernagel, V.** (1986). Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltan (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol* V115, P 257-266.
- Ziyan, E and Pekyardimci, Ş.** (2003). Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem* V27, P217-225.

Ziyan, E., Pekyardimci, S. (2004). Purification and Characterization of Pear (*Pyrus communis*) Polyphenol oxidase. Turk J Chem V28, P547-557.

Résumé

La cinétique et la thermodynamique de l'inactivation thermique de la polyphénol oxydase (PPO) dans l'extrait aqueux des dattes d'Algérie Deglet noir (*Phoenix dactylifera* L.) ont été étudiées, utilisant le catéchol comme substrat. L'inactivation thermique de la PPO a été examinée avec plus de détails entre 60 et 75°C and fonction du temps de traitement.

L'étude cinétique montre que l'inactivation thermique de la PPO de datte suit un model cinétique biphasique, avec les valeurs du paramètre Z et d'énergie d'activation de 9.31°C et 238.35 kJ/mol pour la fraction labile et 7.37°C et 300.1 kJ/mol pour la fraction stable. Les paramètres thermodynamiques suggèrent que la PPO dans l'extrait aqueux de datte est structurellement robuste puisque le processus d'inactivation est principalement entropique.

L'inactivation thermique de l'activité PPO pourrait être très utile pour contrôler le brunissement enzymatique des dattes.

Mots clés : Deglet noir *Phoenix dactylifera* L., inactivation thermique, cinétique, thermodynamique.

Abstract

The kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation of polyphenol oxidase (PPO) in an aqueous extract from Algerian date Deglet noir (*Phoenix dactylifera* L.) was studied, using catechol as a substrate. Thermal inactivation of PPO was examined in more detail between 60 and 75°C in relation to exposure time.

Kinetic studies showed that the thermal inactivation of date PPO followed biphasic kinetics, resulting in activation energy and Z values of 238.35 kJ/mol and 9.31°C for the labile fraction and 7.37°C and 300.1 kJ/mol for the stable fraction. Calculated thermodynamic parameters suggest that the PPO in aqueous extract from date is a structurally robust yet temperature-sensitive biocatalyst whose inactivation process is mainly entropy-driven. These properties may reflect the adaptation to desert conditions where date Deglet noir grows. . The thermal inactivation of PPO activity could be very useful for enzymatic browning controlling of the dates.

Keywords: Deglet noir *Phoenix dactylifera* L., thermal inactivation, kinetics, thermodynamics

المخلص

تمت دراسة حركية والديناميك الحراري للتعطيل الحراري لمؤكسد متعدد الفينولات (PPO) في المستخلص المائي للتمور الجزائر دقلة نور (*Phoenix dactylifera* L.). درست باستخدام الكاتيكول كركيزة. الدراسة المفصلة للتعطيل الحراري لل PPO تمت بين درجتى حرارة 60 و 75 درجة مئوية بدالة زمن الدراسة.

تظهر الدراسة الحركية أن التعطيل الحراري ل PPO التمر، يتبع النموذج الحركي ثنائي الطور، مع قيم العناصر Z وطاقة التنفيع من 9.31 درجة مئوية و 238.35 كيلو جول / مول للجزء القابل للتغيير و 7.37 درجة مئوية و 300.1 كيلو جول / مول للجزء مستقر. تظهر قيم النشاط الحراري أن PPO قوي هيكليا في المستخلص المائي للتمر لأن عملية التعطيل أساسا حرارية. التعطيل الحراري لنشاط PPO يمكن أن يكون مفيد جدا للسيطرة على التشوه الإنزيمي للتمور.

الكلمات المفتاحية: دقلة نور *Phoenix dactylifera* L , التعطيل الحراري , الحركية , الديناميكية الحرارية.

