

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث 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 comparative de l'effet d'acide citrique d'inhibition sur
l'activité crésolase et catécholase de PPO du truffe (Terfezia
leonis Tul)***

Présenté par :

-Mr : SAHRAOUI Mohamed

Devant le jury :

Président :(MCA) GOUZI Hicham

Rapporteur :(MAB) BENACEUR Farouk

Examineur:(MAA) LABOUKH Mourad

Soutenu publiquement le : juin 2016.

∞ DÉDICACES ∞

Je rends grâce à DIEU le tout puissant qui m'a permis d'arriver à ce but, et de réaliser ce modeste travail que je dédie à :

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

A mes chères sœurs

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

A toute ma famille : SAHRAOUI et BOUSMAHA

(Abdelmalek, Allal, Lakhdar, Amine, Djalal, Mustapha, Toufik, Hesin)

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

A mes collègues et mes amis de la promotion.

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

A tous ceux qui m'ont assistée et encouragée.

A tous ceux qui me sont chers.

Mohamed



Remerciements

En premier lieu, nous remercierons notre dieu, qui grâce à lui nous avons pu arriver réaliser ce présent travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur Bennaxeur farouk (Enseignant à l'université Amar Telidji de Laghouat) pour ses conseils, encouragement, confiance et le temps qu'il a consacré pour diriger ce travail et plus particulièrement de sa gentillesse et ses qualités humaines. On remercie également M.gouzi.H, pour sa précieuse aide et disponibilité.

Nous remercions très sincèrement M.HADJOUJJA.M le chef de laboratoire de biologie, pour leur gentillesse et leur aide inestimable et à tous les membres de laboratoire de biologie de Laghouat.

Pour finir nous adressons nos remerciements aux membres de Jury qui ont accepté d'examiner ce travail, et à toute personne qui nous a aidé de proche ou de loin par un mot ou un geste.

Mohamed.

RESUME

Ce présent travail à pour objectif d'étudier l'inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) responsable du brunissement enzymatique des truffes (*Terfezia leonis* Tul) par l'acide citrique. L'activité crésolase de la PPO a été mesurée par spectrophotométrie à 475 nm et 410nm respectivement, à pH 5 et à 30°C, en présence de L-tyrosine et catechol comme substrat.

Le degré d'inhibition de la PPO dépend de la concentration du l'acide citrique.

La valeur d'IC₅₀ de l'acide citrique estimée à 9.46 mM d'activité crésolase et 6.52 mM d'activité catecholase montre que ce dernier inhibe efficacement la PPO des truffes. La représentation de Lineweaver-Burk indique que l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de l'activité crésolase et catecholase de la PPO avec une valeur de K_{IS} égale à 8.40 mM et . Le type d'inhibition dépend de la nature du substrat utilisé et de la source d'obtention d'enzyme. L'acide citrique est un inhibiteur réversible de la PPO des truffes. Le brunissement enzymatique des truffes peut être contrôlé par l'utilisation de l'acide citrique au cours de leur stockage ou leurs transformations.

Mots clés : Truffe, PPO, Acide citrique, Inhibition, Brunissement enzymatique, Inhibition, Inhibiteurs.

ABSTRACT

This present work aims to study the inhibition of polyphenol oxidase (PPO) responsible for enzymatic browning truffles (*Terfezia leonis* Tul) by citric acid. The cresolase PPO activity was measured spectrophotometrically at 475 nm and 410 nm respectively, at pH 5 and at 30 ° C in the presence of L-tyrosine and catechol as substrate.

The degree of PPO inhibition depends on the concentration of the citric acid. The IC₅₀ value of the estimated citric acid at 9.46 mM and 6.52 mM cresolase business activity catecholase shows that it effectively inhibits PPO truffles. The Lineweaver-Burk representation indicates that the citric acid is a noncompetitive inhibitor of the activity and catecholase cresolase OPP with K_{IS} value equal to 8.40 mM. The type of inhibition depends on the nature of the substrate used and the source of enzyme is obtained. Citric acid is a reversible inhibitor of PPO truffles. Enzymatic browning truffles can be controlled by the use of citric acid during their storage or their transformations.

Keywords: Nose, PPO, citric acid, inhibition, enzymatic browning, inhibition, inhibitors.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة آلية تثبيط البوليفينول أكسيداز المسؤولة على الاسمرار الإنزيمي للكمامة (*Terfezia leonis* Tul) بواسطة حمض الستريك . وبواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي تم قياس تثبيط نشاط الكريزولاز والكاتيكولاز بطول موجة يساوي 475 نانومترو 410 نانومتر على التوالي و درجة حموضة 5 و 30 °م درجة مئوية وهذا باستخدام الل- تيروسين والكاتيكول كدعامة. تتأثر عملية تثبيط البوليفينول أكسيداز بتركيز حمض الستريك. حيث أن قيمة نصف التركيز التثبيطي (IC₅₀) لحمض الستريك تساوي 9.46 ميليمول للنشاط الكريزولازي و 6.52 نانومتر للنشاط الكاتيكولاز والتي تبين أن هذا الأخير يثبط بفعالية البوليفينول أكسيداز للكمامة. ولقد أظهرت بيانات Lineweaver-Burk أن حمض الستريك هو مثبط غير تنافسي لنشاط الكريزولاز والكاتيكولاز للبوليفينول أكسيداز مع ثابت التفكك (K_{IS}) بقيمة 8.40 ميليمول، يعتمد نوع التثبيط على طبيعة الدعامة المستعملة ومصدر الانزيم. كما أن حمض الستريك يثبط نشاط البوليفينول أكسيداز للكمامة بألية رجعية. مما يمكننا من التحكم في الاسمرار الإنزيمي للكمامة باستعمال حمض الستريك أثناء تخزينها أو تحويلها. **الكلمات الرئيسية :** الكمامة، البوليفينول أكسيداز ، حمض الستريك، تثبيط ، الاسمرار الانزيمية ، تثبيط ، مثبط

Listes des figures

Figure N°:	N° de Page
Figure 1 : Les trois domaines structuraux (I, vert ; II, rouge; et III, bleu) de l'hémocyanine d'arthropode. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu claire (Decker et Tuczek, 2000).....	6
Figure 2: 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 <i>al.</i> , 1999).....	8
Figure 3: 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) (Decker et Jaenicke, 2004).....	8
Figure 4: L'état <i>Oxy</i> du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> . 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).....	8
Figure 5: Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO(<i>Met</i> , <i>Deoxy</i> , et <i>Oxy</i> PPO) d'après Van Gelder et <i>al</i> (1997).....	11
Figure 6: Structure de composés phénoliques substrats des polyphénol oxydases (Cheriot, 2007).....	14
Figure 7 : <i>Terfezia leonis</i> Tul d'Algérie (Wilaya de Tyaret).....	26
Figure 8: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine par l'extrait brut de la PPOde <i>Terfezia leonis</i> (L-tyrosine à 1 mM, SDS à 10 mM, volume de l'extrait enzymatique 30 µl, tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.0, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1.0 ml).....	27
Figure 9. Effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de L-tyrosine et catechol par la PPOde truffe (<i>Terfezia leonis</i> Tul.). Les conditions d'essai : 30°C, 1.0 ml de milieu réactionnel contient 0.05 M de tampon acétate de sodium (pH 5.0), 1 mM de L-tyrosine et 1mM catechol, et 50 µl de l'extrait enzymatique, 10 mM de SDS. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais.....	30
Figure 10. Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité crésolase et catécholase de la PPOde truffe (<i>Terfezia leonis</i> Tul.) par l'acide citrique. Concentrations d'acide citrique sont : 0 (●), 5 (○), et 10 (▼) mM. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais.....	33

Liste des tableaux

Tableau N° :	N° de Page
Tableau 1: Inhibiteurs du brunissement enzymatique (McEvily et <i>al.</i> , 1992).....	21
Tableau 2. Les valeurs d'IC ₅₀ de l'effet de l'acide citrique sur l'activité PPOde plusieurs sources végétales.....	31
Tableau 3. Les valeurs des paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité crésolase et catecholase de la PPOde <i>Terfezia leonis</i> Tul. Par l'acide citrique.....	32
Tableau 4. Les types d'inhibition des PPOs de quelques sources végétales par l'acide citrique.....	33

LISTE DES ABRÉVIATIONS

PPO :	Polyphénol oxydase
PVPP :	Polyvinyl polypyrrolidone
E :	Concentration d'enzyme
S :	Concentration de substrat
I :	Concentration d'inhibiteur
ES :	Complexe enzyme-substrat
EI :	Complexe enzyme-inhibiteur
ESI :	Complexe enzyme-substrat-inhibiteur
Abs :	Absorbance optique à une longueur d'onde $\lambda = 475$ nm
IC₅₀ :	Concentration d'inhibiteur pour une diminution de l'activité enzymatique de 50%
°C :	Degré Celsius
K_m :	Constante de Michaelis
K_I :	Constante de dissociation du complexe EI
K_{IS} :	Constante de dissociation du complexe ESI
V₀ :	Vitesse initiale
V_{max} :	Vitesse maximale
R² :	Coefficient de corrélation
PM :	Poids moléculaire
AC :	Acide citrique

Sommaire

	N° de page
<i>Introduction</i>	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	3
1.1 Le brunissement enzymatique.....	3
1.1.1 Caractères généraux des polyphénols oxydases.....	3
1.1.1.1 Historique.....	3
1.1.1.2 Définition.....	4
1.1.1.3 Nomenclature.....	5
1.1.1.4 Caractéristiques structurales.....	5
1.1.1.5 Mécanismes d'activation.....	9
1.1.1.6 Le Mécanisme réactionnel.....	10
1.1.1.7 Caractéristiques fonctionnelles	11
<i>Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)</i>	11
<i>Activité diphenoloxydase (EC 1.10.3.1)</i>	12
<i>Activité laccase (E.C. 1.10.3.2)</i>	12
1.1.1.8 Spécificité des PPOs et substrats phénoliques.....	12
1.1.1.9 Rôle physiologique et applications des PPOs.....	15
1.2 Prévention du brunissement enzymatique.....	17
1.2.1 Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique.....	17
1.2.2 Inhibition du brunissement par des extraits naturels	19
1.2.3 Inhibition du brunissement par des préparations enzymatiques	20
1.2.4 Inhibiteurs chimiques de contrôle du brunissement enzymatique.....	20
1.2.4.1 Inhibiteurs agissant sur les substrats des PPOs.....	21
1.2.4.2 Traitements chimiques agissant sur l'enzyme.....	22
1.2.4.3 Composés chélateurs d'ions métalliques.....	22
1.2.4.4 Les agents acidifiants	23
1.2.4.5 Inhibiteurs agissant sur le site de fixation du substrat phénolique.....	23
1.2.4.6 Inhibiteurs agissant sur des sites autres que le site de fixation du substrat phénolique.....	24
<i>Matériels et méthodes</i>	26
2.1 Matériels.....	26
2.1.1 Matériel biologique.....	26

2.1.2 Produits chimiques.....	26
2.2 Méthodes.....	26
2.2.1 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase.....	26
2.2.2 Mesure de l'activité PPO.....	27
2.2.3 Détermination des valeurs d'IC ₅₀	28
2.2.4 Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide citrique.....	28
2.2.5 Analyse des résultats expérimentaux.....	29
<i>Résultats et discussion</i>	30
3.1 Détermination de la valeur d'IC ₅₀ de l'effet de l'acide citrique sur l'activité crésolase de la PPO de truffe (<i>Terfezia leonis</i> Tul).....	30
3.2 Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité crésolase de la PPO de truffe par l'acide citrique	31
<i>Conclusion</i>	35
<i>Références bibliographiques</i>	36

Introduction

Les champignons du désert, appelés localement ‘‘Eterfès ou Al-Kamaa,’’ constituent la partie majeure des champignons consommés par les habitants du sud Algérien.

Ces champignons sont une source alimentaire très appréciée pour leur propriétés médicinales et organoleptiques ainsi que pour leur valeur nutritive élevée suite à leur richesse en protéines (20-27%), en fibres (7-13%), en lipides (3-7.5%), en acide ascorbique (2-5%), en sels minéraux et en polyphénols (Janakat et al., 2004 ; Gouzi et al., 2013).

Par rapport à la plus part des fruits et légumes, les champignons ont une durée de conservation très courte. Ils perdent leur valeur commerciale et nutritionnelle en quelques jours en raison de la sénescence, la perte d’eau, l’attaque microbienne et le brunissement (Whitaker et Lee, 1995 ; Jolivet et al, 1998).

Le brunissement est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l’odeur et du goût désagréables du champignon (Varoquaux, 1978 ; Martinez et Whitaker, 1995). La prévention de cette réaction constitue l’un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires (Matheis, 1987). Le brunissement résulte de l’oxydation des phénols l -tyrosine, dopamine, γ -glutaminyl-4-hydroxybenzène et γ -glutaminyl-3,4-dihydroxybenzène- catalysée principalement par le polyphénol oxydase (polyphénol oxydase (PPO), monophénol, o-diphénol: oxygène oxydoréductase; EC 1. 14. 18. 1).

La PPO est une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (Martinez et Whitaker, 1995 ; Mayer et Harel, 1979 ; Vámos-Vigyázó, 1981). En présence de l’oxygène moléculaire, cette enzyme présente deux activités différentes. Capable d’hydroxyler les monophénols en o-diphénols, connue sous le nom d’activité crésolasique ou monophénolasique. Ces o-diphénols, sont à leur tour oxydés pour donner des o-quinones, connue sous l’appellation d’activité catécholasiq ou o-diphénoloxydasique. Ces derniers se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir appelé mélanine (Varoquaux, 1978).

En raison de sa participation majeure aux effets indésirables du brunissement enzymatique, la PPO est devenue l’objet de toutes les attentions des chercheurs

traitant de l'agro-alimentaire. L'inactivation de la PPO par quelques inhibiteurs est une méthode de contrôle la plus efficace pour la prévention du brunissement enzymatique des truffes (McEvily et al. 1992; Queiroz et al, 2008).

De nombreux chercheurs ont étudié l'inhibition des PPO obtenues à partir de diverses sources, mais aucune information n'est disponible sur les propriétés d'inhibition de la PPO de *Terfezia leonis Tul*. Pour cela, le but principal de cette étude est d'évaluer, d'une part, l'effet inhibiteur de l'acide citrique sur l'activité crésolase et catecholase de la PPO de *Terfezia leonis Tul* en utilisant le L-tyrosine et catechol comme substrat phénolique. D'autre part, le mécanisme d'inhibition de l'enzyme par cet agent chimique de synthèse été déterminé.

Notre travail sera consacré donc à l'étude du mécanisme d'inhibition de l'activité crésolase et catécholase de la PPO de truffe *Terfezia leonis Tul* par l'acide citrique.

La présentation de ce mémoire a été organisée en différents chapitres décrivant les étapes successives de cette étude.

La première partie concerne un rappel bibliographique, aussi précis que possible, sur la PPO, ainsi que, sur le contrôle du brunissement enzymatique. Dans la deuxième partie, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales. La troisième partie est consacrée à une discussion des résultats expérimentaux obtenus. Elle est dédiée à la présentation des résultats expérimentaux de l'inhibition de l'activité crésolase et catécholase de la PPO par l'acide citrique. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO, sont regroupées dans la dernière partie.

Synthèse bibliographique

1.1 Le brunissement enzymatique

Parmi les caractéristiques organoleptiques des aliments, la couleur est l'une des propriétés principales pour évaluer la qualité des aliments par les consommateurs. Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte le plus la couleur des fruits et des légumes. Mais sous ce terme se regroupent également les phénomènes concernant l'apparition de colorations brunes consécutives à des altérations des fruits ou légumes, à la suite de traitements mécaniques (récolte, manutention lors du transport et du stockage, pelage, découpe) ou technologiques (conservation au froid, congélation-décongélation, irradiation), ou encore naturels (infection fongique) (Cheriot, 2007).

Le brunissement enzymatique est dû à une oxydation catalysée par les polyphénols oxydases (PPOs) des composés phénoliques endogènes par l'oxygène moléculaire où les premiers produits de réaction sont les quinones. Les composés phénoliques sont des substances naturelles qui contribuent aux propriétés sensorielles (couleur, goût, arôme et texture) associées à la qualité des fruits. Structurellement, ils contiennent un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles et un certain nombre d'autres substituants (Queiroz et *al*, 2008). Les peroxydases sont également capables de catalyser la réaction, mais à un degré moindre. Les quinones se condensent ensuite rapidement pour former des polymères bruns ou noirs à haute masse moléculaire. Ces phénomènes n'apparaissent cependant qu'après une décompartmentation cellulaire, permettant alors la mise en contact du substrat phénolique (vacuolaire) et du système enzymatique (lié aux membranes plastidiales) (de Rigal, 2001).

1.1.1 Caractères généraux des polyphénols oxydases

1.1.1.1 Historique

La PPO 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 PPO de pomme de terre par Kubowitz (1938). C'était la première enzyme purifiée

par chromatographie d'affinité (Lerch, 1981). La PPO 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). Depuis sa découverte, la PPO 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 PPO 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).

1.1.1.2 Définition

La PPO est une métalloprotéine contenant deux atomes de cuivre. En présence de l'oxygène moléculaire, elle catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones, qui se polymérisent pour former la mélanine, source de la pigmentation de la peau et le brunissement des fruits et légumes (Zawistowski et *al*, 1991 ; Whitaker, 1995).

Cette enzyme est largement diffusée phylogénétiquement des bactéries aux mammifères et est impliquée dans diverses autres fonctions (Sendovski et *al*, 2011). La structure du site actif de la PPO, dans lequel le cuivre est lié par six ou sept résidus histidine et un seul résidu cystéine est hautement conservée à travers les espèces (Mayer, 2006).

1.1.1.3 Nomenclature

Plusieurs noms ont été associés à la PPO et l'union Internationale de biochimie avait donné aux enzymes des noms systématiques fondés sur le type de réaction qu'elles catalysent et sur la spécificité de leurs substrats.

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

Cette définition ne tenait compte que de l'activité catécholasique ou o-diphénoloxydasique et excluait donc l'activité crésolasique du complexe. Le nom PPO, très souvent donné à l'enzyme, était, par conséquent, en contradiction avec la nomenclature officielle. C'est pourquoi en 1972, cette nomenclature a été modifiée et le complexe nommé monophénol, dihydroxyphénylalanine : oxygène, oxydo-réductase (E.C.1.14.18.1.) (Varoquaux, 1978).

L'enzyme posséderait donc deux types de substrats correspondant à ses deux activités. Et elle est connue sous divers noms (polyphénol oxydase, phénolase, catéchol oxydase, catecholase, monophénol oxydase, ortho-diphénol oxydase, et ortho-phénolase) (Mayer et Harel, 1979).

1.1.1.4 Caractéristiques structurales

La structure cristallographique des PPOs n'a pas été élucidée. Cependant, on peut supposer que les PPOs, les hémocyanines et les catécholoxydases possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker, 2006). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (Della Longa et *al.*, 1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmel wright et *a.*, 1980), et des similitudes de séquence primaires (Van Gelder et *al.*, 1997).

Les masses moléculaires apparentes des PPOs, déterminées généralement par des techniques de chromatographie d'exclusion ou d'électrophorèse dénaturante, sont comprises entre 12 et 400 kDa (Zawistowski et *al.*, 1991). Ces différences de taille s'expliquent notamment par l'existence de formes polymériques de l'enzyme, pouvant aller du monomère, comme ceci est le cas pour la PPO des graines de tournesol

(Raymond et *al*, 1993), à la forme tétramérique comme ceci est le cas pour la PPO de champignon (Strothkamp et *al*, 1976). Les auteurs s'accordent pour donner une masse moléculaire apparente voisine de 40 à 45 kDa pour les formes monomériques (de Rigal, 2001).

La mise en œuvre de techniques de biologie moléculaire associées à des analyses cristallographiques a permis de préciser les informations sur la structure des PPOs. La structure primaire de l'enzyme peut être déduite de la séquence de l'ARN messenger codant pour l'enzyme. Les chercheurs ont observé que le nombre d'acides aminés des formes monomériques des PPOs matures variait de 360 (haricot) à 496 (abricot), 569 (champignon de paris) et 593 résidus (pomme). Les domaines structuraux des PPOs des végétaux supérieurs et fongiques sont schématisés sur la Figure (1).

Les séquences présentent trois domaines chez les végétaux supérieurs (deux chez les champignons) ayant un degré d'homologie plus ou moins élevé entre espèces (Van Gelder et *al*, 1997).

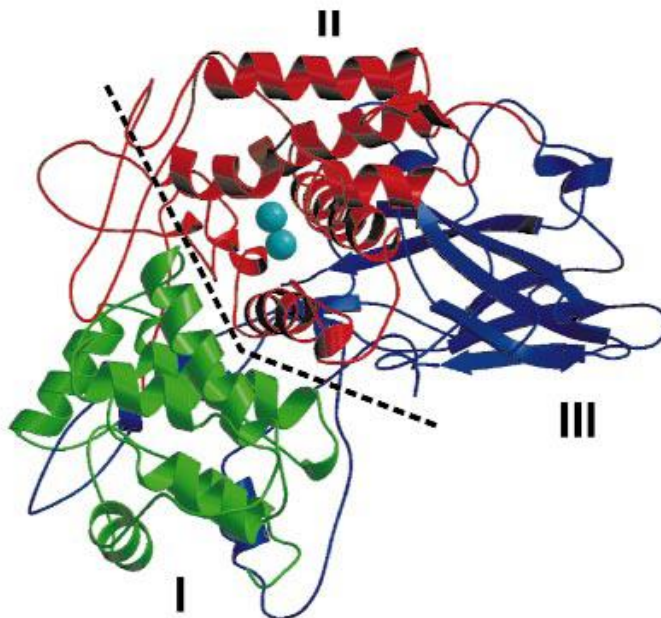


Figure 1 : Les trois domaines structuraux (I, vert ; II, rouge; et III, bleu) de l'hémocyanine d'arthropode. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu claire (Decker et Tuczec, 2000).

Le premier domaine se trouve dans la région N-terminale des PPOs de végétaux supérieurs ; il correspond à un peptide de transit (Chevalier et *al.*, 1999). Ce peptide, de 87 à 247 acides aminés selon les espèces, permettrait de diriger la PPO immature vers les thylacoïdes. Généralement ce domaine contient trois régions. La première est constituée d'une séquence riche en groupements hydroxyles qui interviendrait directement dans les mécanismes liés au transit. Suit une région riche en résidus cystéine, dont le rôle est encore indéterminé. La troisième région, riche en résidus portant des chaînes latérales hydrophobes permet de diriger la PPO immature vers le lumen des thylacoïdes (de Rigal, 2001).

Le domaine central des PPOs est séparé du peptide de transit par une séquence de clivage reconnue par certaines protéases végétales. Ce domaine contient les deux sites de fixation des atomes de cuivre, et correspond aux PPOs matures. Les deux séquences de fixation du cuivre sont très conservées entre les PPOs des végétaux supérieurs et les PPOs mais aussi chez toutes les espèces procaryotes et eucaryotes étudiées (Decker et Terwilliger, 2000).

Le domaine C-terminal est séparé du domaine central par un site de clivage sensible à la protéolyse. Ce domaine n'est présent que dans les formes latentes de la PPO d'haricot, de raisin, et de PPO de champignons (Van Gelder et *al.*, 1997).

Selon Eicken et *al.*, (1999) les PPOs sont composées de deux sous-domaines portant chacun un atome de cuivre et proviendraient de la fusion de deux protéines ancestrales correspondant chacune à un sous-domaine Figure (2).

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 catécholoxydase de patate douce (*Ipomeabatatas*) (Klabunde et *al.*, 1998). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des o-diphénols et permet ainsi un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox figure (3) et (4).

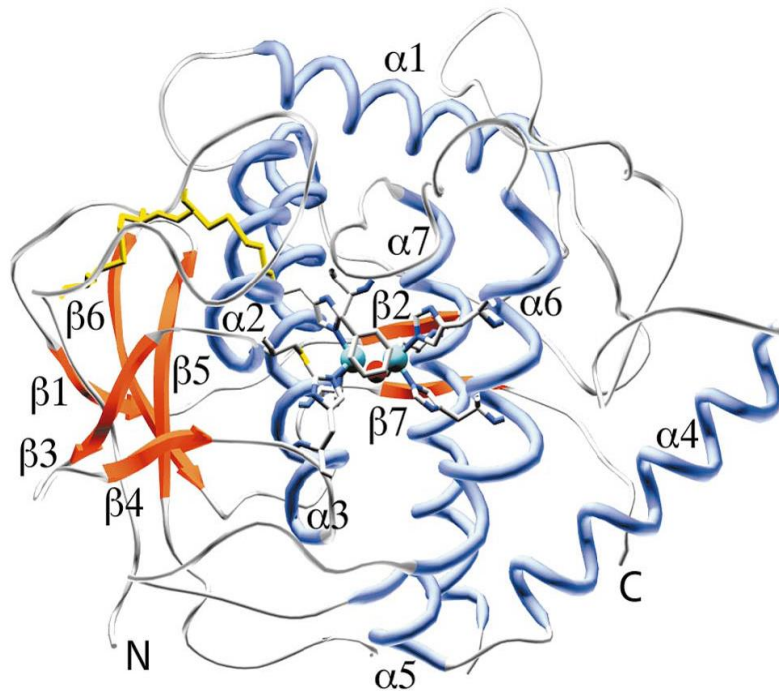


Figure 2: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et *al*, 1999).

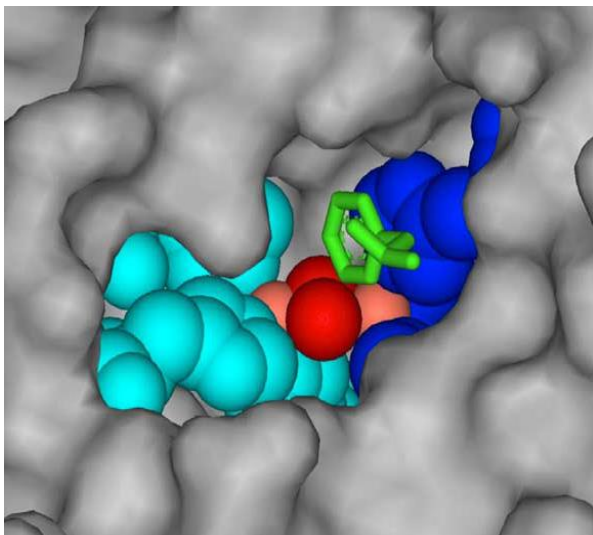


Figure 3: Vue à l'intérieur du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (Decker et Jaenicke, 2004).

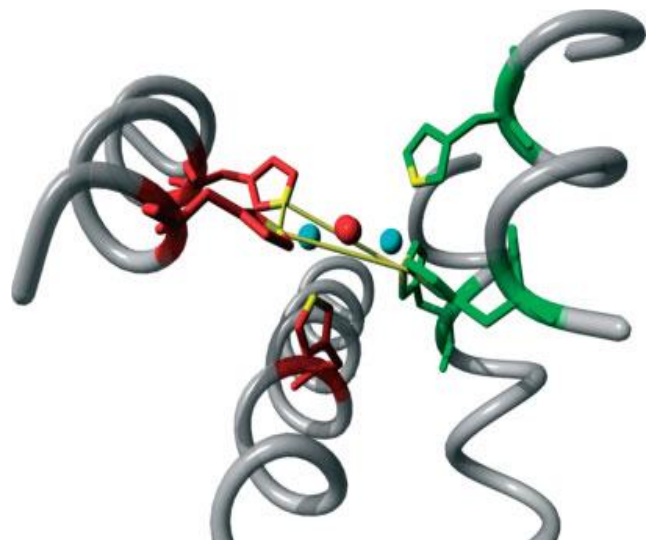


Figure 4: L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Claus et Decker, 2006).

1.1.1.5 Mécanismes d'activation

Il y a deux types de mécanismes d'activation des PPOs totalement indépendants l'un de l'autre ; à savoir, une activation par protéolyse partielle, d'une part, et une activation en présence de détergents, d'autre part. Le premier mécanisme permet de passer d'une forme dite immature à une forme mature de la PPO alors que le second mécanisme permet de passer d'une forme inactive à une forme active (Flurkey, 1986 ; Fraignier *et al.*, 1995 ; Van Gelder *et al.*, 1997 ; Espin et Wichers, 1999).

L'influence de la protéolyse sur l'activité polyphénoloxydase a été mise en évidence *in vitro*. En effet, lors de l'ajout d'inhibiteur de protéases au cours de l'extraction de la PPO végétales, le nombre d'isoformes observées par électrophorèse chute sans altérer l'activité PPO totale (Van Gelder *et al.*, 1997 ; Nozue *et al.*, 1999). Dans tous les cas, la protéolyse s'accompagne de l'apparition de formes actives de la PPO ayant une masse moléculaire apparente inférieure à celles des formes natives. Dans certains cas, les formes protéolysées de PPO sont actives sur une gamme de pH plus large que les PPOs natives (Marques *et al.*, 1995b).

Et d'autre part, il existe au moins un mécanisme permettant d'activer les formes dites latentes de la PPO. Il a été montré *in-vitro* que l'ajout de détergents anioniques tel que dodécyl sulfate de sodium (SDS) entraînait une forte augmentation de l'activité de certains extraits polyphénoloxydasiques, ce qui suggérait la présence de formes latentes de l'enzyme dans ces extraits (Gauillard et Richard-Forget, 1997). Or les formes latentes ne peuvent être détectées que lorsque les PPOs sont extraites à l'aide de détergents doux tel que le triton X-114 (Goldbeck et Cammarata, 1981). L'activation des PPOs par le SDS peut paraître paradoxale lorsque l'on sait que ce détergent dénature généralement les protéines en modifiant leur structure tertiaire. D'après Marques *et al.* (1995b) la résistance des PPOs est vraisemblablement due aux deux ponts disulfures présents dans la région N-terminale de l'enzyme mature. Selon Moore et Flurkey (1990), les interactions entre la PPO et le SDS modifieraient la conformation tridimensionnelle de l'enzyme et rendrait ainsi le site actif accessible aux substrats. Dans le cas de la PPO de champignon, près de 99 % de l'enzyme mature serait sous forme latente (Van Gelder *et al.*, 1997). Et selon Choucha et Zarwal (2009) la PPO de *Terfezia leonis* est une enzyme presque complètement latente

puisque l'addition du SDS dans la solution d'extraction s'accompagne d'une augmentation de l'activité enzymatique due à l'activation de l'enzyme.

1.1.1.6 Le Mécanisme réactionnel

Les mécanismes réactionnels des PPOs sont d'origines fongiques. D'après Sanchez-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 (Figure 5). La forme *Met* représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphenols en quinones. Le site actif passe alors sous forme *Désoxy* dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite. Ils deviennent alors capables de fixer l'oxygène moléculaire pour passer sous la forme *Oxy*. Cette dernière peut prendre en charge aussi bien les mono que les o-diphenols. Le passage d'une forme à l'autre entraîne des modifications de la géométrie spatiale des six atomes d'azote des résidus histidine et le rapprochement des deux atomes de cuivre l'un par rapport à l'autre (forme *Désoxy*) figure (5). Ces phénomènes sont liés à de légères modifications de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme au cours de la catalyse (Della Longa et *al.*, 1996 ; Eicken et *al.*, 1999).

En ce qui concerne l'activité monophénolasique, l'étape préliminaire à la formation des quinones consiste en l'hydroxylation des monophénols (Vanneste et Zuberbuhler, 1974). Or la forme *Oxy* est quasi-absente dans les extraits enzymatiques et l'ajout d'un faible pourcentage d'o-diphenols dans le milieu réactionnel est nécessaire pour modifier l'état fonctionnel des PPOs et initier la réaction d'hydroxylation (Duckworth et Coleman, 1970 ; Sanchez-Ferrer et *al.*, 1995). Pour accélérer cette étape généralement lente, l'ajout d'agent réducteur tel que l'acide ascorbique (Lavollay et *al.*, 1975 ; Ros et *al.*, 1993) et le dithiothréitol (Naish-Byfield et *al.*, 1994) est préconisé.

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 PPOs pour les mono-phénols (Eicken et *al.*, 1999). Dans tous les cas l'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (Janovitz-Klapp et *al.*, 1989).

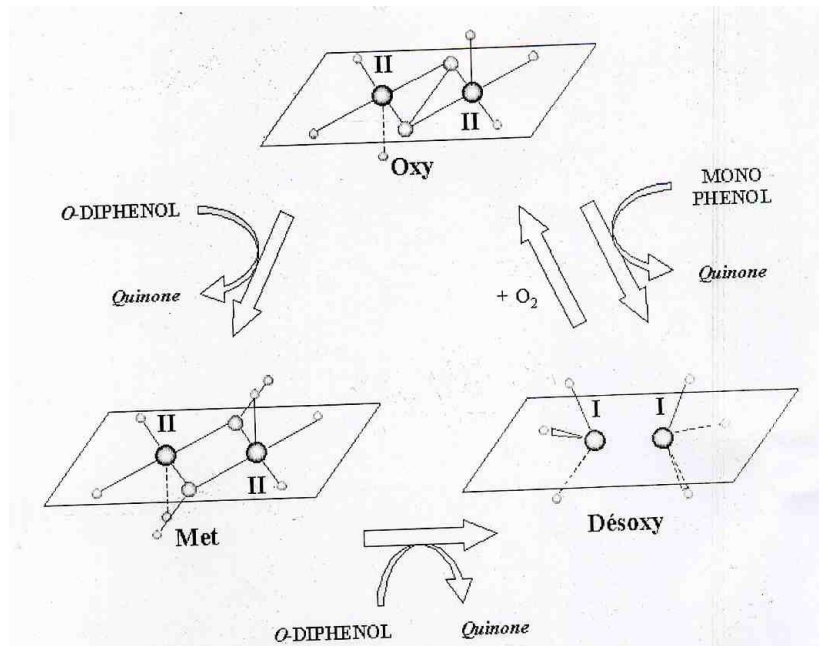


Figure 5: Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO (*Met*, *Deoxy*, et *Oxy* PPO) d’après Van Gelder et *al* (1997).

1.1.1.7 Caractéristiques fonctionnelles

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

- hydroxylation en position ortho d’un substrat monophénolique (activité monophénoloxydase, crésolase ou PPO) ;
- oxydation d’un diphéhol en benzoquinone (activité diphéholoxydase, également appelée laccase, et spécifiquement catécholase lorsqu’il s’agit o-diphéhol).

Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1).

Les monophénoloxydases ou monooxygénases catalysent l’hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. Cette enzyme est également appelée PPO 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 (Cheriot, 2007). Elle est

cependant connue depuis longtemps dans les champignons (Varoquaux, 1978), et un peu plus récemment dans la pomme (Nicolas *et al.*, 1994).

Activité diphénoloxydase (EC 1.10.3.1).

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase. Cette dernière a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanoidines (Cheriot, 2007).

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'une radicale 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). Les *o*- des *p*- diphénoloxydases sont distinguées 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 (Cheriot, 2007).

1.1.1.8 Spécificité des PPOs et substrats phénoliques

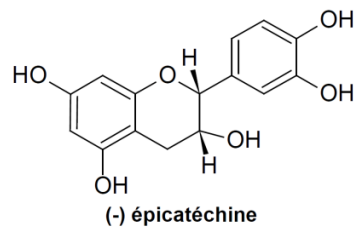
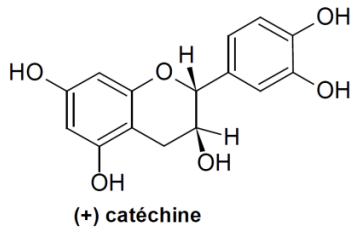
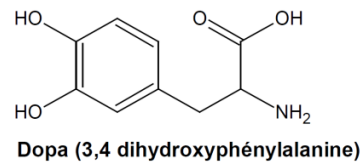
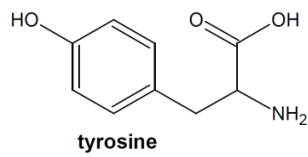
Pour la spécificité de l'enzyme est évaluée selon deux paramètres cinétiques : la valeur de k_m qui rend compte de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et la vitesse maximale de catalyse V_{max} . La spécificité dépend de la structure de l'enzyme et des substrats, mais également des conditions expérimentales (Van Gelder *et al.*, 1997).

Les substrats phénoliques qui participent à la couleur, l'astringence, l'amertume et au goût des fruits et légumes, comportent un noyau aromatique porteur d'un ou plusieurs groupe(s) hydroxyle. La composition en polyphénols dans les végétaux varie selon l'espèce, le cultivar, la maturité, les conditions de culture et de stockage.

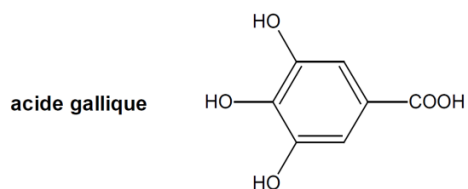
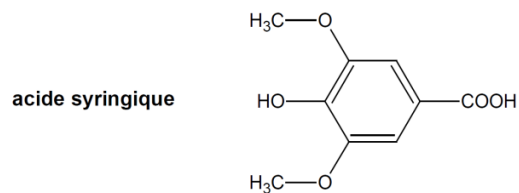
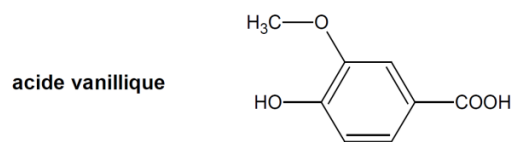
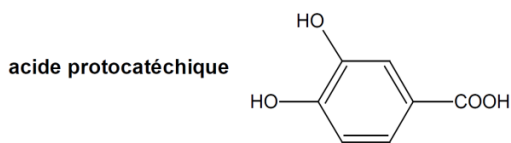
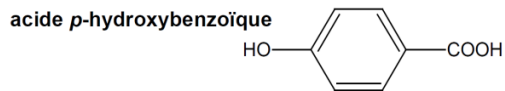
La Figure (6) présente les structures des composés phénoliques substrats les plus courants des PPOs. Les dérivés de l'acide caféique, tels que l'acide chlorogénique, sont souvent cités comme étant les composés *o*-diphénols majoritaires dans les végétaux où ils sont présents sous forme glycosylés. Il faut alors noter que les monophénols tels que l'acide sinapique ou l'acide syringique forment alors des semi-quinones (Cheriot, 2007).

La spécificité de substrat des PPOs varie selon la source végétale de la tyrosinase. Les composés phénoliques endogènes sont responsables des réactions de brunissement enzymatique des fruits et légumes lors de leurs transformations (Cheriot, 2007).

Certains composés phénoliques sont des substrats de la PPO, d'autres peuvent être des inhibiteurs de cette même enzyme. Différents acides cinnamiques sont des analogues de substrats et ainsi de bons inhibiteurs compétitifs de la PPO de pomme (Walker et Ferrar, 1995).



Série des acides benzoïques



Série des acides cinnamiques

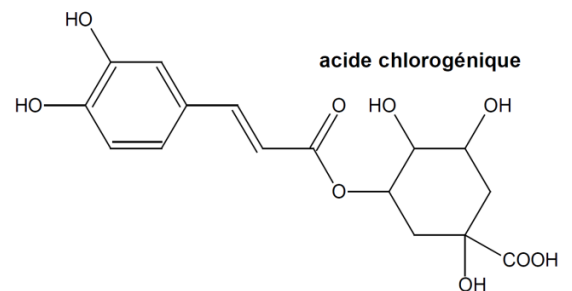
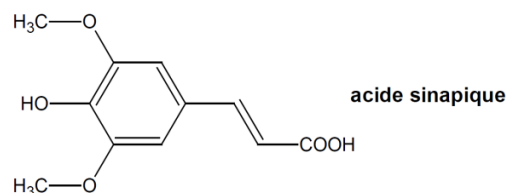
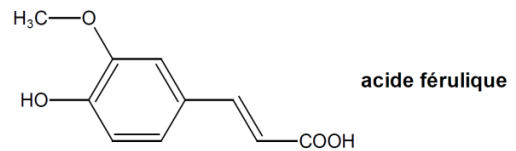
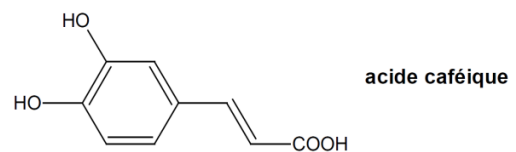
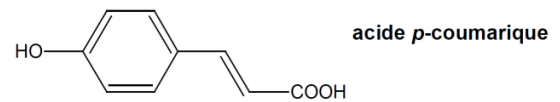


Figure 6: Structure de composés phénoliques substrats des polyphénols oxydases (Cheriot, 2007).

1.1.1.9 Rôle physiologique et applications des PPOs

Le rôle physiologique des PPOs demeure en grande partie obscur et donc très controversé (Vaughn *et al.*, 1988). L'absence de la PPO ne semble pas avoir d'effets sur la viabilité de certaines espèces végétales mutantes comme une lignée de pommes de terre transgénique (Bachem *et al.*, 1994). La fonction la mieux documentée de l'enzyme est limitée à la formation des mélanines.

Toutefois, de nombreuses hypothèses concernant le rôle physiologique des PPOs sont proposées. Premièrement, son implication dans la résistance aux infections bactériennes, fongiques et virales paraît largement admise (Martinez et Whitaker, 1995). En effet, une augmentation de l'activité de la PPO est généralement observée suite à un stress (Gentile *et al.*, 1988), hausse vraisemblablement due à une maturation de formes latentes (Espin *et al.*, 1999b) par les protéases des pathogènes plutôt qu'à une synthèse *de novo* (Chevalier *et al.*, 1999). L'initiation des réactions d'oxydation enzymatique des phénols conduirait à la mise en œuvre de mécanismes de défense physiques et chimiques du végétal (de Rigal, 2001). Pierpoint (1966) affirme que certains composés intermédiaires des réactions secondaires seraient capables d'inactiver ou de fixer certains virus et de limiter leur pouvoir infectieux. Zinkernagel (1986) ajoute que les quinones produites ont un effet bactéricide et fongicide. Kuwabara et Katoh (1999) supposent un rôle de la PPO dans la facilitation de la mort cellulaire, après avoir mis en évidence une activité protéolytique catalysée par la PPO d'épinard.

La localisation spécifique des formes actives des PPOs 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 structurellement associée au photosystème II dans la plupart des végétaux supérieurs.

Les pigments foncés produits par les PPOs jouent un rôle de protection des cellules bactériennes et les spores contre les rayons UV. Ils confèrent également la protection contre les oxydants, la chaleur, l'hydrolyse enzymatique, composés antimicrobiens et la phagocytose (Queiroz *et al.*, 2008).

Au niveau du sol, les PPOs extracellulaires sont probablement impliquées dans la polymérisation et la détoxification de composés phénoliques des plantes et la formation des matières humiques. Les monophénols et o-diphénols ont longtemps été considérés comme étant les substrats exclusifs de la PPO. Toutefois, les amines aromatiques et o-aminophénols ont également été reconnus comme substrats de la PPO qui subissent des réactions d'ortho-hydroxylation et oxydation similaires (Lerch, 1995).

Les activités monophenol hydroxylase et diphenoloxydase de la PPO sont la base de nombreuses applications industrielles. Dans les technologies de l'environnement pour la détoxification des eaux usées et sols contaminés contenant les phénols (Claus et Decker, 2006). Dans les industries pharmaceutiques pour la production des o-diphénols (par exemple, la L-dopa, dopamine pour le traitement de la maladie de Parkinson), dans les produits industriels cosmétiques ou alimentaires, pour des réactions de brunissement oxydatif (Mayer et Harel, 1978), comme échangeur de cations, et support pour les médicaments, les antioxydants, les agents antiviraux et immunogènes (Nosanchuk et Casadevall, 2003). Par ailleurs, la PPO ayant un potentiel de biocapteurs elle est à l'origine de nombreuses applications, principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (Min et Yoo, 2009 ; Njagi et al, 2010) et le suivi des phénols (Claus et Decker, 2006).

En outre, les inhibiteurs de la PPO sont devenus des constituants importants des produits cosmétiques luttant contre l'hyperpigmentation (Maeda et Fukuda, 1991).

1.2 Prévention du brunissement enzymatique

Si le brunissement enzymatique est recherché au cours des transformations technologiques de certains produits tels que le thé, le cidre, les raisins secs, les pruneaux ou les dattes, il pose également un problème important pour les fruits et les légumes vendus frais (Taylor et *al.*, 1986). Le brunissement enzymatique ne se produit que lorsque les tissus sont endommagés par la coupe, le tranchage ou le broyage : les vacuoles contenant les substrats phénoliques sont rompues et ces derniers sont ainsi mis en contact avec la PPO cytoplasmique. Le taux de brunissement enzymatique dépend de la quantité de la PPO active dans les tissus, de la teneur en polyphénols, du pH, de la température et de la disponibilité en oxygène.

Beaucoup d'études ont eu pour but d'inhiber le brunissement enzymatique et plusieurs techniques essayant d'éliminer les composés responsables de ce brunissement (oxygène, enzyme, cuivre, substrat) (Nicolas et Billaud, 2006).

Dans cette partie, nous réaliserons un inventaire des différentes méthodes citées dans la littérature avant de détailler plus particulièrement les méthodes faisant appel à l'emploi des inhibiteurs chimiques.

1.2.1 Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique

Les méthodes physiques conventionnelles visent principalement soit à diminuer la teneur des aliments en oxygène moléculaire (premier substrat des PPOs) grâce à la conservation sous atmosphère contrôlée, soit à inactiver les PPOs par la chaleur ou le froid (Walker et Ferrar, 1995).

Les traitements thermiques sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique. Cependant, cette méthode ne peut être utilisée dans les procédés de transformation des fruits et légumes frais (Cheriot, 2007). Puisque bien que très efficace, le blanchiment nuit à la qualité des produits en provoquant des pertes en vitamines, arômes, couleurs, texture, sucres et autres composés hydrosolubles (Vamos-Vigyazo, 1981).

Des températures inférieures à -18 °C sont aussi utilisées pour la conservation de longue durée des aliments. Les mécanismes d'inactivation des enzymes par la congélation peuvent être expliqués par différentes hypothèses : augmentation de la concentration en inhibiteurs du fait de la diminution de la quantité d'eau disponible à l'état liquide (Tappel, 1966), de modifications du pH ou encore des groupements thiols. De la même façon que pour l'inactivation des enzymes par chauffage, ce procédé présente des inconvénients et provoque notamment des changements de texture. De plus, la congélation fragilise les structures membranaires des cellules et facilite ainsi le brunissement enzymatique lors de la décongélation des produits (Fennema, 1975).

Les traitements par hautes pressions peuvent aussi induire des inactivations réversibles ou irréversibles des activités enzymatiques. La perte en activité catalytique du fait des hautes pressions varie selon l'enzyme, la nature des hautes pressions, la température et la durée du traitement (Cheftel, 1992). Cependant, la PPO est relativement résistante aux traitements par les hautes pressions : des pressions de 5 et 7 kbar sont nécessaires à l'inactivation de la PPO de pomme à pH 4,5 et 5,4 respectivement (Nicoli *et al*, 1994).

Une voie de recherche consiste à associer les traitements par la chaleur à une exposition des aliments sous haute pression hydrostatique. Selon Cheftel (1992), certaines enzymes subissent une dénaturation irréversible lorsqu'elles sont exposées à des pressions supérieures à 100MPa. Ainsi les PPOs partiellement purifiées de pommes, de raisin, de poires et d'avocat sont-elles partiellement dénaturées (10 à 60 % de l'activité initiale est perdue) lorsqu'elles sont exposées durant 15secondes à des pressions allant de 100 à 900 MPa et à des températures atteignant 60°C (Rastogi *et al*, 1999).

La PPO de champignon ne semble cependant pas affectées par ces traitement (Matser *et al*, 2000). Toutefois, la température, la pression et la durée de traitement restent des paramètres à optimiser pour une meilleure efficacité.

La combinaison des traitements thermiques avec des ultrasons peut également contribuer à l'inactivation enzymatique. Lorsqu'il est appliqué en milieu liquide, le traitement par ultrasons entraîne la formation de bulles dont les interfaces changent continuellement de forme et de taille. Les ondes acoustiques peuvent affecter les

structures enzymatiques et ainsi promouvoir la dénaturation des enzymes (El'Piner et *al*, 1965).

En fin, l'irradiation est de plus en plus reconnue comme une méthode pour diminuer les pertes après récolte tout en assurant une bonne qualité hygiénique des aliments et facilitant leur commercialisation à large échelle. Le brunissement des tubercules de pomme de terre et de fruits tropicaux après irradiation aux rayons gamma a été largement étudié par Thomas (1984 ; 1986). Ces rayons inhibent la germination des tubercules de pomme de terre et ont un effet sur les substrats phénoliques. Cependant une irradiation trop forte des produits peut entraîner la rupture des membranes et la libération de la PPO. Par ailleurs, les radicaux libres produits par des radiations ionisantes peuvent réagir avec d'autres composés alimentaires et entraîner des effets secondaires tels que le brunissement des tissus, l'oxydation des lipides et des pertes vitaminiques (Pendharkar et Nair, 1987).

1.2.2 Inhibition du brunissement par des extraits naturels

Plusieurs nouveaux inhibiteurs proviennent de différentes plantes médicinales. Ainsi l'arbutine et l'hinokitiol (Sakuma et *al*, 1999), l'acide gallique et ses dérivés alkylés extraits de plantes médicinales africaines (Kubo et *al*, 2000) apparaissent comme des inhibiteurs compétitifs des PPOs. Certains microorganismes synthétisent également des inhibiteurs. Citons deux inhibiteurs compétitifs classiques d'origine fongique : l'acide fusarique et la 4-pentadécylpyridine (Ferrar et Walker, 1999) qui sont cependant toxiques.

Osmianski et Lee (1990) rapportent qu'un peptide contenu dans le miel serait capable d'inhiber fortement le brunissement enzymatique de tranches de pommes en agissant comme un inhibiteur non compétitif de la PPO. L'efficacité anti-brunissement du miel est attribuée à sa richesse en antioxydants tels que l'acide ascorbique, les flavonoïdes et l' α -tocophérol.

Le jus d'ananas est également reconnu pour son efficacité anti-brunissement. Outre la présence d'acide citrique et d'acide ascorbique, un ester d'acide organique soufré serait directement responsable de cette efficacité (Bennion, 1990).

1.2.3 Inhibition du brunissement par des préparations enzymatiques

Les préparations enzymatiques font, depuis longtemps, partie des additifs employés dans l'industrie agroalimentaire. Les enzymes ont l'avantage d'être d'origine naturelle, non toxiques, mais leur prix est généralement élevé, principalement lorsqu'un haut degré de pureté est requis (Poulter et Caygill, 1985).

Citons l'exemple de la papaïne, dès 1935, un brevet est déposé par Balls et Hale pour l'emploi du jus de papaye pour prévenir le brunissement de fruits et légumes coupés. Des préparations enzymatiques de ficine inhibe aussi efficacement, dans certaines conditions expérimentales, le brunissement de crevettes et de pomme de terre pelées et tranchées (Martinez et Whitaker, 1995).

1.2.4 Inhibiteurs chimiques de contrôle du brunissement enzymatique

La recherche de traitements chimiques a conduit à une meilleure compréhension des mécanismes d'action de composés connus et/ou employés dans l'industrie agroalimentaire ainsi qu'à la découverte de nouveaux composés ayant un effet anti-brunissement.

L'utilisation d'inhibiteurs du brunissement enzymatique ne peut se concevoir que s'ils n'ont aucun effet toxique et ne modifient pas le goût ni la couleur des produits, et évidemment si le surcoût économique est supportable.

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

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

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

1.2.4.1 Inhibiteurs agissant sur les substrats des PPOs

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

Les cyclodextrines constituent une première catégorie d'agents adsorbants des phénols d'origine naturelle. Leur forme cylindrique ménage une surface interne hydrophobe alors que la surface externe présente un caractère hydrophile (Szejtli,

1990). Leur cavité hydrophobe leur permet de former un complexe avec une large gamme de molécules organiques et notamment avec des phénols ayant un caractère hydrophobe fort. Ainsi, leur utilisation dans les jus de fruits et légumes a été brevetée par Hicks et *al*, 1990. Cependant, la capacité de piégeage des cyclodextrines dépend de la nature des cyclodextrines et de celle des polyphénols (Fayad et *al*, 1997).

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

D'autres polysaccharides anioniques tels que les carraghénanes et les sulfates de xylane ou d'amylose peuvent inhiber le brunissement enzymatique de jus ou de tranches d pommes. Ils complexeraient les composés phénoliques, mais également les atomes de cuivre du site actif des PPOs (Tong et Hicks, 1991).

1.2.4.2 Traitements chimiques agissant sur l'enzyme

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

1.2.4.3 Composés chélateurs d'ions métalliques.

Ces composés forment des complexes avec les atomes de cuivre du centre actif des PPOs. Comme dans le cas de l'inactivation de la PPO par l'acide oxalique. Cette inactivation s'accompagne de l'arrachement d'un des deux atomes de cuivre de l'enzyme conduisant à une forme inactive nommée *metapo*, l'atome de cuivre encore fixé à l'enzyme restant sous forme oxydé. La forme *metapo* est alors capable de fixer spontanément un atome de cuivre présent dans le milieu, conduisant ainsi à la régénération de la forme native de l'enzyme et à la restitution de l'activité catalytique (Yong et *al*, 1990).

Parmi les composés chélateurs classiques inhibant les PPOs se trouvent le 2-mercapto benzothiazole, l'azoture, le cyanure, le monoxyde de carbone, l'acide éthylène diaminetétracétique, l'homocystéine, la métallothionéine et le diéthylthiocarbamate (de Rigal, 2001). D'autres composés chélateurs ont une structure relativement proche de celles d'un phénol, ce qui leur confère une forte efficacité. C'est le cas de la tropolone, la mimosine (Kahn et Andrawis, 1985) le kaempférol, l'acide paratoluïque, l'acide salicyl hydroxamique ainsi que les acides kojique et oxalique (Tong et *al*, 1995).

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

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

1.2.4.4 Les agents acidifiants

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

1.2.4.5 Inhibiteurs agissant sur le site de fixation du substrat phénolique.

Dans ce groupe se trouvent les acides carboxyliques et plus particulièrement les acides benzoïques, cinnamiques et phényl alcanoliques. Ce sont le plus souvent des inhibiteurs compétitifs des PPOs. Leur pouvoir inhibiteur tient à leur similitude structurale avec les phénols-substrats et à leur faible caractère oxydable (MacEvily et *al*, 1992b). Toutefois, le type d'inhibition observée peut varier selon le substrat ou la

source enzymatique (Janovitz-Klapp et *al*, 1990a ; Menon et *al*, 1990). Ces derniers auteurs ont également montré que la forme protonée des acides était responsable de l'inhibition, après avoir observé que celle-ci était accentuée à pH acide. Généralement, les dérivés de l'acide cinnamique ont un pouvoir inhibiteur plus élevé que ceux des deux autres séries citées (Sapers, 1993).

Citons également l'acide kojique, l'acide oxalique, et la tropolone qui, outre leur pouvoir chélateur de métaux, sont des inhibiteurs compétitifs ou mixtes des PPOs (Kahn et *al*, 1995).

Ce sont des inhibiteurs de la PPO en raison de leurs similitudes structurales avec les substrats phénoliques. Les formes non dissociées de ces acides sont capables d'inhiber la PPO par complexation avec le cuivre au site actif de l'enzyme (MacEvily et *al*, 1992).

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

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

Ce groupe d'inhibiteurs non compétitifs est constitué principalement d'aldéhydes extraits de végétaux. Citons le cuminaldéhyde présent dans les graines de cumin et l'ansaldéhyde présent dans les graines d'anis (Kubo et Kinst-Hori, 1998). L'inhibition est due à l'attaque par le groupement aldéhyde d'amines primaires présent sur les chaînes latérales des PPOs, conduisant à la formation d'une base de Schiff stable. De plus, l'hexanal sous forme de gaz s'est montré très efficace contre le brunissement de tranches de pommes (Lanciotti et *al*, 1999).

L'Acide citrique (acide 2-hydroxy-1, 2,3-propane tricarboxylique) C'est un acide organique faible (Rico et *al*, 2007 ; Li et *al*, 2008), très diffus dans la nature. Il intervient dans le métabolisme de nombreux animaux et plantes ; il a été isolé sous forme cristalline à partir du jus de citron, en 1784, par Sheele et sa structure a été établie par Liebig en 1838. La synthèse chimique de l'acide citrique, à partir de glycérine, remonte à 1880. En 1893, Wettmer découvrit quelques micromycètes capables de produire l'acide citrique par fermentation de substrats contenant du sucre.

Cet acide organique a été souvent signalé par son activité anti-brunissement des fruits frais et les légumes coupés (Li-Quin et *al*, 2009) et est généralement reconnu comme étant non dangereux « GRAS » (*Generally Recognized As Safe*) (Pacific Health Sciences, 2008).

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

Matériels et méthodes

2.1 Matériels

2.1.1 Matériel biologique

La truffe (*Terfezia leonis Tul*) est utilisée comme source de la PPO (Figure7). Les truffes ont été récoltées durant la période Mars-Avril de la commune d'Ain Deheb de la Wilaya de Tyaret.



Figure 7 : *Terfezia leonis Tul* d'Algérie (Wilaya de Tyaret).

2.1.2 Produits chimiques

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

2.2 Méthodes

2.2.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO

La PPO a été extraite à partir des truffes (*Terfezia leonis Tul*) selon le protocole d'extraction décrit par Choucha et Zarwal (2009).

Les truffes sont lavées avec de l'eau distillée pour éliminer le sol résiduel et sont séchées à l'air libre. 75 g d'écorce de truffe préalablement refroidies à 4°C afin d'éviter leur brunissement enzymatique sont broyées dans 100 ml de tampon phosphate de sodium (0.05 M-pH 7.0) pendant 2.5 minutes à l'aide d'un mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E). Le broyat est filtré à travers quatre couches de gaze et le filtrat obtenu est centrifugé à 4000 trs/min pendant 10

minutes à l'aide d'une centrifugeuse (Fisher BioblockScientific). Le surnageant récupéré d'un volume total de 78 ml, représente l'extrait brut de la PPO est stocké dans des tubes coniques (15 ml) à -10°C.

2.2.2 Mesure de l'activité PPO

L'activité crésolase et l'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul*) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeλIOSγ Spectrophotometer, England), réglé à 475 nm et 410 nm respectivement et en présence de la L-tyrosine et catéchol comme substrat monophénolique. L'oxydation de la L-tyrosine s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel due à la production de la dopachrome de couleur rose-rouge (Pérez-Gilabert et al, 2001).

L'activité crésolase et l'activité catécholase est déterminée à 30°C dans le milieu réactionnel contenant 1 mL de la L-tyrosine et catéchol à 1 mM dans du tampon acétate de sodium à 0.05 M et 30 µl de la solution enzymatique la vitesse initiale de l'activité crésolase et l'activité catécholase est calculé à partir de la partie linéaire de la courbe d'accumulation du produit en fonction du temps après la phase de latence (Figure 8).

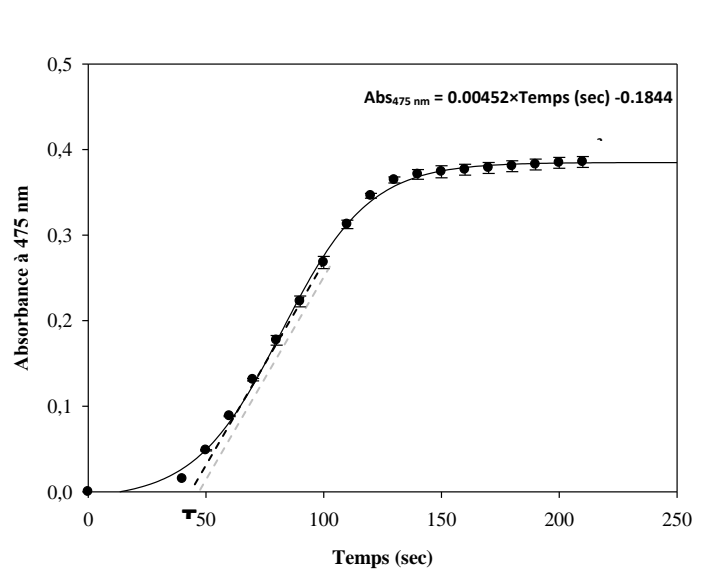


Figure 8: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine par l'extrait brut de la PPO de *Terfezia leonis Tul* (L-tyrosine à 1 mM, SDS à 10 mM, volume de l'extrait enzymatique 30 µl, tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.0, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1.0 ml).

Une Unité Internationale (UI) est la quantité d'enzyme qui produit 1 μmol de dopachrome par minute à 30°C.

La cuve de référence pour les mesures UV-visible contient tous les constituants sauf le substrat. Les solutions de substrat et d'enzyme sont mélangées après pré-incubation de 5 min à 30°C. Comme c'est indiqué précédemment, l'extrait enzymatique est le constituant à ajouter le dernier dans le milieu réactionnel. Toutes les analyses des activités dans ce travail ont été effectuées trois fois et la moyenne des résultats seront présentées. La barre d'erreur représente l'erreur standard.

2.2.3 Détermination des valeurs d'IC₅₀

Pour déterminer la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC₅₀), l'activité de la PPO a été mesurée à 30°C et pH 5.0 (tampon acétate de sodium 0.05 M), en absence et en présence de différentes concentrations d'acide citrique comprises entre 5 et 15 mM et ceci pour une concentration constante de la L-tyrosine et le catéchol. Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'acide citrique (Chen et *al*, 1998).

2.2.4 Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide citrique

Pour déterminer le mécanisme d'inhibition de la PPO de truffe par l'acide citrique, l'activité crésolase et l'activité catécholase de l'enzyme a été mesurée dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations constantes d'acide citrique (5-10 mM) et à différentes concentrations de la L-tyrosine et catéchol comprises entre 0.4-1.2 mM et 3-15 mM respectivement.

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

Les constantes d'inhibition (K_I et K_{IS}) ont été calculées à partir des graphes secondaires des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur, comme c'est décrit précédemment (Chen et *al*, 1998). K_I et K_{IS} représentent les

constantes de dissociation du complexe Enzyme-Inhibiteur (EI) et du complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur (ESI), respectivement.

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

2.2.5 Analyse des résultats expérimentaux

L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2DTM (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). Enzyme Kinetics ProTM Version 2.36, SigmaPlot 2004 (Windows Version 9.01) et Origin 6.0 (Microcal (TM) Origin Version 6.0, Copyright © 1991-1999 Microcal Software, Inc.).

Résultat et discussion

3.1 Détermination de la valeur d'IC₅₀ de l'effet de l'acide citrique sur l'activité crésolase et catécholase de la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul*)

L'effet de différentes concentrations d'acide citrique sur l'oxydation de la L-tyrosine par la PPO de truffe *Terfezia leonis Tul* est étudié. La Figure (9) montre que l'activité crésolase et catécholase diminue en fonction de la concentration d'acide citrique dans le milieu réactionnel. La valeur d'IC₅₀ définie comme étant la concentration d'acide citrique qui provoque une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50 % ainsi calculée égale à 9.46mM d'activité crésolase et 6.52Mm d'activité catécholase .

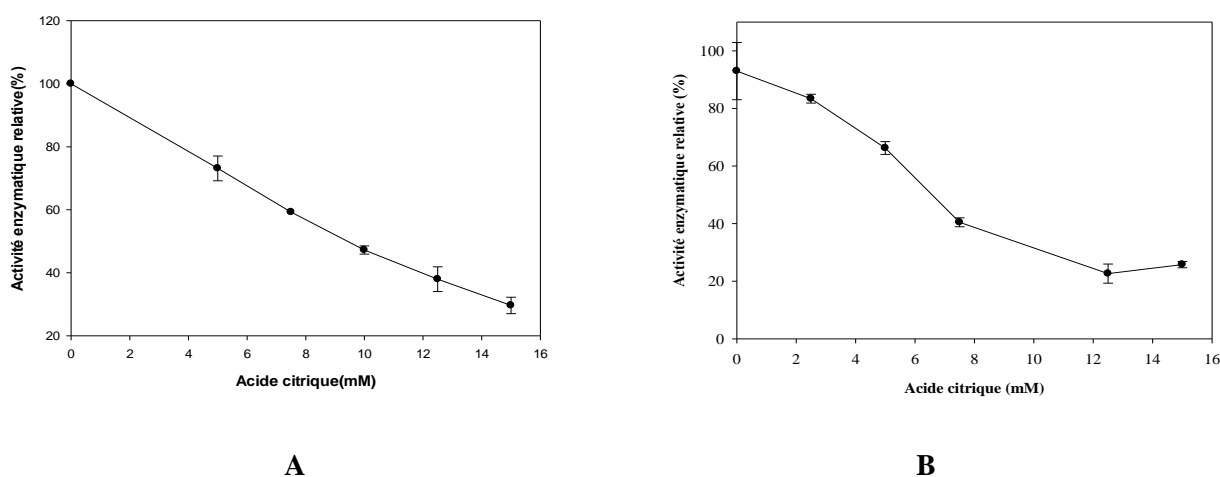


Figure 9. Effet de la concentration de l'acide citrique sur la l'oxydation de L-tyrosine par la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul*) A l'activité crésolase B l'activité catécholase . Les conditions d'essai : 30°C, 1.0 ml de milieu réactionnel contient 0.05 M de tampon acétate de sodium (pH 5.0), 1 mM de L-tyrosine et 1mM de catéchol, et 50 µl de l'extrait enzymatique, 10 mM de SDS. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais.

D'après le Tableau (2), on constate que la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul*) est plus sensible vis-à-vis de l'acide citrique par rapport aux PPOs obtenues à partir de plusieurs sources végétales.

Il est notable que la valeur d'IC₅₀ dépend de la source d'enzyme, de substrat phénolique utilisé, des conditions expérimentales et de la pureté de l'enzyme.

Tableau 2. Les valeurs d'IC₅₀ de l'effet de l'acide citrique sur l'activité PPO de plusieurs sources végétales.

Sources	Type de substrat	IC ₅₀ (mM)	Références
Truffe (<i>TerfezialesonisTul</i>)	L-tyrosine	9.46	Notre etude
	cathecol	6,52	
Racine de céleri (<i>Apiumgraveolens L.</i>)	Catéchol	26.3	Aydemir et Akkanh (2006)
Truffe (<i>TerfezialesonisTul.</i>)	Catéchol	6.52	Benmbarek et Chaher (2011)
Champignon de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	Catéchol	150	SON et <i>al.</i> , 2000
Laitue (<i>Lactucasativa L.</i>)	Catéchol	62.91	Urszula et <i>al</i> 2007
Racine de banana	Dopamine	22	Nathalie et al 2006

3.2 Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité crésolase et l'activité catécholase de la PPO de truffe par l'acide citrique

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de la L-tyrosine et catéchol par la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul*) en absence et en présence d'acide citrique suit une cinétique de Michaelis-Menten. Les cinétiques d'inhibitions de l'activité crésolase et catécholase par l'acide citrique ont été déterminées par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk et les résultats trouvés sont regroupés dans le Tableau (2).

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

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

Avec :

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

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

$$K_I = K_{IS}$$

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

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

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

Les constantes d'équilibres de la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_I ; et sur le complexe (ES) ; K_{IS} sont identiques.

Les valeurs du coefficient de régression linéaire (R^2) sont indiquées dans le Tableau (3). Leurs valeurs sont comprises entre 0.866-0.967, ce qui indique bien que les données expérimentaux, sont parfaitement ajustées par l'équation d'inhibition choisie. Ce comportement cinétique montre que l'inhibiteur peut se fixer sur l'enzyme libre et également sur le complexe enzyme-substrat (ES). La présence d'un inhibiteur non compétitif dans le milieu réactionnel n'affecte pas la fixation du substrat avec l'enzyme libre mais affecte la fonction catalytique de l'enzyme.

Tableau 3. Les valeurs des paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité crésolase et l'activité catécholase de la PPO de *Terfezia leonis Tul.* Par l'acide citrique.

Substrat	Acide citrique(mM)	K_I (mM)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/l/min}$)	R^2
L- tyrosine	0	8.40 \pm 0.54	1.15 \pm 0.43	109.37 \pm 23.26	0.967
	5			51.91 \pm 4.81	
	10			43.34 \pm 3.56	
Catechol	0	11,14 \pm 1,04	25,07 \pm 8,21	1.13 \pm 0,28	0.980
	5			0.78 \pm 0,19	
	10			0.6 \pm 0,15	

Les résultats illustrés dans le Figure (10) montrent une série des courbes linéaires ayant le même point d'intersection sur l'axe des abscisses ($1/[S]$) mais de différentes pentes, indiquant que l'acide citrique se comporte comme un inhibiteur non compétitif de l'activité crésolase et l'activité catécholase de la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul.*). Cet inhibiteur a diminué la valeur apparente de V_{max} et n'a aucun effet sur le K_m comme le montre le Tableau (3).

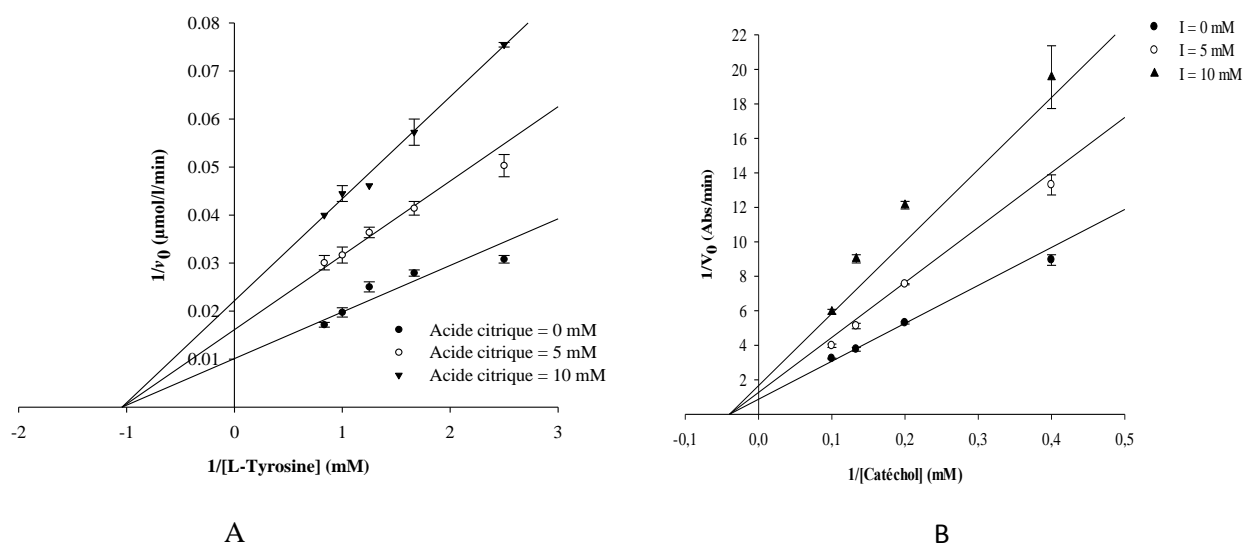


Figure 10. Les graphiques de Lineweaver-Burk de l’inhibition de l’activité crésolase et l’activité catécholase de la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul.*) par l’acide citrique A l’activité crésolase B l’activité catécholase. Concentrations d’acide citrique sont : 0 (●), 5 (○), et 10 (▼) mM. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais.

Tableau 4. Les types d’inhibition des PPOs de quelques sources végétales par l’acide citrique.

Source d’enzyme	Type de substrat	Type d’inhibition	Références
Truffe (<i>Terfezia leonis Tul.</i>)	L-Tyrosine	Non compétitive	Notre etude
	Catéchol		
Racine de céleri (<i>Apium graveolens L.</i>)	Catéchol	Compétitive	Aymedir et Akkanli (2006)
Laitue (<i>Lactuca sativa</i>)	Catéchol	Non compétitive	Altunkaya et Gökmen (2008)
Brocoli (<i>Brassica oleracea</i>)	Catéchol	Non compétitive	Gawlik-Dziki et al (2007)
	4-Méthylcatéchol	Non compétitive	

Nos résultats sont en concordance avec ceux trouvés par d'autres chercheurs. Gawlik-Dziki et *al.* (2007) et Altunkaya et Gökmen (2008) ont trouvé respectivement que l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif des PPOs de brocoli (*Brassicaoleracea var. botrytis italica*) et la laitue (*Lactuca sativa*) lorsque le catéchol est utilisé comme substrat. Par contre la PPO de céleri (*ApiumgraveolensL.*) présente une inhibition de type compétitive (Aymedir et Akkanli, 2006).

L'acide citrique a un double effet inhibiteur, en diminuant le pH (au-dessous du pH optimal de l'activité de la PPO) du milieu réactionnel et par chélation du cuivre (Altunkaya et Gökmen, 2008 ; Jiang et *al.*, 1999). A des valeurs de pH inférieures à 4 l'enzyme a peu d'activité en raison de la perte du cuivre de son site actif (Suttirak et Manurakchinakorn, 2010).

Conclusion

Le polyphénol oxydase est l'un des agents responsable du brunissement pour de nombreux produits végétaux y compris les truffes et les champignons. La PPO met en jeu deux activités enzymatiques : les activités crésolasique et catécholasique.

Au terme de ce travail, il est signalé que l'objectif fixé dans notre introduction est atteint à savoir l'étude de la cinétique d'inhibition de l'activité crésolase et catécholase de la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul*) par l'acide citrique en présence de la L-tyrosine et catéchol comme substrat.

Il ressort de cette étude que l'acide citrique est un inhibiteur réversible de la tyrosinase de truffe; inhibiteur de type non compétitive fixant l'acide citrique sur l'enzyme libre et sur le complexe enzyme-substrat.

Cette inhibition dépend principalement de la source d'obtention de l'enzyme et du substrat phénolique utilisée.

Nous pouvons dire que l'acide citrique est un composé chimique largement répandu dans la nature non toxique et de faible cout qui peut être utilisé pour le contrôle du brunissement des truffes pendant leur conservation après leur récolte.

Comme perspectives, il serait plus intéressant d'étudier l'effet de l'acide citrique sur les propriétés cinétique et thermodynamiques de la tyrosinase de truffe pendant son inactivation thermique.

Références bibliographiques

- Altunkaya A., Gökmen V., 2008. Effet of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chemistry*. 107: 1173-1179. In benmebarekhadjira et chaherfella 2011.
- Arslan O., Dogan S., 2005. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85, 1499-1504. In Abidli Ahmed Tidjaniet Saggar Ahmed Seddik 2012.
- Bachem C.W.B., Speckmann G., Vander Linde P.C.G., Verheggen F.T.M., Hunt M., STEFFENS J.C., ZABEAU M., 1994. Antisense Expression of Polyphenol Oxidase Genes Inhibits Enzymatic Browning in Potato Tubers. *Bio/Biotechnol.* 12, 1101-1105.
- Bennion M., 1990. Enzymatic oxidative browning. In : introductory Foods, MACMILLAN Publishing Company, New York, 168. In benmebarekhadjira et chaherfella 2011.
- Bonner, Jr W.D. 1956. Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*, Vol. 8, pp. 427-452. In Bechrair Fatma et Bechrair Assia 2010.
- Cheftel J.C., 1992. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: overview. In *High Pressure and Biotechnology*. C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, P. Masson (Eds). London, John Libbey Eurotext., 195-209.
- Chen Q.X., LU H.Y., ZHU C.M., LIN H.N., ZHOU H.M., 1998. The effect of Nthiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem Mol Biol Int.*, 45, 465-73. In benmebarekhadjira et chaherfella 2011.
- Chen Q.X., Song K.K., Wang Q., Huang H., 2003. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.*, 15, 491-496. In benmebarekhadjira et chaher fella 2011.
- Cheriot S., 2007. Role des produits de la réaction de maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phenols et des lipides. l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et d'Environnement (Agro Paris Tech), Thèse de doctorat, spécialité sciences de l'aliment, 241. In benmebarekhadjira et chaherfella 2011.

- Chevaller T., de Rigal D., Mbeguier-A-Mbeguier D., Gauillard F., Richard-Forget F., FILS-LYCAON B.R., 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxydase. *Plant Physiol.*, 119, 1261-1269.
- Choucha F, Zarwal I, 2009. Extraction, purification et caractérisation de la polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) De *Trifolialeunis Tul.* Mémoire d'ingénieur., pp: 43-50.
- Claus H., Decker H., 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology.*, 29, 3–14. In Abidli Ahmed Tidjaniet Saggiar Ahmed Seddik 2012.
- Conrad J.S., Dawson S.R., Hubbard E.R., Meyers T.E., Strothkamp K.G., 1994. Inhibitors binding to the binuclear active site of tyrosinase : temperature, pH, and solvent deuterium isotope effects. *Biochemistry*, 33, 5739-5744.
- De Poix A., Rouet-Mayer M.A., Philippon J., 1980. Action combinée des chlorures et de l'acide ascorbique sur l'inhibition des brunissement enzymatiques d'un broyat de pommes. *Lebensm. -Wiss. -technol.*, 14, 105-110.
- De Rigal D., 2001. Recherche sur l'inhibition du brunissement enzymatique ; utilisation de préparations enzymatique, substitués aux sulfite. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix. Marseille III. Option : biochimie. P19. (Thèse de Doctorat). In benmebarek hadjiraetchaher fella 2011.
- Decker H., Terwilliger N., 2000. Cops and robbers : putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.*, 203, 1777-1782. In benmebarek hadjiraetchaher fella 2011.
- Decker H., Tucek F., 2000. Tyrosinase–catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism, *Trends Biochem.Sci.*, 25, 392–397. In benmebarek hadjiraetchaher fella 2011.
- Decker, H., & Jaenicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 673-687. In Abidli Ahmed Tidjaniet Saggiar Ahmed Seddik 2012.
- Dellalonga S., Ascone I., Biaconi A., Bonfigli A., Castellano A.C., Zarivi O., Miranda M., 1996. The dinuclear copper site structure of Araricus bisporus tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 271, 21025-21030.

- Dijkstra L., Walker J.R.L., 1991. Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric.* 54, 229-2.
- Dixon M, Webb E.C., 1964. Dans “enzymes”. Longman ed., Londres, 694-695.
- Dogan S., Turan P., Dogan M., Aalkan M., Arslan O., 2007. Inhibition Kinetic of *Ocimum basilicum* L. Polyphenol Oxidase. 5, 46. In benmebarek hadjira et chaherfella 2011.
- Duckworth H.W., Coleman J.E., 1970. Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry.*, 245, 1613-1625.
- Eicken C., Krebs B, Sacchettini J.C., 1999. Catechol oxidase – structure and activity. *Current Op. Structural Biol.*, 9, 677-683. In Bechrair Fatma et Bechrair Assia 2010.
- El'piner E.A., Sokolskaya A.V., Margulis M.A., 1965. Initiation of chain reactions under ultrasonic waves effects. *Nature.*, 208., 945-946.
- Espin J.C., Van Leeuwen J., Wichers H., 1999b. Kinetic study of Activation Process of a Latent Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase by Serine Proteases. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3509-3517.
- Espin J.C., Wichers H.J., 1999. Kinetics of activation latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3503-3508.
- Fayad N., Marchal L., Billaud C, Nicolas J., 1997. Comparaison of β -cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenol oxidases from different source. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2442-2446.
- Fennema O.R., 1975. Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems. In Water relations of foods. R. B. Duckworth (Ed.). New York, Academic Press., 397-413.
- Ferrar P.H., Walker J.R.L., 1999. Microorganisms as potential source of novel diphenol oxidase inhibitors. *J. Food Biochem.*, 23, 1-15.
- Flurkey W.H., 1986. Polyphenol oxidase in high plant-immunological detection and analysis of *in vitro* translation products. *Plant Physiol.*, 81, 614-618.

- Fraignier M.P., Marques L., Fleuriot A., Macheix J.J., 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of phenol oxydases from different fruits of *Prunus*. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2376-2380.
- Garcia-Borron J.C., Solano F., 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15., 162-173.
- Gaillard F., Richard-Forget F., 1997. Polyphenoloxydases from Williams pears (*Pyrus communis* L., cv Williams): Activation, Purification and some properties. *J. Sci. Food Agric.*, 74, 49-56.
- Gentile A., Ferraris L., Matta A., 1988. Variation of phenol oxidase activities as a consequence of stresses that induce resistance to Fusarium Wilt of tomato. *J. Phytopathol.*, 122, 45-53.
- Goldbeck J.H., Cammarata K.V., 1981. Spinach thylakoid polyphenoloxydase. Isolation, activation and properties of native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.*, 67, 977-984.
- Gouzi H., Coradin T., Delicado E.M., Ünal U., Benmansour A., 2010. Inhibition Kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach Polyphenol Oxidase. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3, 1-7
- Gouzi H., Depagne C., Benmansour, A., Coradin. (2013)(a). First extraction polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis* Tul.) and its thermal behavior. *Eur Food Res Technol*. DOI 10.1007/s00217-013-2040-8.
- Harel E., Mayer A.M., Lerner H.R., 1970. Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric.*, 21., 542-544. In Bouchareb Nesrine et Taouti Messaouda 2013.
- Hicks K.B., Sapers G.M., Seib P.A., 1990. Process for preserving raw fruit and vegetable juices using cyclodextrins and composition thereof. U.S. Patent 4, 975-293.
- Himmelwright R.S., Eickman N.C., Solomon E.I., 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.*, 102.

- Janakat, S, S. Al-Fakhiri and A. Sallal, 2004. A promising peptide antibiotic from Terfeziaclaveryi aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vivo. *Phytotherapy Res.*, 18: 810-813.
- Janovitz-Klapp A.H., Richard F.C., Goupy P., Nicolas J.J., 1990a. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 38,926-931.
- Janovitz-Klapp A.H., Richard, F. C., Nicolas, J., 1989 Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties, *Phytochemistry.*, 28, 2903 –2907.
- Jiang, Y. M., Fu, J. R., Zauberman, G., & Fuchs, Y. (1999). Purification of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. *Journal of Science and Food Agriculture*, 79, 950–954.
- Jiang, Y. M., Fu, J. R., Zauberman, G., & Fuchs, Y. (1999). Purification of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. *Journal of Science and Food Agriculture*, 79, 950–954.
- Jolivet S., Arpin N., 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102: 1459-1483.
- Kahn V., 1985. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on *o*-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.*, 50, 111-115.
- Kahn V., Andrawis A., 1985. Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. *Phytochemistry.*, 24, 905-908.
- Kahn V., Lindner P., Zakin V., 1995. Effect of kojic acid in the oxidation of *o*-dihydroxyphenols by mushroom tyrosinase. *J. Food Biochem.*, 18, 253-271.
- Keilin, D and Mann, T. (1938). Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.*, Vol. 125, pp. 187-204.
- Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J.C., Krebs B., 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struc. Biol.*, 12.
- Kubo I., Kinoshita H., 1998. Tyrosinase inhibitors from cumin. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5338-5341.

- Kubo I., Kinst-Hori I., Kubo Y., Yamagiwa Y., Kamikawa T., Haraguchi H., 2000. Molecular design of antibrowning agents. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1393-1399.
- Kubowitz, F. 1938. Spaltung und resynthese der polyphenoloxydase und des hamocyanins. *Biochem. Z*, Vol. 299, pp. 32-57.
- Kuwabara T., Katoh Y., 1999. Involvement of Binuclear Copper Site in the Proteolytic Activity of Polyphenol Oxidase. *Plant Cell Physiol.*, 40, 1029-1035. In Abidli Ahmed Tidjaniet Saggah Ahmed Seddik 2012.
- Lanciotti R., Corbo M.R., Gardini F., Sinigaglia M., Guerzoni M.E., 1999. Effect of hexanal on the shelf life of fresh apple slices. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4769-4776.
- Lavollay J., Legrand G., Lehongre G., Neumann J., 1975. The *o*-hydroxylation of phenol and *p*-cresol by tyrosinases in the presence of ascorbic acid. *Physiol Veg.*, 13, 667-76.
- Lax A.R., Vaughn K.C., 1991. Colocalization polyphenol oxydase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.*, 96, 26-31.
- Lerch K. (1981). Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine-monoxygenase. *in* Metal ions in biological systems. H. Siegel. New York, Marcel Dekker. 13: 143-186.
- 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.*, 257., 6414-6419.
- Lerch K., 1995. Tyrosinase: molecular and active-site structure, *ACS Symp. Ser.* 600, 64-80.
- Liebig, J.: 1838, 'Der Zustand der Chemie in Österreich', *Annalen der Pharmacie*, 25, 339-47.
- Li H., Guo A., Wang H., 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.*, 108, 1-13.
- Li-qin Z., JIE Z., Shu-hua Z., Lai-hui G., 2009. Inhibition of browning on the surface of peach slices by short-term exposure to nitric oxide and ascorbic acid. *Food Chem.*, 114, 174-9.

- Liu, J.P., G.A. Schmidt, D. Martinson, D.H. Rind, G.L. Russell, and X. Yuan, 2003: Sensitivity of sea ice to physical parameterizations in the GISS global climate model. *J. Geophys. Res.*, 108, no. C2, 3053, doi:10.1029/2001JC001167.
- Mac Cord J.D., Kilara A., 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Food Sci.*, 48, 1479-1483.
- Maeda K., Fukuda M., 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 42: 361–368.
- Marques L., Fleuriet A., Machix J.J., 1995b. Characterization of multiple forms of polyphenol oxidase from apple fruit. *Biochemistry.*, 33, 193-200.
- Martinez V.M., Whitaker R., 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 195-200. In Abidli Ahmed Tidjaniet Saggah Ahmed Seddik 2012.
- Matheis, G. 1987a. Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11: 5-12.
- Matser A.M., Knott E.R., Teunissen P.G.M., Bartels P.V., 2000. Effects of high isostatic pressure on mushroom. *J. Food Eng.*, 45, 11-16.
- Mayer A.M., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. *Phytochemistry.*, 67, 2318–2331.
- Mayer A.M., Harel E., 1978. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry.*, 18, 193-215.
- Mayer A.M., Harel E., 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry.*, 18, 193-2.
- McEvily A.J., Iyengar R., Otwell S., 1992b. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *C.R.C. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 253-273.
- McEvily A.J., Iyengar R., Otwell W.S., 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 253-273.
- Menon S., Fleck R.W., Yong G., Strothkamp K.G., 1990. Benzoic acid inhibition of the α , β and γ isoenzymes of *agaricus bisporus* tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 280, 27-32.

- Min K., YOO Y.J., 2009. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.
- Moore B.M., Flurkey W.H., 1990. Sodium dodecyl sulfate activation of plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.*, 265, 4982-4990.
- Naish-Byfield S., Riley P.A., 1992. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. Anoximetric study. *Biochem. J.*, 288, 63-67.
- Naish-Byfield S., Cooksey C J, Riley P A, 1994. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase: Effect of dithiothreitol on kinetics. *Biochemical Journal*, 304: 155–162.
- Neeley E., Fritch G., Fuller, A., Wolfe J., Wright J., Flurkey W., 2009. Variations in IC₅₀ Values with Purity of Mushroom Tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 3811-3823.
- Nicolas J., Billaud C., 2006. Prévention du brunissement enzymatique. in *Les polyphénols en agroalimentaire*. P. Sarni-Manchado et V. Cheynier Eds. Paris, Tec et Doc. Lavoisier., 173-210.
- Nicolas J., Richard-Forget F., Goupy P.M., M.-J. Amiot., Aubert S.Y., 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34: 109-157.
- Njagi J., Chernov M.M., Leiter L.C., Andreescu S., 2010. Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
- Nosanchuk J.D., Casadevall A., 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.*, 5, 203–223.
- Nozue M., Arakawa D., Iwata Y., Shioiri H., Kojima M., 1999. Activation by proteolysis *in vivo* of 60-ku latent of polyphenol oxidases in sweet potato cells in suspension culture. *J. Plant Physiol.*, 155, 297-301.
- Oszmianski J., LEE C.Y., 1990. Inhibition of polyphenoloxidase activity and browning by honey. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1892-1895.
- Pacific Health Sciences, Available at: http://www.pacifichealth.com/gras_list.htm#GRAS, accessed October 2008.

- Pendharkar M.B., Nair P.M., 1987. Alteration in phenylpropanoid metabolism in gamma
- Perez-Gilabert M., Morte A., Honrubia M., Garcia-Carmona F., 2001. Monophenolase activity of latent Terfeziacloveryityrosinase: Characterization and histochemical localization. *PhysiolygiaPlantarum.*,133, 203-209.
- Pierpoint W.S., 1966. The enzymatic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochem. J.*, 98, 567-580.
- Pizzocaro F., Torreggiani D., Gilardi G., 1993. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *J.FoodProcess.Preserv.*, 17, 21-30.
- Poulter N.H., Caygill J.C., 1985. Production and utilization of papain- a proteolytic enzyme from Carcia papaya L. *Trop. Sci.*, 25, 123-137.
- Queiroz C., MariaLuciamendes L.M.L., Fialho E., Vera Lucia., 2008. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International.* 24, 361–375.
- Ramirez, E.C., Whitaker, J.R. and Virador, V.M. 2004. *Handbook of Food Enzymology*, pp. 509–522, Marcel Dekker, New York, NY. Kim J, Marshall MR, Wei C. 2000. Polyphenoloxidase. In: Haard NF, Simpson BK, editors. *Seafood enzymes utilization and influence on postharvest seafood quality*. New York: Marcel Dekker. p 271–315.
- Rapeanu G., Loey A.V., Smout C., Hendrickx M., 2006. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitisviniferassp. Sativa*). *Food Chem.*, 94, 253–361.
- Rastogi N.K., Eshitiaghi M.N., Knorr D., 1999. Effects of combined high pressure and heat treatment on the reduction of peroxidase and polyphenoloxydase activity in red grapes. *FoodBiotechnol.*, 13, 195-208.
- Raymond J., Rakariyatham N., Azanza J.L., 1993. Purification and some properties of polyphenoloxydase from sunflower seeds. *phytochemistry*, 34, 927-931.
- Reinhammar B., Malmstrom B.G., 1981. "Blue" copper-containing oxidases. *in* Copper Proteins. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons., 109-149.

- Rico D., Martin-Diana A.B., Barat J.M., Barry-Ryanc., 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetable: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 18, 373-86.
- Robb D.A.,1984. Tyrosinase.InCopper Proteins and Copper Enzymes. (ed. R. Lontie) CRC Press ; Boca Raton, U.S.A., 2, 207-241.In BechrairFatma et BechrairAssia 2010.
- Ros, J.R; Rodriguez-Lopez, J.N; Garcia-Canovas., 1993.Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase.*Biochem. J.*, 295, 309-312.
- Sakuma K., Ogawa M., Sugibayashi K., Yamada K., Yamamoto K., 1999. Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives.*Arch. Pharm. Res.*, 22, 335-339.
- Sanchez-Ferrer A., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F., 1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1247, 1-11.
- Sapers G.M., 1992. Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration. *J. Food Sci.*, 57, 1192-1193.
- SapersG.M., 1993. Browning of foods : control by control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol.*, 47, 75-84.
- Schoenbein, C.F. (1856). On ozone and oronic actions in mushrooms.*Philosophical Magazine*, Vol. 11. pp. 137-141.
- Sendovski, M.; Kanteev, M.; Shuster Ben-Yosef, V.; Adir, N.; Fishman, A. *J. Mol. Biol.* 2011, 405 , 227
- Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y.(2000). Kinetic study of oxalic acid inhibition onenzymaticbrowning.*J.Agric. Food Chem.*, 48, 2071-4.
- SonSM., Moon KD., Lee CY., 2001. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chem.*, 73, 23-30.
- Spagna G., Barbagallo R.N., Pifferi P.G., 2000. Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning.*J. Agric. Food Chem.*, 48, 4619-4627.

- Strothkamp K.G., Jolley R.L., Mason H.S., 1976. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 519-524.
- Suttirak W., Manurakchinakorn S., 2010. Potential Application of Ascorbic Acid, Citric Acid and Oxalic Acid for Browning Inhibition in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. *Walailak J. Sci. Tech.*, 7(1), 5-14.
- Szejtli J., 1990. Cyclodextrins, properties and application. *Drug investigation*, 2, 11-21.
- Tappel A.L., 1966. Effects of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems. *In Cryobiology*. H. T. Meryman (Ed.). New York, Academic Press., 163-177.
- Taylor R.L., Higley N.A., Bush R.K., 1986. Sulfites in foods : Uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Adv. Food Res.*, 3, 1-76.
- Thomas P., 1984. Radiation preservation of food of plant origin, Part 1. Potatoes and other tuber crops. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 19., 327-379.
- Thomas P., 1986. Radiation preservation of food of plant origin, Part 3. Tropical fruits: bananas, mangoes, and papayas. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 23, 147-205.
- Tong C.B.S., Hicks K.B., 1991. Sulfated polysaccharides inhibit browning of apple juice and diced apples. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1719-1722.
- Tong C.B.S., Hicks K.B., Osman S.F., Hotchkiss JR A.T., Haines R.M., 1995. Oxalic acid in commercial pectins inhibits browning of raw apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 592-597.
- Urszula G., Urszula Z., Michal W., 2007. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.). *Food Chem.*, 8, 20-704.
- Vamos-Vigyazo L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruit and vegetables. *C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 15, 49-127.
- Van Gelder C.W.G., Flurkey W.H., Whichers H.J., 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45, 1309-1323. In Abidli Ahmed Tidjaniet Saggah Ahmed Seddik 2012.

- Vanneste W.H., Zuberbuhler A., 1974. Copper containing oxygenases, In : Molecular Mechanisms of oxygen Activation, HAYAISHI O., Ed., Acad. Press, New York, Chap. 9, 371-393.
- Varoquaux, 1978. contribution a l'étude des propriétés de m'o-diphenoloxydase du champignon de paris (*Agaricus bisporus*). Thèse de doct., faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'université de Dijon, 131p. In Bouchareb Nesrine et Taouti Messaouda 2013.
- Vaughn K.C., Lax A.R., Duke S.O., 1988. Polyphenol oxydase : the cchloroplastoxydase with established function. *Physiol. Plant.*, 72, 659-665.
- Walker J.R.L., Ferrar P.H., 1995. The control of enzymatic browning in foods. Chem. Industry, 836-839. In benmebarek hadjiraetchaher fella 2011.
- Walker J.R.L., Ferrar P.H., 1998. Diphenol Oxidase, Enzyme-catalysed Browning and Plant Disease Resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, 15, 457-498.
- Weemaes C.A., Ludikhuyze L.R., Van Der Broeck I., Hendrickx M.E., 1999a. influence of pH, benzoic acid, glutathione, EDTA, 4-hexylresorcinol, and sodium chloride on the pressure inactivation kinetics of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3526-3530. In benmebarek hadjiraetchaher fella 2011.
- Whitaker J.R., 1995. Polyphenol oxidase. In: Wong, D.W.S. (Ed.) Food enzymes: Structure and Mechanism. New York: Chapman and Hall. 271-307. In benmebarek hadjiraetchaher fella 2011. In Bouchareb Nesrine et Taouti Messaouda 2013.
- Whitaker J.R., Lee C.Y., 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning *and Its Prevention*; American Chemical Society: Washington, DC, ACS Symposium Series; 27.
- Yong G., Leone C., Strothkamp K.G., 1990. *Agaricus bisporus* metapotyrosinase : preparation, characterization, and conversion to mixed-metal derivatives of the binuclear site. *Biochem.*, 29, 9684-9690. In benmebarek hadjiraetchaher fella 2011.
- Zawistowski J., Biliaderis C.G., Eskin N.A.M., 1991. Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. ROBINSON D.S.R and ESKIN N.A.M., Eds, Elsevier Appl. Sci., London, Chap. 6, 217-273. In Bechrair Fatma et Bechrair Assia 2010.

Zinkernagel V., 1986. Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von kopfsalat (*Lactucasativa*) gegen falschen Mehltan (*Bremialactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydseAktivitäten. *J. Phytopathol.* 115, 257-266. In benmebarekhadjiraetchaher fella 2011.