



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



**Université Amar Thelidji- Laghouat**

**FACULTE DE SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**MEMOIRE DE MASTER**

**Présentés par :**

**Elabed Ahmed Taki Eddine et Seksak Salem**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Biologie

**Option :** Biochimie des produits naturels

**Thème**

**Etude de l'effet de l'acide citrique sur l'inactivation  
thermique de l'activité monophénolique de *Terfezia leonis tul***

**Jury de soutenance :**

**Mr. Massaoudi Omar**

**M.A.B**

**Président**

**Mr. Laboukh Mourad**

**M.A.A**

**Examineur**

**Mr. Benaceur Farouk**

**M.A.B**

**Rapporteur**

**Mr. Gouzi Hicham**

**M.C.A**

**Co-rapporteur**

JUIN 2015

## Résumé

Ce travail rapporte une étude de l'effet de l'acide citrique sur les paramètres thermodynamiques du polyphénol oxydase Truffes des Désert (*Terfezia leonis*). L'étude de la cinétique de d'inhibition du polyphénol oxydase (PPO) de *Terfezia leonis* a été réalisée en présence de la L-Tyrosine comme substrat et l'acide citrique comme inhibiteur. Une valeur d' $IC_{50} = 7,5mM$  a été estimée. La cinétique de l'inactivation thermique de la tyrosinase de truffes en absence et en présence de l'acide citrique peut être correctement décrite par un modèle de premier ordre à des températures comprises entre 45°C et 65°C avec les différents temps de traitement. Les valeurs de l'énergie d'activation ( $E_a$ ) et  $Z_T$  sont égales, respectivement à 217 kJ/mol et 9,44°C en absence d'acide citrique et à 257KJ/mol et 7,96°C en présence de cet inhibiteur. La vitesse d'inactivation est accélérée d'un facteur de 425 fois dont la constante d'inactivation à 45°C est de 0,0018 min<sup>-1</sup> alors qu'à 65°C elle est de 0,7474 min<sup>-1</sup>. En effet l'acide citrique amplifie la vitesse d'inactivation d'un facteur d'environ 2,6.

**Mots clés :** *Tefezia leonis*, Polyphénol oxydase, Inhibition, Inactivation thermique, Brunissement enzymatique

## مُلخَص

يتمثل هذا العمل في دراسة تأثير حامض الستريك على المعاملات الحرارية من الكما الصحراوي وقد أجريت دراسة حركية تثبيط أوكسيداز (*Tefezia leonis*) البوليفينول أوكسيداز تيرفيزيا التيروزين بمثابة ركائز وحامض الستريك كمتبط. وقدرت قيمة من في وجود (PPO) البوليفينول مم. حركية تعطيل الحراري من الكما التيروزينيز في غياب وفي وجود حمض  $IC_{50} = 7.5$  الستريك يمكن وصفها بشكل كاف عن طريق نموذج الدرجة الأولى لدرجات حرارة تتراوح بين  $Z_T$  و  $E_a$  45 درجة مئوية و 65 درجة مئوية مع الأوقات معاملة مختلفة. قيم طاقة التنشيط متساوية على التوالي إلى 217 كيلو جول / مول، و 9.44 درجة مئوية في ظل غياب حمض مول و 7.96 درجة مئوية مع هذا حمض المانع هو تسارع معدل تثبيط / KJ الستريك و 257 هو 0.0018 دقيقة-1 عند 65 درجة مئوية ثم ° C بمعامل 425 مرة من أن تعطيل ثابتا عند 45 حمض الستريك يعزز تأثير معدل تثبيط عامل من نحو 2.6.En فإنه من 0.7474 دقيقة -1

الكلمات المفتاحية: *Tefezia leonis*، إنزيم متعدد الفينول، تثبيط، تعطيل حراري، التشويه الانزيمي

### ***Abstract***

This work brings back a study the effect of the citric acid on the thermodynamic parameters of the polyphenol oxydase Truffles of the Desert (*Terfezia leonis*).

The study of the kinetics of inhibition of the polyphenol oxydase (PO) of *Terfezia leonis* was carried out in the presence of L-Tyrosin like substrates and the citric acid like inhibitor. A value of  $IC_{50} = 7,5\text{mm}$  was estimated. The kinetics of the thermal inactivation of the truffle tyrosinase in absence and in the presence of the citric acid can be correctly described by a model of first order at temperatures ranging between  $45^{\circ}\text{C}$  and  $65^{\circ}\text{C}$  with the various processing times. The values of the energy of activation ( $E_a$ ) and  $Z_T$  are equal, respectively with  $217\text{ kJ/mol}$  and  $9.44^{\circ}\text{C}$  in absence of citric acid and with  $257\text{ KJ/mol}$  and  $7.96^{\circ}\text{C}$  with this inhibitor the acid the speed of inactivation is accelerated of a factor of 425 times whose constant of inactivation with  $45^{\circ}\text{C}$  is of  $0.0018\text{ min}^{-1}$  whereas with  $65^{\circ}\text{C}$  it is of  $0.7474\text{ min}^{-1}$ . Indeed the citric acid amplifies the speed of inactivation of a factor from approximately 2.6.

**Keywords:** *Tefezia leonis*, Polyphenol oxydase, inhibition, thermal inactivation, enzymatic browning

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes chers parents qu'Allah leur garde et protège.*

*A mes frères et sœurs Sans exception, chacun à leur manière*

*A toutes les personnes qui me connaissent et qui m'ont aidée de près ou de loin un peu ou beaucoup*

*A mon amie et binôme TAKI, celui qui a partagé avec moi son temps et ses efforts pour qu'on puisse mener à bien notre travail.*

*A mes amies MADANI, AZIZ, ABDALLAH,*

*A tout le groupe de l'option Biochimie ainsi qu'à toute promotion 2015*

*Sekşak salem*

## **Dédicace**

*Je dédie ce modeste travail*

*A mon père et ma mère, qui grâce à leur amour, leur douaa leur sacrifice durant toute ces années d'études et leur compréhension j'ai pu réaliser ce travail*

*A mes chers frères et mes sœurs.*

*A mes grands-pères et mes grands-mères*

*A mes cousines*

*Et à tout le reste de la famille*

*A mon binôme Sekşak salem*

*À mes très chers amis, AZIZ, ABDALLAH, MOHAMED, GAOUI,*

*MADANI, AMIN, DIZAIT, ADLAN*

*A tout le groupe de l'option Biochimie ainsi qu'à toute promotion  
2015*

*Elabed Ahmed takj eddine*

## **Remerciements**

*Le présent travail a été réalisé au sein du Laboratoire d'enzymologie à l'université Amar-Tledji .Laghouat*

*On tient à exprimer toute notre reconnaissance à messieurs Benaceur Farouk et Gouzi Hichem, enseignants-chercheurs au département de biologie à l'université de Laghouat, pour avoir accepté d'encadrer ce travail, pour leurs soutiens, encouragements et compréhension dans les moments difficiles de mémoire. On les remercie chaleureusement pour tous leurs efforts ainsi que leur dévouement dans le suivi de ce travail. Leur grande disponibilité nous a été très Bénéfique, aussi leur esprit de synthèse et leur érudition restent pour nous un exemple à suivre. On tient à témoigner de leur professionnalisme ainsi que de leur grande générosité scientifique et humaine.*

*On remercie Massaoudi Omar qui nous a fait l'honneur de présider ce mémoire. Nos gratitude se dirigent également vers Leboukh Mourad d'avoir accepté de prendre de son temps et de son énergie, pour juger notre travail scientifique.*

*«Nos remercions nos profs qu'ils nous ont fait partager leurs expériences, leurs temps, leurs conseils et informations durant notre cursus universitaire, particulièrement on cite :*

*Messieurs Quinten Mohamed, Guenane Hamid, Chaibi Rachid, Boubrima Youcef, laboukh Mourad et également Mesdames EL houiti Bourennane Fatiha, Benarous Kadidja»*

*Un grand merci pour les ingénieurs de laboratoire pour avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire pour ce travail ainsi que pour leur compréhension et soutien. On adresse, enfin, nos plus profondes gratitudes à nos familles pour leur soutien indéfectible et leur confiance en toutes circonstances au cours de ces cinq dernières années.*

*Merci à tous et à toutes.*

# *Tableau de Matière*

Liste d'abréviation .....	I
Liste des tableaux .....	II
Liste des figures .....	III
Introduction.....	2

## **Partie bibliographique**

<b>1 Polyphénol oxydase .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Historique .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Définition, classification et nomenclature .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1 Définition .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2 Classification et nomenclature .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.3 Distribution, localisation subcellulaire et rôle physiologique .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.3.1 Distribution et localisation subcellulaire .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.3.2 Rôle physiologique .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.4 Structure moléculaire et site actif .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.5 Le Mécanisme réactionnel .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.6 PH et Température optimale .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.7 Spécificité de la PPO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.8 Aspects cinétiques et thermodynamiques de l'inactivation thermique de la PPO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.9 Les effecteurs.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.9.1 Les activateurs .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.9.2 Les inhibiteurs .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.9.2.1 L'Acide citrique .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.10 Applications de la PPO .....</b>	<b>23</b>

## Partie Matériels et Méthodes

<b>2. Matériel et Méthodes</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 Matériel végétal</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2 Méthodes</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.1 Extraction du polyphénol oxydase de truffes de désert</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.2 Mesure de l'activité de PPO</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2.3 Détermination de l'IC 50 de l'acide citrique</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2.3.1 Etude de la stabilité thermique de l'activité crésolase de la PPO</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2.4 Inactivation thermique de la PPO de <i>Terfezia leonis</i></b> .....	<b>28</b>
<b>2.2.4.1 Analyse cinétique</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2.4.2 Analyse thermodynamique</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2.5 Analyse des données cinétiques</b> .....	<b>30</b>

## Partie Résultats et Discussion

<b>3. Résultats et discussion</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1 Extraction et stabilité de la PPO de truffes des déserts</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2 Détermination de l'IC50 de l'acide citrique</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3 Etude de la stabilité thermique de l'activité crésolase de la PPO</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4 Inactivation thermique de la PPO de <i>Terfezia leonis</i></b> .....	<b>34</b>
<b>3.5 Cinétique de l'inactivation thermique</b> .....	<b>37</b>
<b>3.6 Aspect thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO de <i>Terfezia leonis</i></b> .....	<b>41</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>44</b>
<b>Références Bibliographiques</b> .....	<b>46</b>

## *Liste d'abréviations*

<b>%</b>	: Pourcentage
<b>[I]</b>	: concentration d'inhibiteur
<b>°C</b>	: Degré Celsius
<b>°K</b>	: Degré kelvin
<b>A</b>	: Constante d'Arrhenius
<b>Å</b>	: angström
<b>A<sub>R</sub></b>	: Activité enzymatique résiduelle
<b>Cys</b>	: Cystéine
<b>D</b>	: temps de réduction décimale
<b>DIECA</b>	: diethyldithiocarbamate
<b>DOPA</b>	: dihydroxy phénylalanine
<b>E<sub>a</sub></b>	: énergies d'activation
<b>EC</b>	: Enzyme commission
<b>EDTA</b>	: éthylènediaminetétraacétate
<b>g</b>	: gramme
<b>GRAS</b>	: <i>Generally Recognized As Safe</i>
<b>His</b>	: histidine
<b>IC<sub>50</sub></b>	: concentration d'inhibiteur diminuant l'activité enzymatique initiale à 50%.
<b>IUB</b>	: Union Internationale de la Biochimie
<b>k</b>	: Constante de vitesse d'inactivation
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>K<sub>I</sub></b>	: constante de dissociation du complexe EI
<b>K<sub>IS</sub></b>	: constante de dissociation du complexe
<b>kJ</b>	: Kilojoule
<b>K<sub>m</sub></b>	: Constante ce Michaelis

<b>Min</b>	: Minute
<b>mM</b>	: Millimole
<b>mol</b>	: Mole
<b>PPO</b>	: Polyphénol oxydase
<b>R</b>	: Constante des gaz parfaits ( $8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )
<b>S</b>	: Seconde
<b>SDS</b>	: Sodium dodécyl sulfate
<b>T</b>	: température
<b>t<sub>1/2</sub></b>	: Temps de demi-vie
<b>V<sub>max</sub></b>	: Vitesse maximale
<b>Z<sub>T</sub></b>	: Température de réduction décimale
<b>ΔG</b>	: l'énergie libre de Gibbs
<b>ΔH</b>	: Enthalpie d'activation
<b>ΔS</b>	: Entropie d'activation

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 01.</b>	Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale .....	14
<b>Tableau 02.</b>	Les paramètres cinétiques de l'inactivation thermique des polyphénols oxydases obtenues à partir de quelques sources végétales.....	19
<b>Tableau 03.</b>	Les Valeurs d'IC <sub>50</sub> de quelques inhibiteurs de la PPO .....	22
<b>Tableau 04.</b>	Paramètres cinétiques de l'inactivation de l'activité de la PPO des truffes ( <i>Terfezia leonis</i> ) en absence d'acide citrique.....	38
<b>Tableau 05.</b>	Paramètres cinétiques de l'inactivation de l'activité de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> en présence d'acide citrique.....	39
<b>Tableau 06.</b>	paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO de truffes ( <i>Terfezia leonis</i> ).....	41
<b>Tableau 07.</b>	paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO des truffes ( <i>Terfezia leonis</i> ) en présence de l'acide citrique [7,5mM].....	42

## *Listes des figures*

<b>Figure 01.</b>	Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases.....	6
<b>Figure 02.</b>	Diffraction aux rayons X de la PPO de <i>V. vinifera</i> . (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, le deux $\beta$ -feuilles(Bleu), les quatre hélices(Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de $C\alpha$ de <i>V. vinifera</i> PPO (bleu) avec ceux de la PPO de la patate douce (jaune) (18) et <i>Neurospora crassa</i> (vert).....	9
<b>Figure 03.</b>	Site actif de la PPO de <i>V. vinifera</i> PPO (bleu) et la patate douce (jaune) et <i>N. crassa</i> enzyme (vert) (a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant Caver) Détail sur la coordination des chaînes His avec les deux atomes de cuivres , la distance internucléaire était :C u-Cu, 4,17 Å °; CuA à H87,2.07 °; à H108 ,2.16 °; H117, 2.35 °; CuB à H239, 2.04Å °;à H243, 2.15 Å °; à H272, 2.02Å °.....	9
<b>Figure 04.</b>	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).....	10
<b>Figure 05.</b>	Le mécanisme catalytique global d'oxydations pour la PPO (a) de monophénol et (b) de diphénol (Lerch., 1995).....	12
<b>Figure 06.</b>	Structure de quelques substrats phénoliques (Majid et <i>al.</i> , 2004).....	16
<b>Figure 07.</b>	<i>Terfezia Leonis Tul</i> d'Algérie (wilaya de Laghouat).....	26
<b>Figure 08.</b>	Protocole d'extraction du polyphénol oxydase à partir des truffes de désert ( <i>Terfezia Leonis Tul</i> ).....	27
<b>Figure 09.</b>	Effet de la concentration de l'acide citrique sur la l'oxydation de L-Tyrosine par la PPO de <i>Terfezia leonis</i> .....	33
<b>Figure 10.</b>	Stabilité thermique de l'activité monophénolase de l'extrait brut de la tyrosinase de <i>Terfezia léonis Tul</i> .....	34
<b>Figure 11.</b>	Effet de la température sur la stabilité de l'activité enzymatique (a) en absence et (b) en présence d'acide citrique.....	37
<b>Figure 12.</b>	Cinétique d'inactivation thermique de la PPO (a) en absence et (b) en présence d'acide citrique.....	38
<b>Figure 13.</b>	Représentation graphique d'Arrhenius relatif à la variation de la vitesse d'inactivation thermique de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> .....	39
<b>Figure 14.</b>	Effet de la température sur la valeur-D de l'inactivation de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> .....	40

# *Introduction*

## ***Introduction***

Le polyphénol oxydase (PPO) est une métalloenzyme, capable de produire des o-quinones en présence des composés phénoliques. En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme catalyse deux réactions bien distinctes : l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2), qui se polymérisent pour former un pigment brun, rouge ou noir (Corzo-Martínez et *al.*, 2012., Rui et *al.*,2015).

Les PPOs ont été très bien étudiées à partir de diverses sources telles que la patate douce (Rui et *al.*,2015 Guo-Liang et *al.*,2015), la pêche (José et *al.*,2014), les champignons (Papa et *al.*, 1994, Cheng et *al.*, 2013), l'artichaut (Quarta et *al.*, 2013), la cerise (Kumar et *al.*, 2008), la poire (kim et *al.*,2005). Par contre, peu d'études ont été rapportées sur la PPO des truffes (Zarivi et *al.*, 2003, Gouzi et *al.*, 2013).

Par rapport à la plus part des fruits et légumes, les truffes ont une durée de conservation très courte. Elles perdent leurs valeurs commerciales et leurs qualités nutritionnelles en quelques jours en raison de plusieurs facteurs y notamment le brunissement (Njagi et *al.*, 2010, Aldo et *al.*, 2011). La prévention de cette réaction constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant la conservation des produits alimentaires (Guo Liang., 2015),de même, visant un tel but préventif, nous proposons l'étude de l'effet de l'acide citrique sur l'inactivation thermique de la tyrosinase de truffes du désert, au fait, il est connu que l'inhibition ou même l'inactivation thermique peuvent contrer le brunissement enzymatique mais récemment on s'est rendu compte que la combinaison entre ces deux facteurs peut être à la fois utile et pratique en offrant plus d'efficacité et rentabilité (Wei et *al.*, 2013, Cheng et *al.*, 2013).

Ainsi, notre travail présenté en quatre chapitres est séquencé comme suit : Le premier chapitre concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur l'enzyme « PPO ». Dans le deuxième chapitre, nous mettrons en évidences les procédures expérimentales.

Le Troisième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire. Nous présenterons les résultats de l'inhibition par l'acide citrique et son effet sur les paramétrés cinétiques thermodynamique de l'inactivation thermique.

Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO de truffes, sont regroupées dans le dernier chapitre.

# *Etude Bibliographique*

## 1 Polyphénol oxydase

### 1.1 Historique

La polyphénol oxydase a été découvert 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 brun dans les plantes (Whitaker et Lee., 1995).

Bertrand (1896) à son tour a mis également en évidence la présence d'une enzyme dans la betterave, le dahlia et certains champignons. Bach et Chodat. (1904) ont émis l'hypothèse que le brunissement des tissus végétaux coupés ou broyés était dû à l'action d'une oxygénase qui catalyserait la peroxydation des o-diphénols. Selon ces auteurs, le peroxyde ainsi formé serait détruit par la peroxydase, conduisant à la formation des composés quinoniques.

Le polyphénol oxydase a été extrait pour la première fois simultanément par Kubowitz (1938) à partir des pommes de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir d'*Agaricus bisporus*.

C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, 1983 ; Jolivet et al., 1998). Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte il y'a bien longtemps, ce n'est qu'en 1998 que la première structure cristallographique de la PPO a été rapportée et c'était pour l'enzyme de *Impomea batatas* (Klabund et al., 1998). Et depuis, la PPO a suscité plus d'attention et plusieurs études sérieuses ont été, portées d'une part sur la compréhension de mécanisme réactionnel et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans le brunissement enzymatique (Seo et al., 2003 ; Halalouili et al., 2006 ; Virador et al., 2010 ; Cheng et al., 2013 ; José et al., 2014).

### 1.2 Définition, classification et nomenclature

#### 1.2.1 Définition

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

#### 1.2.2 Classification et nomenclature

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

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

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

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

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

#### **Activité monophénolase (EC 1.14.18.1)**

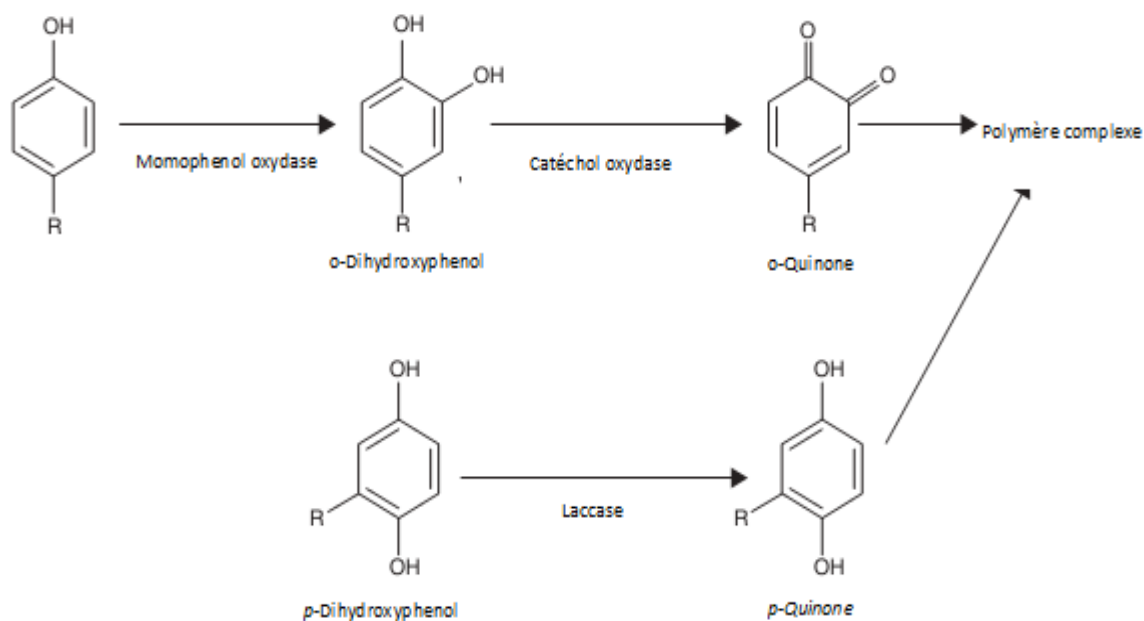
Les monophénols oxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (Figure 1). Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénol oxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. (Mayer et al., 2006, Martinez et al., 2012).

#### **Activité catéchol oxydase (EC 1.10.3.1)**

La laccase se caractérise par son activité p-diphénol oxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénol oxydase (Figure 1). L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (Reinhammar & Malmström., 1981 ; Giardina et al., 2010).

Ces enzymes ont été trouvés dans des différentes espèces de plantes, d'insectes et des bactéries (Loera et al., 2006;. Madhavi & Lele., 2009). Cependant, la majorité des laccases décrites dans la littérature ont été isolées à partir des champignons supérieurs, Les laccases fongiques les plus connues sont des enzymes extracellulaires, chez les végétaux supérieures,

elles assurent trois rôles important incluant la formation de pigment, la dégradation de la lignine et de désintoxication (Loera *et al.*, 2006).



**Figure 1** : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases.

### 1.2.3 Distribution, localisation subcellulaire et rôle physiologique

#### 1.2.3.1 Distribution et localisation subcellulaire

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes et la proportion de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble peuvent être considérablement inégales. (Mayer *et al.*, 2006). L'activité de PPO est très faible dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer., 1979). Beaucoup des chercheurs se sont intéressés aux PPO des diverses sources telles que : les truffes (Miranda *et al.*,1996 ; Perez-Gilabert *et al.*,2001 ;Zarivi *et al.*,2003 ; Gouzi *et al.*,2013), les champignons (Papa *et al.*,1994 , Cheng *et al.*,2013), la banane ( Sojo *et al.*, 1998, Ünal.,2007), l'artichaut (Ziyan & Pekyardimc.,2003 ; Quarta *et al.*,2013), la poire (Ziyan & Pekyardimci.,2004 ; Kim *et al.*,2000), la pêche (José *et al.*,2014), l'abricot ( Tony *et al.*,1999), les feuilles de Tabac (Shi *et al.*,2002), la cerise (Kumar *et al.*,2008), et la pomme (Yemenicioglu *et al.*, 1997).

La PPO se trouve dans une variété des organites subcellulaires telles que les peroxysomes, les mitochondries (Martinez *et al.*, 1989., Webb *et al.*,2013).Chez les plantes saines, la PPO est

majoritairement présente dans les plastides., alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Whitaker et Lee., 1995., Webb et *al.*,2013).

### **1.2.3.2 Rôle physiologique :**

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

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

La PPO catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel., 1986), et se polymérisent ensuite, pour former des polymères bruns insolubles construisant une barrière, qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante, grâce à leurs propriétés anti-microbiennes, (Zawistowski et *al.*, 1991). Selon Craft et Audia. (1962), ces barrières de protection ont été observées dans les patates douces, les carottes, les betteraves, les courges, les navets et les pommes de terre.

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

### **1.2.4 Structure moléculaire et site actif**

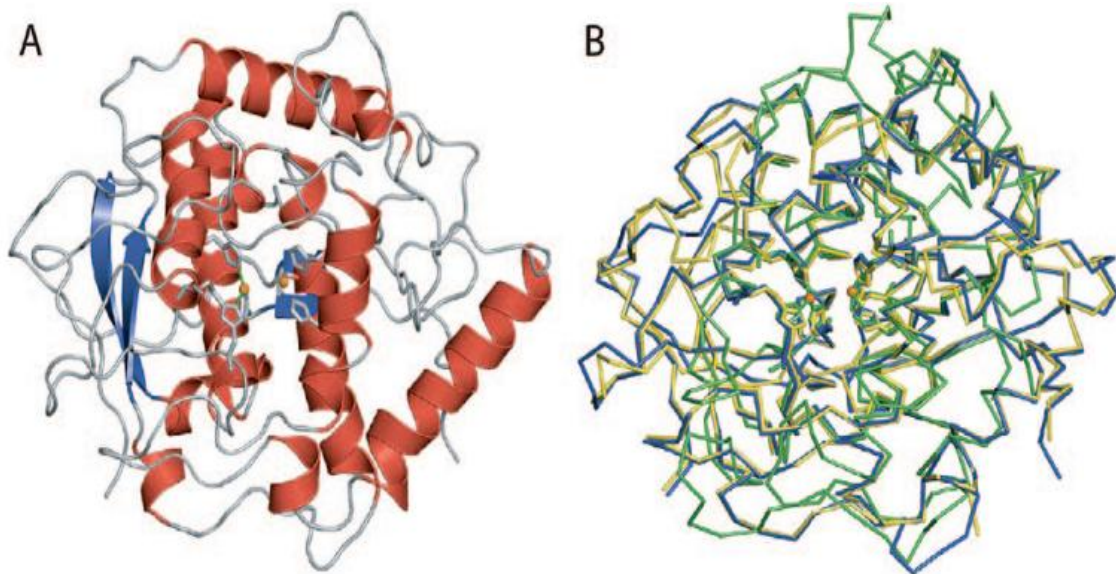
En général, les poids moléculaire de PPO varie considérablement d'une source à une autre, les PPO de nombreuse sources végétales ont des masses moléculaires de 32 à plus de 200 kDa essentiellement dans l'intervalle de 35 à 70 kDa (Van Gelder et *al.*, 1997, Klabunde., 1998 ;

Yang et al., 2000, Virador et al., 2010). La PPO est une métalloenzyme contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique, ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la cérulo-plasmine (Yang et al., 2000).

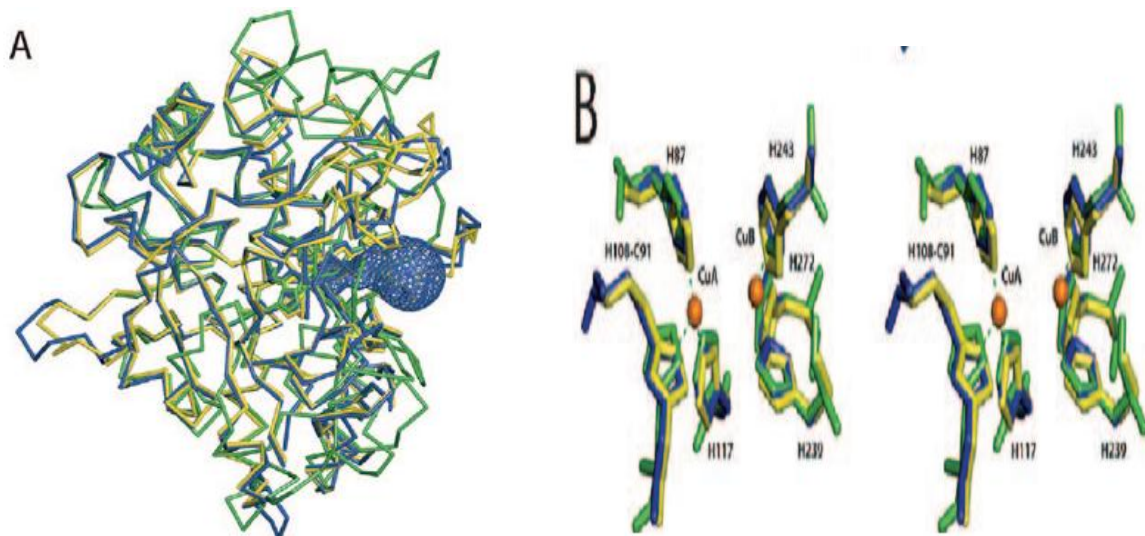
Garcia-Borron & Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices  $\alpha$  et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (Lerch, 1982). Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomea batatas*) (Klabunde et al., 1998). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des o-diphénols et permet ainsi, un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox. Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (Mayer., 1987).

La structure cristalline de la PPO de *Vitis vinifera* a été récemment résolu (Virador et al., 2010) , sa similitude avec les structures cristallines de la catéchol-oxydase de *Ipomoea batatas* (Klabunde et al., 1998) et l'hémocyanine de *Enter octopus dofleini* (Cuff., 1998) soutient d'avantage la théorie d'un mécanisme catalytique identique entre ces dernières enzymes.

La PPO de *Vitis vinifera* est une protéine monomérique de 38,4 kDa (figure 2). La structure secondaire est essentiellement  $\alpha$ - hélicoïdal avec un noyau formé de quatre  $\alpha$ - hélices ;  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 12$ , et  $\alpha 14$ , le centre catalytique formé de deux atomes du cuivre est entouré par les hélices  $\alpha 3$  et  $\alpha 9$ , et de plusieurs coudes  $\beta$ . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 26 et Cys 25–Cys 88) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle. La paire de cuivre (CuA et CuB) (figure 3) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices  $\alpha$ . Le CuA est coordonné par l'His 87, His 108, et l'His 117. L'His 87 est situé au milieu de l'hélice  $\alpha 4$ , tandis que l'His 108 et His 117, sont au début et au milieu de l'hélice  $\alpha 5$ . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 239, His 243 et l'His 272. Ces résidus d'histidines, sont localisés au début et à la fin de l'hélice 12 et 14, respectivement. H108, se lie de façon covalente au Cys 91. (Virador et al., 2010).



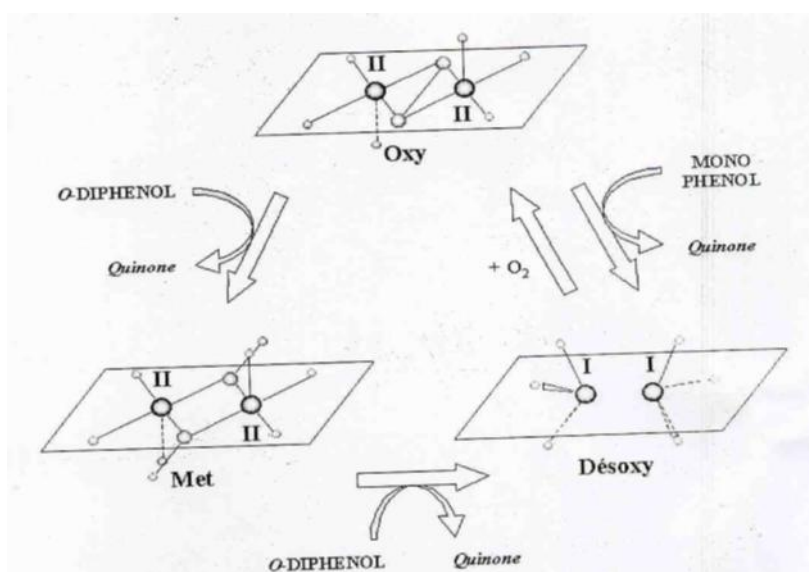
**Figure 2 :** Diffraction aux rayons X de la PPO de *V. vinifera*. (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, le deux  $\beta$ -feuilles(Bleu), les quatre hélices(Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de Ca de *V. vinifera* PPO (bleu) avec ceux de la PPO de la patate douce (jaune) (18) et *Neurospora crassa* (vert).



**Figure 3:** Site actif de la PPO de *V. vinifera* PPO (bleu) et la patate douce (jaune) et *N. crassa* enzyme (vert) (a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant Caver) Détail sur la coordination des chaînes His avec les deux atomes de cuivres, la distance internucléaire était :C u-Cu, 4,17 Å ; CuA à H87, 2,07 Å ; à H108, 2,16 Å ; H117, 2,35 Å ; CuB à H239, 2,04 Å ; à H243, 2,15 Å ; à H272, 2,02 Å .

### 1.2.5 Le Mécanisme réactionnel

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les PPOs 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. La forme *Met* représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphénoles en quinones. Le site actif (figure 4) 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-diphénols. 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*). Ces phénomènes sont liés à des légères modifications de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme au cours de la catalyse (Eicken et *al.*, 1999).



**Figure 4 :** Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO (*Met*, *Deoxy*, et *Oxy* PPO) d'après Van Gelder et *al* (1997).

Le modèle des mécanismes réactionnels des PPOs incluant l'activité catécholase (Figure 5, cycle A) et crésolase (Figure 5, cycle B) est basé sur des informations liées à la structure électronique et géométrique du complexe de cuivre bi-nucléaire, ainsi que, sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (Siegbahn, 2003 ; Lerch, 1995). La forme oxy peut réagir avec les mono- et les diphénols tandis que la forme met ne peut réagir qu'avec les diphénols (Claus et Decker, 2006). Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des o-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (Rodriguez-Lopez et *al.*, 1992).

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

Dans l'activité crésolase, l' $O_2$  est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du deoxy-PPO pour donner l'oxy-PPO dans laquelle l' $O_2$  aux caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'oxy-PPO, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau et l'intermédiaire conduisant à la formation de O-quinone (Solomon et *al.*, 1996., 2001 ; Fenoil et *al.*, 2004 ; Whitaker, 1995; Mayer & Harel., 1991 ; Siegbahn, 2004; Sánchez-Ferrer et *al.*, 1995 ; Jolivet et *al.*, 1998).

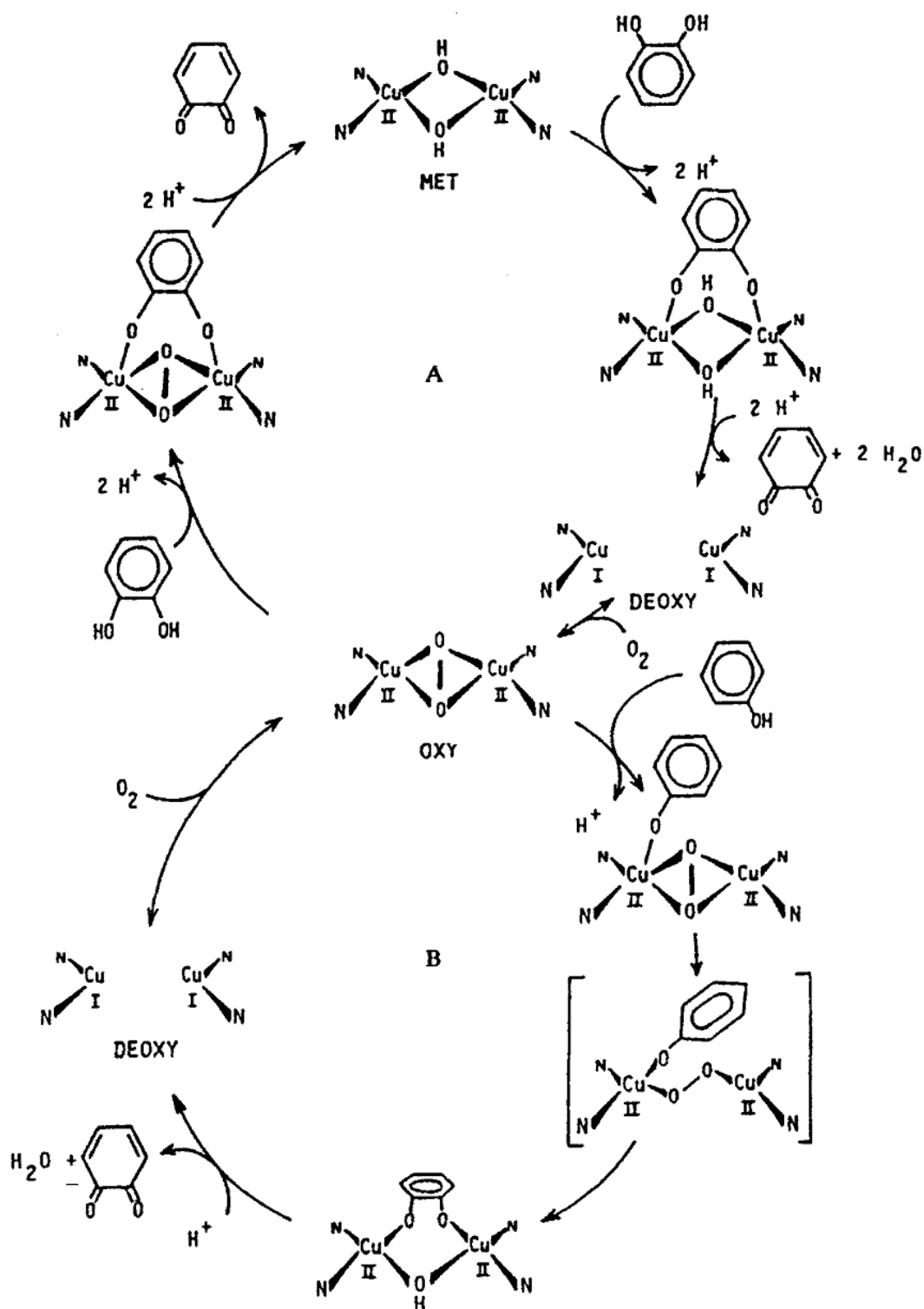


Figure 5 : Le mécanisme catalytique global d'oxydations pour la PPO

(a) de monophénol et (b) de diphénol (Lerch., 1995).

### 1.2.6 PH et Température optimale

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

La nature du substrat utilisé dans le dosage de l'activité est un autre facteur qui a une influence significative sur le pH optimum de l'enzyme, par exemple, la PPO de persil (Yusuf & Mustafa et *al.*, 2012) présente une activité maximale à pH 8,5 avec le pyrogallol, mais un pH de 4 avec le 4 méthylcatéchol (Tableau 1). Les valeurs de pH optimum en présence de même substrat vis à vis des PPO d'origine différente sont également variables dont en présence de L dopa, la valeur de pH optimum pour le persil égale à 4,5 (Doğru & Erat et *al.*, 2012) tandis que pour celle de chèvrefeuille du Japon égale à 7,5. (Goyeneche et *al.*, 2013). Les valeurs de pH optimums de la PPO est également exposé à des changements lorsqu'il est testé en présence d'un détergent, le comportement de la PPO de pomme en fonction de pH est modifié en présence de SDS, quel que soit le substrat, l'activité de la PPO de pomme est inhibée à un pH acide et activé à un pH supérieur à 5,0 et ceci en présence de 3,5 mM SDS (Marques et *al.*, 1995).

La température est un autre facteur très important influençant sur l'activité enzymatique, la PPO n'appartient pas aux enzymes extrêmement stable à la chaleur. Les traitements thermiques de courtes durées de l'enzyme dans les tissus ou en solution, à des températures de 70 à 90 ° C sont, dans la plupart des cas, suffisants pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction de catalyseur. L'exposition à des températures inférieures à zéro peuvent également affecter l'activité enzymatique (Queiroz et *al.*, 2008). Chutintrasri & Noomhorm (2006), ont montré que l'activité PPO d'ananas, a été réduite d'environ 60% après une exposition à 40-60 °C, pendant 30 min. Les valeurs de la température optimale de la PPO dépendent notamment de substrat (Tableau 01), du pH optimum, et également de de la source de l'enzyme. Elles varient entre 20 et 65°C. Les résultats ainsi récapitulés dans le Tableau 01 montrent, que pour une même enzyme, la température optimale peut varier en fonction de substrat, par exemple pour la PPO de radis (Goyeneche et *al.* 2013), des valeurs de températures optimales égales à 40 °C et 20°C, en présence de catéchol et pyrogallol, respectivement, ont été obtenus. Pour deux PPO d'origine différente la température optimale change vis-à-vis de même substrat par exemple en présence de L-tyrosine la PPO de Chien-rose présente une température optimale égale à 65°C. (Sakiroglu et *al.*, 1996), tandis que pour la PPO de cerise une valeur de 47 °C a été estimée (Kumar et *al.*, 2008).

**Tableau 01** : Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale.

Source	Substrat	pH optimum	Température optimale	Référence bibliographique
<b>Chien-rose</b> ( <i>Rosa dumalis</i> Rechst)	Catéchol	8,5	25	Sakiroglu et al.,(1996)
	4-méthylcatéchol	8,5	20	
	Pyrogallol	7	15	
	L-Tyrosine	7	65	
	P-cresol	5	60	
<b>Murier blanc</b> ( <i>Morus alba</i> L.)	Pyrogallol	7,5	20	Arslan et al.,(2004)
<b>Fraise</b> <i>Fragariaananassa</i>	Catéchol	5	25	Dalmadi et al.,(2006)
<b>Champignon de Paris</b> ( <i>Agaricusbisporus</i> )	Catéchol	7	30	Gouzi et Benmansour (2007)
	Pyrogallol	7,6	30	
<b>Banane</b> ( <i>Musa cavendishii</i> )	Catéchol	7	30	Ünal et al.,(2007)
	Catéchol	7	40	
<b>Cerise</b> ( <i>Malpighiaglabra</i> )	L-Tyrosine	5,2	47	Kumar et al., (2008)
	Pyrogallol	8	30	
<b>Blé</b> ( <i>Triticumaestivum</i> )	Catéchol	4,5	40	Erat et al,(2010)
	Catéchin	5	35	
	pyrogallol	5	30	
	L-dopa	5	40	
	Dopamine	4,5	35	
	4-méthylcatéchol	5	35	
<b>Persil</b> ( <i>Petroselinumcrispum</i> )	Catéchol	4	40	Doğru & Erat., (2012)
	4-Methylcatechol	4	40	
	Pyrogallol	8,5	35	
	L-Dopa	4,5	45	
	Dopamine	8	45	
	Catéchin	4	35	
<b>Radis</b> ( <i>Raphanussativus</i> )	Catéchol	7	40	Goyeneche et al. ,(2013)
	Pyrogallol	7	20	
<b>Chèvrefeuille</b> ( <i>Lonicerajaponica</i> )	L-Dopa	7,5	25	Na-Na et al.,(2013)

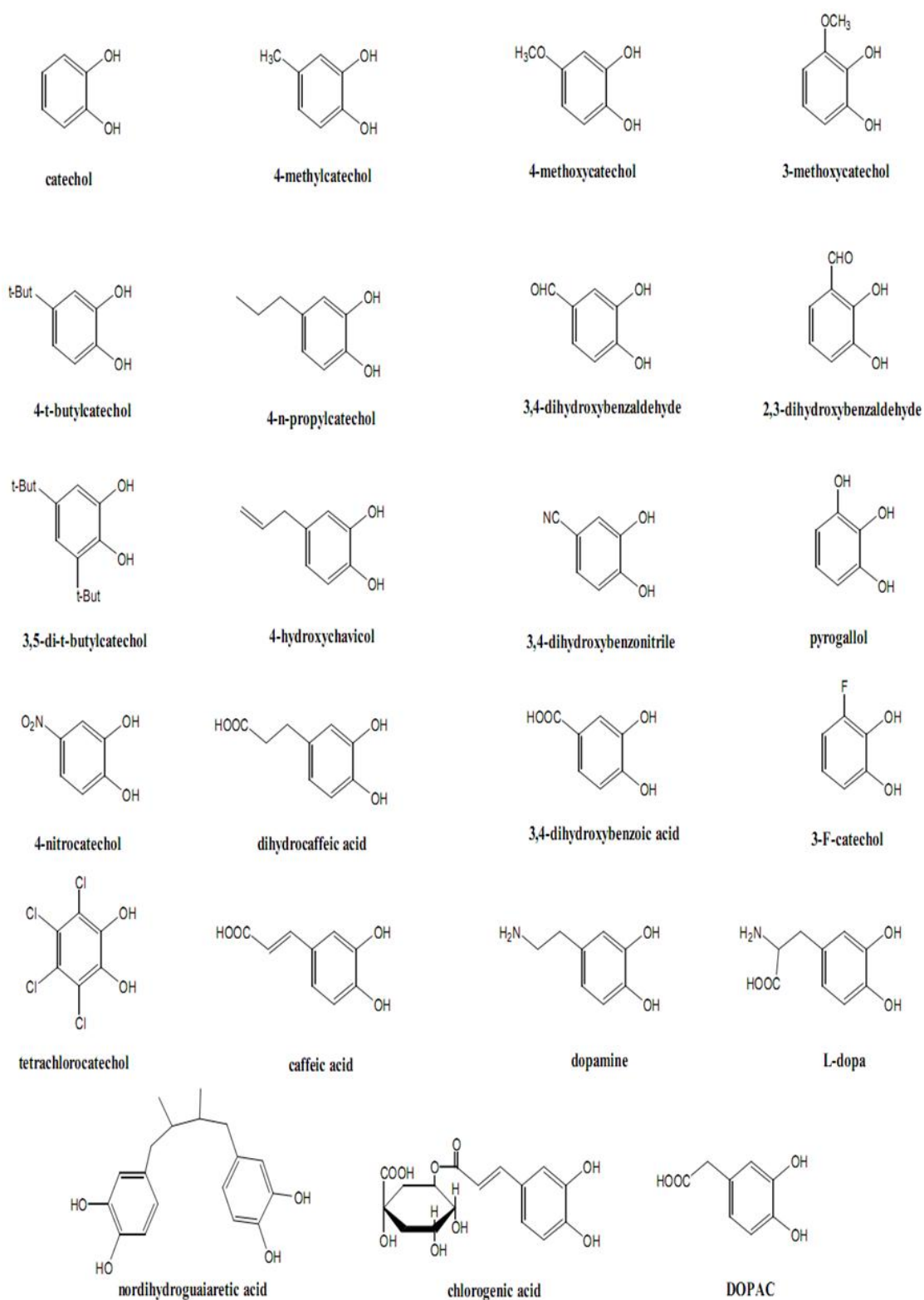
### 1.2.7 Spécificité de la PPO

Les composés phénoliques sont des substances naturelles qui contribuent à la richesse sensorielle (couleur, goût, arôme et texture) associée à la qualité des fruits ,toutefois, les PPO des plantes présentent grandes spécificités vis-à-vis de ces composés et sont capables d'oxyder une variété de mono, di ou des polyphénols. (Es-Safi *et al.*, 2003).

Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphénol oxydase (catécholase) peuvent catalysées une grande variété des substrats (Whitaker *al.*, 1995).

L'activité diphénolase du PPO est généralement la plus répandue dans les plante, quand les deux activités monophénolase et diphénolase sont présentes, le rapport de l'activité monophénolase à celle de l'activité diphenolase varie de 1:10 à 1:40 selon les sources végétales (Perez *et al.*, 2001.,Mesquita & Queiroz.,2013).

La PPO présente différentes affinités vis-à-vis du même substrat selon la source de son obtention (l'espèce, le genre, le cultivar, ou également le tissus) (Zawistowski *et al.*, 1991). Le type et la position des substituants présents sur les mono- et les o-dihydroxy phénols sont également des causes importantes déterminant la réactivité du substrat. Pour les mêmes substrats, des grandes différences dans les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) sont obtenues selon la source et la pureté de l'enzyme (Zawistowski *et al.*, 1991). Par exemple, la substitution en position 3 (exemple : le 3-méthyl catéchol) cause une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat à cause de l'encombrement stérique. La présence d'un groupement donneur d'électron en position 4 (exemple : le 4-méthyl catéchol ou l'acide chlorogénique) ou d'un groupement attracteur d'électron (exemple : le 4-nitrocatechol ou le 3,4-dihydroxy acide benzoïque) augmente ou réduit la réactivité du substrat, respectivement (Vámos-Vigyázó., 1981). La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine, et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels de la PPO, trouvés dans les fruits et légumes (Zawistowski *et al.*, 1991,Vámos-Vigyázó.,1981,Trebst & Depka .,1995). Ces composés phénoliques sont des substrats primaires de PPO (Figure 06). Les types et les concentrations relatives des phénols naturels varient considérablement pour les différentes sources végétales. Par exemple, la catéchine est un composé phénolique majeur trouvé dans le thé (Ullah., 1991) et le persil (Doğru & Erat., 2012), tandis que l'acide chlorogénique est présent dans le radis (Goyeneche *et al.*, 2013),et l'aubergine (Todaro *et al.*.,2011). (Yang *et al.* 2000) ainsi que (Sojo *et al.* 1998), ont rapporté que le brunissement enzymatique dans la pulpe de banane est causé par l'oxydation du composé phénolique, « la dopamine », en présence de substrats endogènes.



**Figure 06** : Structure de quelques substrats phénoliques (Majid *et al.*, 2004).

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

Le traitement thermique est généralement considéré comme la méthode la plus efficace pour inactiver la PPO, inhibant entre autres le brunissement enzymatique (Wei *et al.*, 2013).

Les traitement thermiques peuvent, toutefois, être responsable des pertes de la qualité sensorielle et nutritionnelle dans les fruits et légumes (Gnangui *et al.*, 2009; Gouzi *et al.*, 2012). Une approche pour optimiser le traitement thermique de fruits et légumes afin de maximiser la qualité est de développer un modèle intégrant plusieurs paramètres de la cinétique d'inactivation des enzymes pour prédire les changements ultérieurs de la qualité durant le traitement et le stockage.

L'inactivation thermique des enzymes est souvent décrite en fonction des paramètres cinétiques comme le temps de réduction décimale (D), la constante d'inactivation (k), la valeurs (Z), les énergies d'activation (Ea) et les paramètres thermodynamiques  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$ . La valeur D désigne le temps nécessaire pour réduire l'activité de la valeur initiale de 90%, la valeur  $Z_T$  est la température nécessaire pour réduire la valeur de D par une unité de log (paramètre de sensibilité à la température), obtenue en traçant les valeurs de Log D en fonction des valeurs de températures correspondantes (Gouzi *et al.*, 2012, Cheng *et al.*, 2013).

La cause la plus commune de l'inactivation par la chaleur des enzymes est la perte de la conformation native (déploiement de la structure tertiaire de la protéine active à un désordre polypeptide), un processus identifié comme une thermodénaturation, qui a lieu à la suite de la mobilité moléculaire accrue à des températures élevées (Klibanov., 1983). De même, ces paramètres thermodynamiques d'inactivation sont des indicateurs utiles de toute stabilisation ou déstabilisation secondaire (Gouzi *et al.*, 2012). Plusieurs rapports ont été portés sur les paramètres cinétiques d'inactivation thermique de la PPO de différentes sources végétales, un aperçu général est donné dans le Tableau 02. Les valeur de temps de réduction décimale (D) et celui de demi vie  $t_{1/2}$  sont des paramètres important caractérisent la stabilité de l'enzyme et à l'inverse de coefficients d'inactivation (k), ils sont inversement proportionnels à l'augmentation de la température, par exemple pour la PPO de champignon de Paris des valeurs de D ,  $t_{1/2}$  et k égales à 112 min et 33,8 min,  $0,021 \text{ min}^{-1}$ , respectivement à  $55^\circ\text{C}$  ont été estimées tandis que à  $75^\circ\text{C}$ , des valeurs de 1,2 min et 0,36 min,  $1,929 \text{ min}^{-1}$  respectivement ont été trouvées (Cheng *et al.*, 2013).

Le paramètre  $Z_t$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) est également utile pour apprécier la sensibilité de l'enzyme, plus la valeur est grande moins la PPO est d'autant sensible au traitement thermique (Cheng et *al.*, 2013). On remarque que les valeurs de  $Z_t$  varient entre  $6,6^{\circ}\text{C}$  et  $14,2^{\circ}\text{C}$  (Tableau 02) indiquant que la PPO de banane est l'enzyme la plus sensible, ceci est confirmé par les petites et les grandes valeurs de coefficient d'inactivation ( $k$ ) et de  $D$ , respectivement.

L'énergie d'activation est un autre paramètre très important reflétant le taux de l'énergie nécessaire pour assurer la stabilité de l'enzyme plus elle est grande plus l'enzyme est stable et vice versa (Gouzi et *al.*, 2012). Une gamme des valeurs comprise entre  $23,7$  kJ/mol et  $255$  kJ/mol a été rapportée pour les différentes PPO d'origine végétale.

**Tableau 02** : Les paramètres cinétique de l'inactivation thermique des polyphénols oxydases obtenues à partir de quelques sources végétales

Source de la PPO	Substrat	pH	Température (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	D (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	Z (°C)	Ea (kJ/mol)	Références bibliographiques
<b>Champignon de paris</b> ( <i>Agaricus bisporus</i> )	Pyrocatéchol	7	55	0,021	112	33,8	10,3	214	Cheng et al. (2013)
			60	0,096	23,9	7,22			
			65	0,381	6	1,82			
			70	0,838	2,7	0,83			
			75	1,929	1,2	0,36			
<b>Pomme de terre douce</b> ( <i>Dioscorea cayenensis-rotundata cv Longbô</i> )	L-dopamine	6.6	50	0.025	92.12	27.72	29.41	67.67	Gnangui et al. (2009)
			55	0.028	82.25	24.75			
			60	0.046	50.07	15.06			
			65	0.057	40.40	12.16			
<b>Ananas</b> ( <i>Ananas comosus</i> )	Catéchol	6.5	50	0.0062	146.8	111.79	104.2	23.7	Chutintrasri & Noomhorm. (2006)
			55	0.0074	142.4	93.66			
			60	0.0087	121.9	79.67			
			65	0.0098	97.4	70.72			
<b>Champignon</b> ( <i>Agaricus bisporus</i> )	L-tyrosine	6.5	50	0.019	121.18	35.83	6.6	173.83	McCord & Kilara (1983)
			55	0.054	42.64	12.91			
			60	0.134	17.18	5.16			
<b>Champignon</b> ( <i>Agaricus bisporus</i> )	Catéchol	7	45	0.004690	491.06	147.7925	10.1	208.37	Gouzi et al. (2012)
			50	0.011785	195.41	58.816			
			55	0.019586	117.58	35.3899			
			60	0.062547	36.82	11.082			
			65	0.568642	4.05	1.2189			
			70	1.218518	1.89	0.5688			
			73	1.799218	1.28	0.3852			
<b>Raisin blanc</b> ( <i>Vitis Vinifera sp. Sativa</i> )	Catéchol	5	55	0.0172	133.33	40.29	9.66	225.43	Rapeanu et al. (2006)
			60	0.0559	41.16	12.39			
			65	0.200	11.47	3.46			
<b>Banane</b> ( <i>Musa cavendishii</i> )	Catéchol	7	60	0.81 10 <sup>-2</sup>	286	85.6	14.2	155	Unal. (2007)
			65	1.27 10 <sup>-2</sup>	181	54.6			

## 1.2.9 Les effecteurs

### 1.2.9.1 Les activateurs

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

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

### 1.2.9.2 Les inhibiteurs

Des millions de dollars perdus chaque année à cause d'une réaction très néfaste pour le marché des fruits et légumes «brunissement enzymatique». Mal contrôlé, ce phénomène est responsable de plus de la moitié des pertes économiques dans ce secteur (Martinez et Whitaker., 1995, Kim et *al.*, 2000). 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).

Une large gamme des composés est connue pour inhiber la PPO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source de l'enzyme, de la disponibilité de substrat (O<sub>2</sub> et substrat phénolique), du pH et de la température (Arslan & Doğan., 2005). Plusieurs approches peuvent être utilisées pour diminuer ou prévenir le brunissement, comme examiné par (Mc Evily et *al.*, 1992), les inhibiteurs disponibles pour éviter le brunissement lié au PPO peuvent être classés en six groupes en fonction de leur mode d'action:

- 1- Agents Réducteurs (l'acide ascorbique et ses analogues, sulfites).
- 2- Agents chélateurs (éthylènediaminetétraacétate (EDTA), diethyldithiocarbamate de sodium (DIECA), l'azoture de sodium).
- 3- Les agents complexant (cyclodextrines, le chitosane).
- 4- Acidulant (acide ascorbique, l'acide citrique, l'acide malique, l'acide phosphorique).
- 5- Inhibiteurs enzymatiques (analogues de substrat, les halogénures).
- 6- Traitements enzymatiques (protéases, o-méthyl transférase).

Ces composés diminuent ou inhibent le taux de la réaction de brunissement par l'élimination d'un élément de réaction, le cuivre ou d'une réaction intermédiaire (O-quinones) (Vámos-Vigyázó., 1981, Ferrar et Walker., 1996, Nicolas & Billaud., 2006, Gouzi et *al.*, 2010).

L'efficacité d'un inhibiteur est mesurée avec le paramètre « IC<sub>50</sub> », plus elle est faible plus le taux d'inhibition est grand (Gouzi et *al.*, 2010). Un aperçu générale sur les valeurs des IC<sub>50</sub> de quelques inhibiteurs chimiques de synthèses largement utilisés en industrie agroalimentaire vis-à-vis de l'activité des PPO d'origine végétale et en présence de catéchol comme substrat est donnée dans le Tableau 03.

**Tableau 03** : Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de quelques inhibiteurs de la PPO

Inhibiteurs	Sources	IC <sub>50</sub> (mM)	Références
Acide benzoïque	Champignon de Paris ( <i>Agaricusbisporus</i> )	1.00 0.147	Chen et al., 2003 Gouzi et al., 2010
	Plaqueminier ( <i>Diospyros kaki</i> )	5.00	Arzu et al., 2004
Acide oxalique	Champignons de Paris ( <i>Agaricusbisporus</i> )	1,1	Son et al., 2000
	Artichauts ( <i>Cynarascolymus</i> )	0.194	Aydemir, 2003
	Plaqueminier ( <i>Diospyros kaki</i> )	0.0331	Arzu et al., 2004
Acide ascorbique	Champignons de Paris ( <i>Agaricusbisporus</i> )	0.24	Golan et Whitakes.,1984
	Artichauts ( <i>Cynarascolymus</i> )	0.0183	Tülin, 2004
	Laitue ( <i>Lactuca sativa var. capitata L.</i> )	4.61	Urszula et al., 2007
Acide citrique	Champignon de Paris ( <i>Agaricusbisporus</i> )	150	Son et al., 2000
	Laitue ( <i>Lactuca sativa var. capitata L.</i> )	62.91	Urszula et al., 2007

### 1.2.9.2.1 L'Acide citrique

C'est un acide organique faible (Rico et al., 2007 ; Li et al., 2008), le plus abondant dans les plantes et les fruits, en particulier les agrumes (Pernis et al., 2009). Cet acide organique a été souvent signalé par son activité anti-brunissement des fruits frais et les légumes coupés (Li-Quin et al., 2009) 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 signalée à différente entre les cultivars de pomme.

Dans les pommes Liberty, une activité inhibitrice moyenne sur le brunissement de 1%, de même une concentration 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.

### 1.2.10 Applications de la PPO

Au cours de ces dernières années, les polyphénols oxydases ont suscité un intérêt considérable en raison de leur forte capacité d'oxyder les composés aromatiques. Cette caractéristique rend l'utilisation de polyphénols oxydases très appropriée pour certaines applications biotechnologiques notamment dans l'industrie des aliments, l'industrie des pâtes et papiers, de textile, ainsi dans la médecine et l'environnement.

Les Polyphénol oxydases, en particulier les laccases ont d'intérêts dans la cuisson car elles sont capables de former des biopolymères par le phénomène de cross-Link (Rodriguez & Toca., 2006).Elles peuvent être également utilisées pour la biosynthèse des antioxydants et colorants alimentaires (Simsek & Yemenicioglu., 2007).

L'application des polyphénols oxydases dans l'industrie alimentaire comprend la formation de la couleur et de l'amélioration de la saveur du thé, du cacao et du café, de la pectine de betterave à sucre, la détermination de l'acide ascorbique et de la gélification et également comme un biocapteur (Polaina & MacCabe., 2007).

Dans le secteur médical, Cowan et al. (2000) ont montré que la polyphénol oxydase peut inhiber l'adhérence de *Streptococcus sobrinus* au niveau de la cavité buccale, de plus, elle peut être utilisée également pour le traitement de la maladie de Parkinson via la conversion de la L-tyrosine en L-DOPA (Xu, et al., 1998 & Asanuma, et al.,2003). En outre, les PPO peuvent faire l'objet de marqueur de vitiligo qui est une maladie auto-immune, et/ou comme agent de traitement en tant que précurseur de médicament et suppresseur de tumeur (Seo et al., 2003).

Seule ou parfois associée à d'autres enzymes telle que la laccase (Kochana et al.,2008 ;Monteali et al.,2010),elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (Min & Yoo.,2009,Njagiet al., 2010),le catéchol (Ameer & Adeloju.,2009 ;Tan et al.,2010), le phénol et ses dérivés (Adamski et al., 2010).

Dans le domaines agroalimentaire et environnement, les biocapteurs à PPO peuvent être utilisés également pour le dosage de certains polluants chimiques (Durán & Esposito., 2000),

comme le cyanure (Shan et *al.*, 2004), l'acide benzoïque (Li et *al.*, 2010), l'acide de sodium (Cui et *al.*, 2006), et le fluorure de sodium (Asav et *al.*, 2009).

La PPO sous forme soluble ou immobilisée est largement utilisée pour la dégradation du phénol et ses dérivée au niveau des eaux usées (Yamada et *al.*, 2005) de même ,dans l'industrie de textile, les PPO sont utilisées dans le blanchiment , la teinture et la décoloration (Rodriguez & Toca., 2006).

# *Matériels et Méthode*

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1 Matériel végétal

Les truffes (*Terfezia leonis*) ont été achetées de marché local de la région de Laghouat en Mars 2015, elles avaient une couleur marron foncé avec un poids et taille moyenne 49.61g et 4.5 cm respectivement (figure 07), lavées avec de l'eau distillée, puis conservées à 5°C.



**Figure 07 :** *Terfezia Leonis Tul* d'Algérie (wilaya de Laghouat). (photo originale)

## 2.2 Méthodes

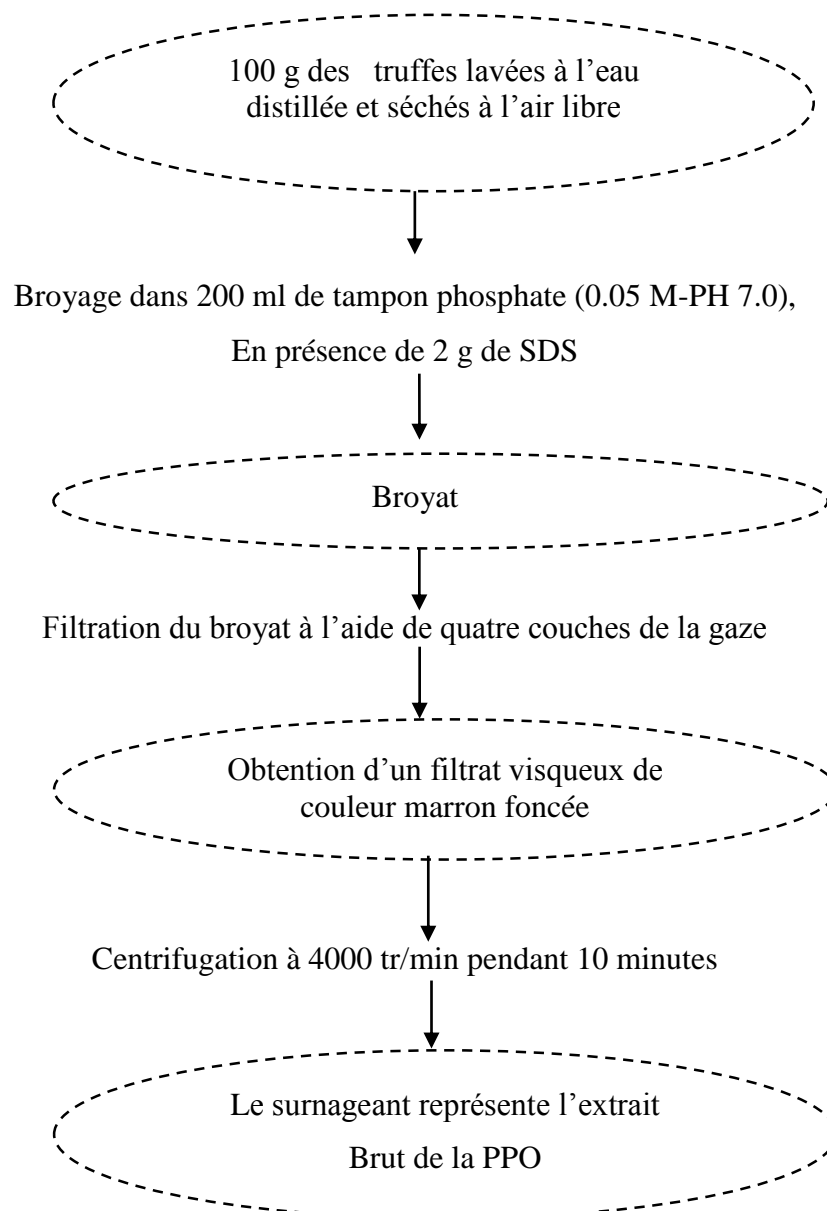
### 2.2.1 Extraction du polyphénol oxydase de truffes de désert

L'extraction de la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul*) est réalisée selon le protocole décrit par Gouzi et *al.*, (2013).

Tout d'abord les truffes sont lavées par l'eau distillée afin d'éliminer les traces de sol résiduel. Après avoir été suffisamment séchées à l'air libre, elles sont décortiquées, 100 g de l'écorce est broyé dans un mixeur contenant 200 ml de tampon phosphate (0.05M, pH7) refroidie à 5°C et additionné de SDS à 2%. Après le broyage, on procède à la filtration, le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000 tr/min.

Le surnageant obtenu représente l'extrait brut de la PPO, ce dernier est aliquoté ensuite en fraction de 2ml dans des tubes Eppendorf conservés à -15°C.

Le protocole de l'extraction de la PPO des truffes de désert est donné dans la figure 08.



**Figure 08 :** Protocole d'extraction du polyphénol oxydase à partir des truffes de désert  
(*Terfezia Leonis Tul*)

### 2.2.2 Mesure de l'activité de PPO

L'activité crésolase est mesurée à 475 nm à 30 C° en utilisant la L-tyrosine (2mM) comme substrat monophénolique (Pérez-Gilabert et *al.*, 2001). L'absorbance du milieu réactionnel est enregistrée chaque 10 secondes pendant 2 minutes après l'ajout de 20 µl d'extrait enzymatique dans une cuve contenant de la L-tyrosine à 2 mM et de SDS à 4 mM (Ünal, 2007).

### 2.2.3 Détermination de l'IC 50 de l'acide citrique

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction d'une série de concentration différente de l'inhibiteur comprises entre 2 à 11 mM (Chen et *al.*, 1998, Gouzi et *al.*, 2010). En utilisant L-Tyrosine 2mM, Tampon acétate de sodium (0,05M, pH 5) et à 30°C à pH 5.0.

#### 2.2.3.1 Etude de la stabilité thermique de l'activité crésolase de la PPO

L'activité crésolase résiduelle de l'extrait brut de la PPO est mesurée après 10 minutes d'incubation des tubes en verre de 1 mm d'épaisseur contenant 2 ml d'extrait enzymatique brut dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 à 65°C.

Après traitement thermique, les tubes sont refroidis rapidement dans l'eau froide et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à pH 5.0 (tampon Acétate de Sodium 0.05 M) et à 30°C, en présence de 2 mM du Tyrosine comme substrat.

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

$$AR_{(\%) } = \left( \frac{A_t}{A_0} \right) \times 100$$

Où  $A_0$  est l'activité avant traitement thermique (activité de l'enzyme mesurée à 30°C et  $A_t$  : l'activité après traitement thermique.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

#### 2.2.4 Inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis*

La cinétique d'inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis* a été étudiée en suivant la méthode décrite par Gouzi et *al.*, (2012) par incubation des tubes à hémolyse de 1cm d'épaisseur, contenant 1 ml d'extrait enzymatique brut dans un bain marie réglé à différentes températures : 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, et ceci en absence et en présence de 7,5mM d'acide citrique. Des prélèvements de 50 µl d'extrait enzymatique ont été effectués à différents intervalles fixes de temps, refroidis et leurs activités enzymatiques résiduelles ont été mesurées. Le pourcentage de l'activité résiduelle de la PPO est calculé par rapport à l'activité initiale de l'enzyme non traité thermiquement (Doğan et *al.*, 2005).

### 2.2.4.1 Analyse cinétique

L'inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis* a été décrite par une réaction de premier ordre :

$$\ln \frac{A}{A_0} = -Kt$$

Où

$A_0$  : est l'activité initiale.

$A$  : est l'activité résiduelle au moment  $t$ .

$K$  : est la constante de vitesse d'inactivation ( $\text{min}^{-1}$ ). À la température étudiée.

Les paramètres cinétiques de l'inactivation thermique ( $D$ ,  $k$ ,  $t_{1/2}$  et  $Zt$ ) ont été calculés suivant les équations suivantes (Gouzi et al., 2012, Cheng et al., 2013).

$$D = \frac{2,303}{k}$$

$$\log \left( \frac{A_t}{A_0} \right) = \left( -\frac{1}{D} \right) \cdot T$$

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln } 2}{k}$$

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

La Loi d'Arrhenius a été utilisée pour décrire la corrélation entre les valeurs de  $k$  et la température

$$\ln k = \ln(A) - \frac{E_a}{RT}$$

Où  $A$  : est la constante d'Arrhenius

$K$  : est le taux d'inactivation constante à la température étudiée.

$E_a$  : est l'énergie d'activation ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ).

$R$  : est la constante des gaz parfaits ( $8,314 \text{ J / mole K}$ ).

$T$  : est la température absolue ( $\text{K}$ ).

### 2.2.4.2 Analyse thermodynamique

A partir des données de l'analyse cinétique, la détermination de différents paramètres thermodynamiques comme les variations dans l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), l'enthalpie ( $\Delta H$ ), et l'entropie ( $\Delta S$ ) est également possible. Les calculs ont été effectués suivant les équations ci-dessous

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \frac{K \cdot h_p}{K_B \cdot T}$$

$$\Delta H = E_a - nRT$$

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

Où  $K_B$  : est la constante de Boltzmann ( $1.3806 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ Kg /K.s}$ ).

$H_p$  ; est la constante de Planck ( $6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$ ).

$K$  : est la constante de d'inactivation à la température étudiée ( $\text{s}^{-1}$ ).

### 2.2.5 Analyse des données cinétiques

L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2D™ (Jandel Scientific Windows v2.03, Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 2010), SigmaPlot 2012 (Systat Software, Inc., Windows Version 12.0,12.0) et Origin 8.0 (Microcal (TM) Origin Version 8.0, Copyright © 1995-2008 Microcal Software, Inc).

# *Résultats et Discussion*

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1 Extraction et stabilité de la PPO de truffes des déserts

L'extrait enzymatique obtenu par le protocole de Gouzi et *al.*, (2013) est de couleur marron foncée, avec un volume de 158 ml en présence de L Tyrosine comme substrats, respectivement. elle demeure également stable et active tout au long des expériences effectuées.

Sharma et *al.*, (2003) ont constaté que la PPO de champignon reste stable pendant 28 jours lorsqu'elle est placée entre -10 et 10°C, de même Nagai & Suzuki (2003) ont remarqué une chute de l'activité du polyphénol oxydase extraite à partir de *Glycine max L* dès le 8ème jour de stockage à 4°C. Kumar et *al.*, 2008 ainsi que Gouzi et *al.*, (2012) ont rapporté que la température de -15°C est convenable pour garder la stabilité de la PPO.

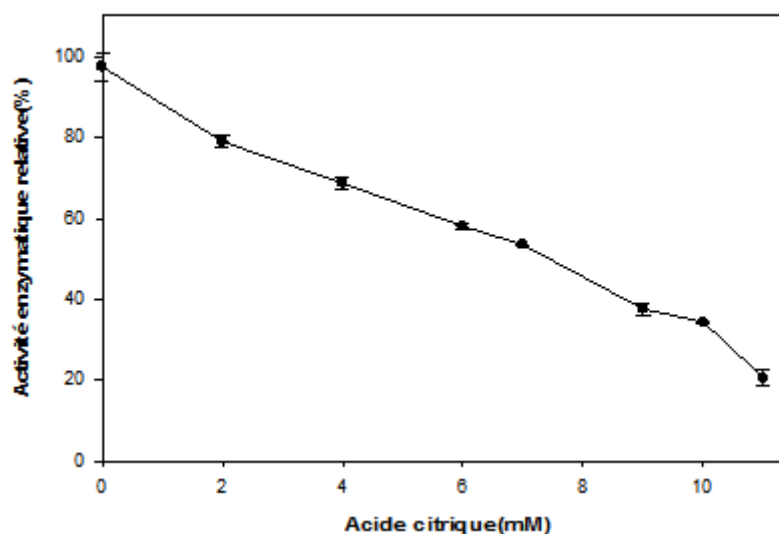
Cette différence de stabilité à des températures basses est liée probablement à plusieurs facteurs y compris la source de la PPO, la structure de l'enzyme, et /ou les constituants stabilisateurs présents dans l'extrait enzymatique. Toutefois, la PPO est généralement stable à des températures inférieures à zéro (Vámos-Vigyázó, 1981, Ziyen et Pekyardimci, 2004, Önez et *al.*, 2008).

#### 3.2 Détermination de l'IC<sub>50</sub> de l'acide citrique

L'inhibition du brunissement enzymatique peut être le résultat de (1) l'inactivation de la PPO, (2) de l'élimination de l'un des substrats de la réaction (O<sub>2</sub>, polyphénols), et (3) de l'action des inhibiteurs sur les produits de la réaction enzymatique pour empêcher la formation de produits colorés après des réactions secondaires (Doğan et *al.*, 2007).

L'effet de l'inhibiteur de l'acide citrique de l'extrait brut de la PPO des truffes du désert a été déterminé, en utilisant La L-Tyrosine comme substrats. Le résultat de l'effet de la concentration de cet inhibiteur (figure 9) montre que l'activité enzymatique diminue significativement avec l'augmentation de la concentration d'inhibiteur.

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



**Figure 09 :** Effet de la concentration de l'acide citrique sur la l'oxydation de L-Tyrosine par la PPO de *Terfezia leonis*.

En présence d'acide citrique, la PPO de truffes semble être plus sensible par rapport aux PPO d'*Agaricus bisporus* dont  $IC_{50} = 150$  mM, (Son et *al.*, 2000) et à celle de *Lactuca sativa* avec  $IC_{50} = 62.91$  mM (Urszula et *al.*, 2007).

Cette différence de valeurs d' $IC_{50}$  de cet inhibiteur vis-à-vis de l'activité de la PPO montre que l'efficacité de l'inhibiteur varie selon la source d'enzyme, le substrat, la méthode d'extraction et/ou le degré de pureté de l'enzyme utilisée (Neeley et *al.*, 2009 , Gouzi et *al.*, 2010)

### 3.3 Etude de la stabilité thermique de l'activité de la PPO

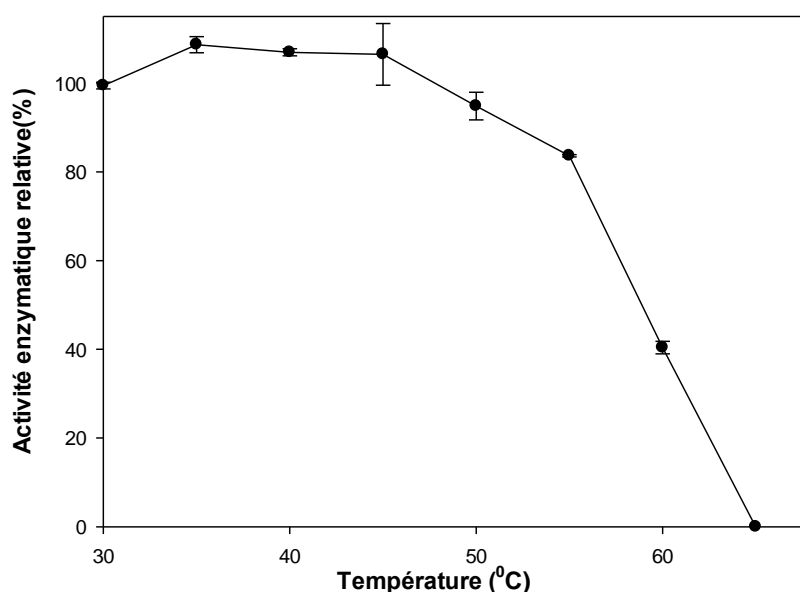
Le résultat de l'étude de la stabilité thermique de l'activité monophénolase est représenté dans la Figure 10.

D'après la représentation graphique de l'activité monophénolase résiduelle exprimée en pourcentage d'activité relative à 30°C pour les différentes températures testées, on remarque que l'activité enzymatique diminue avec l'augmentation de la température. On note aussi que l'enzyme est presque complètement inactivée à 60°C. Le milieu réactionnel contient 2 mM de la L-tyrosine et le tampon acétate de sodium 0.05 M à pH 5.0. Comme pour la plupart des réactions enzymatiques, la vitesse des réactions catalysées par la PPO augmente en général avec la température. Cependant, quand la température s'élève au-dessus de 50 à 60°C, l'activité catalytique enzymatique diminue.

Ce phénomène résulte de deux effets opposés :

(a) de l'effet thermique activateur dont une augmentation exponentielle de la vitesse la réaction avec la température.

(b) de l'effet thermique dénaturant de la structure de la protéine aux températures plus élevées. (Voet., 2011)



**Figure 10 :** Stabilité thermique de l'activité monophénolase de l'extrait brut de la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul.

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés pour les différentes PPO d'origine végétale : *Pernaearia japonicus* (Benjakul et al., 2005), *Macrolepiota mastoidea* (Kolcuoğlu et al., 2006) *Musa cavendishii* (Ünal, 2007), *Ocimum basilicum* (Doğan et al., 2005) et *Castanea henry* (Xu et al., 2004).

Plusieurs chercheurs ont indiqué que les PPO ont des températures optimales entre 20 et 40°C (Arslan et al., 1997 ; Aydemir, 2004 ; Duangmal et al., 1999 ; Fujita et al., 1995, Jiang., 1999, Gawlik Dziki et al., 2008). En effet, la PPO n'est pas une enzyme thermostable, le traitement thermique de courtes durées à des températures comprises entre 70 à 90°C de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale, sont dans la plupart des cas suffisants pour la destruction irréversible.

### 3.4 Inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis*

La stabilité de la PPO de truffes de désert a été mesurée en absence et en présence d'acide citrique. Cet acide est souvent utilisé en biotechnologie alimentaire comme agent anti-brunissement (Suttirak & Manurakchinakorn., 2010).

Dans le but de suivre la cinétique d'inactivation et déterminer les paramètres thermodynamiques de la PPO des truffes du désert, l'activité enzymatique a été suivie à pression atmosphérique en utilisant comme substrat la L-Tyrosine dans l'intervalle des températures compris entre 45 à 65°C et dans des conditions d'activité optimale pendant

une durée de traitement variable (L-tyrosine à 2 mM , pH 5.0 ,Tampon acétate de sodium 0.05 M, Acide citrique 7,5mM).

Les résultats de la stabilité thermique sur l'activité de la PPO de *Terfezia leonis* en absence et en présence d'acide citrique sont représentés dans la figure 11 (a et b) respectivement.

Selon les résultats obtenus (figure 11, a), on déduit que l'enzyme est d'autant plus stable que la température est basse, tandis que l'effet inactivateur de l'enzyme par la température est d'autant plus rapide que la température est élevée.

En effet, après l'incubation à 45°C ,50°C, 55°C ,60°C, et 65°C, les taux de réduction de l'activité enzymatique est respectivement 2%,4%,10% 50% et 80%. De même, les temps d'incubation correspondant à une perte de 50% d'activité à ces valeurs de température sont de 5min, 17min, 40min, 80min et 360 min. Nos résultats montrent que la PPO des truffes (*Terfezia leonis*) est plus thermostable que celle des fraises (Serradell et *al.*, 2000), de la pomme (Eidhin et *al.*, 2006) ; et de la céleri (Yağar, 2004), mais moins thermostable que les PPO d'artichaut (Doğan et *al.*, 2005).

Yağar (2004) a montré que la PPO extraite à partir du céleri (*Apium graveolens L.*) perd environ 70% de son activité initiale à 50°C et environ 85% de son activité à 60°C après un traitement thermique d'environ 30 min. L'étude de la thermostabilité de la PPO du Châtaigne (*Castanea henryi*), montre que l'activité de l'enzyme diminue de 10% lorsqu'elle est incubée pendant 30 min à 40°C (pH 7, tampon phosphate de potassium à 0,025 M, catéchol à 3.3 mM). Par conséquent cette enzyme demeure thermolabile (Xu et *al.*, 2004).

La cinétique de l'inactivation thermique de la PPO a été bien étudiée, toutefois, des variations importantes dans les rapports publiés existent par exemple, Chutintrasri & Noomhorm (2006) tout en traitant la PPO d'Ananas à des températures comprises entre 40-60°C pendant 30 minutes ont constaté d'une part une diminution de 60 % de l'activité enzymatique et d'autre part une activité résiduelle de 7 % après 5 min à 85°C et de 1,2% après 5 min à 90°C. En revanche, Zhang et *al.*, (2010) ont trouvé les activités résiduelles suivantes 47,28% et de 3,43% pour la PPO de pêche et de carotte, respectivement, après une durée de traitement de 60 min à 55°C.

Selon les travaux de Fante et Noreña (2012), cette variabilité de résultats suggère que l'inactivation de la PPO dépend de la source, des conditions environnementales et physico-chimiques tels que le pH et la température, de même et selon Patnaik (2002), l'inactivation

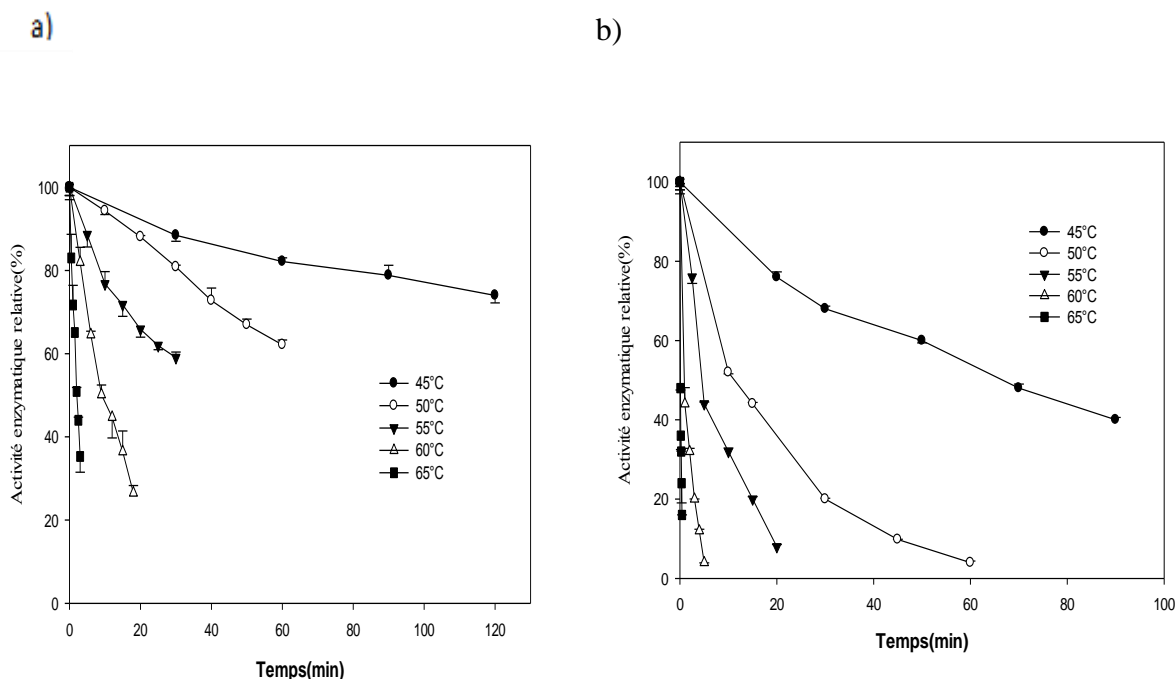
thermique de la PPO dépend non seulement de la température mais, dépend aussi, du temps d'incubation de l'enzyme.

La cinétique de l'inactivation thermique de la PPO d'*Agaricus bisporus* a été bien étudiée par Gouzi et *al.*, (2012), ils ont trouvés que le traitement de l'enzyme à 45°C pendant 30 min, ne cause pas une perte significative de son activité initiale. Par contre, une chute rapide de l'activité au-delà de 55°C a été remarquée. L'activité enzymatique à cette température, est réduite approximativement de 40%. Au-dessus de 60°C, l'inactivation thermique de la PPO devient trop rapide. Les temps nécessaires pour une inactivation de 50% de l'activité enzymatique à 60 et 65°C sont respectivement 11 et 1.1 min et est complètement inactivée après 6 min d'incubation à 70°C.

L'évaluation de la stabilité thermique en présence d'acide citrique (figure 11, b) montre que cet acide organique accélère le processus d'inactivation thermique. En effet, quel que soit la température d'incubation entre 45°C et 65°C, les temps d'incubation correspondant à une perte de 50% d'activité sont plus petits et ce sont de 1min, 2min, 7min, 16min et 70 min à 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, et 65°C respectivement.

L'effet amplificateur de l'instabilité thermique de l'enzyme pour l'acide citrique a été déjà signalé par Wei et *al.*, (2013). Ces derniers ont rapporté que l'effet de l'acide citrique consiste à provoquer des changements de conformation rendant l'enzyme aussi plus sensible à la température, ainsi, la baisse d'activité enzymatique vis-à-vis de l'augmentation de la température est due probablement d'une part aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme, et / ou à la destruction de son site actif, et d'autre part à la présence des formes multiples d'enzyme de la PPO dont certaines sont extrêmement thermolabiles (Khatun et *al.*, 2001, Yemenicioğlu, 2002, Doğan et *al.*, 2005)

Doğan et *al.*, (2005) suggèrent qu'une diminution du pourcentage de l'activité résiduelle aux températures élevées peut être due au déploiement de la structure tertiaire de l'enzyme pour former une structure secondaire qui est dépourvue d'activité catalytique. Il est plus notable qu'à des températures relativement élevées plusieurs liaisons faibles qui maintiennent la structure native de l'enzyme sont déstabilisées et solvatées inactivant par conséquent l'enzyme (Gómez-Puyou & Gómez-Puyou, 1998).



**Figure 11** : Effet de la température sur la stabilité de l'activité enzymatique (a) en absence et (b) en présence d'acide citrique

### 3.5 Cinétique de l'inactivation thermique

Les représentations graphiques de la cinétique d'inactivation montrent que la cinétique d'inactivation de la PPO est bien d'ordre 1. Les valeurs des constantes d'inactivation ont été estimés en exploitant la pente de la régression linéaire du  $\ln(A)_t / (A)_o$  en fonction du temps (Figure 12) (Samborska, 2007)

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -K \cdot T$$

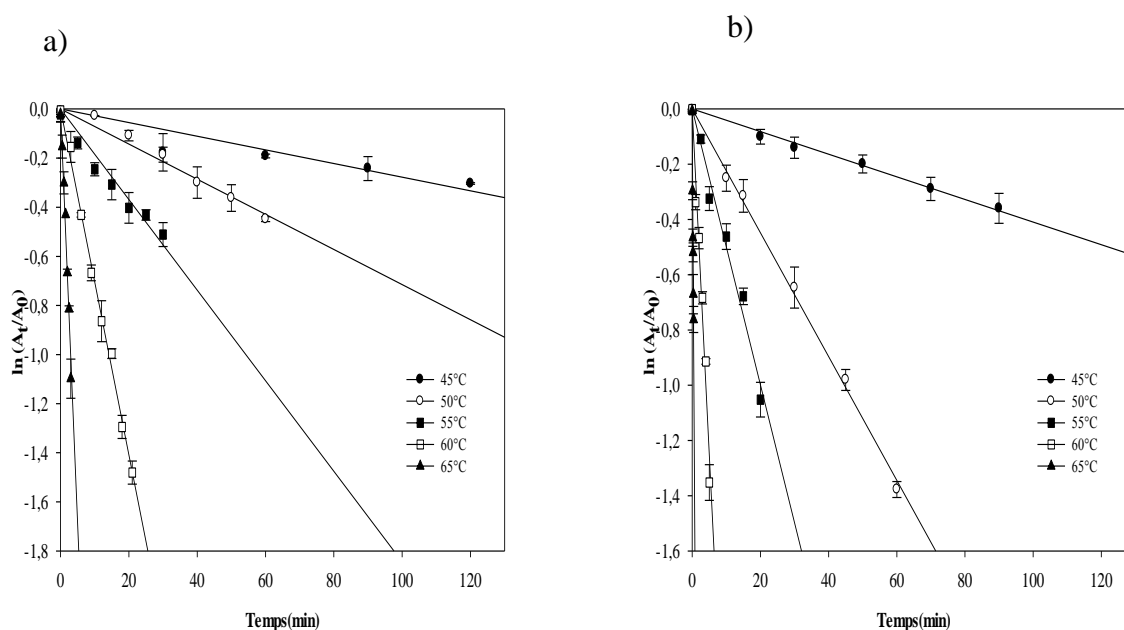
Pour mieux décrire les cinétiques d'inactivation thermique, nous avons déterminé les valeurs D et Z (Weemaes et al., 1997). La valeur D est définie comme étant le temps nécessaire à une certaine température pour réduire l'activité enzymatique initiale ( $A_0$ ) à 90% ou d'une unité logarithmique.

Pour les réactions du premier ordre, la valeur D est inversement proportionnelle à la constante de vitesse d'inactivation (k), le temps de réduction décimale D, est calculé à partir de l'équation suivante (Samborska, 2007)

$$D = \frac{2,303}{k}$$

La valeur de demi-vie,  $t_{1/2}$ , a été déterminée à partir de l'équation suivante :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$$



**Figure 12** : Cinétique d'inactivation thermique de la PPO (a) en absence et (b) en présence d'acide citrique

Les valeurs des paramètres cinétiques ( $k$ ,  $D$  et  $t_{1/2}$ ) d'inactivation thermique de la PPO du *Terfezia leonis* en absence et en présence de l'acide citrique sont regroupées dans les tableaux (04 et 05), respectivement. Ces paramètres sont le plus souvent estimés pour caractériser la stabilité d'une enzyme (Ünal et Şener, 2006).

**Tableau 04** : Paramètres cinétiques de l'inactivation de l'activité de la PPO des truffes (*Terfezia leonis*) en absence d'acide citrique.

Température (°C)	$D$ (min)	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
45	928,11±9	0,0020±0,0001	278,11±5
50	357,1±7	0,0069±0,0003	104,24±3
55	129,06±5	0,018±0,001	37,39±1
60	30,95±3	0,071±0,005	9,71±0,9
65	6,89±0,8	0,33±0,008	2,05±0,05

A la lumière de ces résultats, on note que la vitesse d'inactivation de la PPO à 65°C est 165 fois plus rapide qu'à 45°C. En effet la constante d'inactivation à 45°C est de  $0,002 \text{ min}^{-1}$  alors qu'à 65°C elle est de  $0,33 \text{ min}^{-1}$  (Tableau 04). En présence d'acide citrique, la vitesse d'inactivation est accélérée d'un facteur de 425 fois (Tableau 05) dont la constante d'inactivation à 45°C est de  $0,0018 \text{ min}^{-1}$  alors qu'à 65°C elle est de  $0,7474 \text{ min}^{-1}$ . En effet l'acide citrique amplifie la vitesse d'inactivation d'un facteur d'environ 2,6.

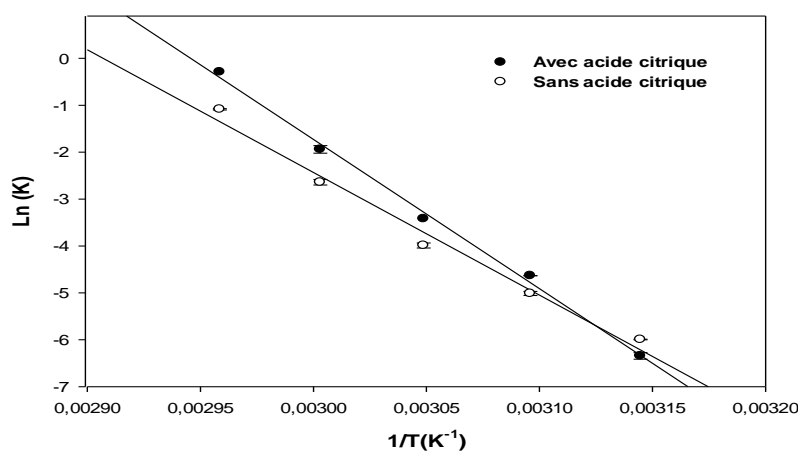
**Tableau 05** : Paramètres cinétiques de l'inactivation de l'activité de la PPO de *Terfezia leonis* en présence d'acide citrique.

Température (°C)	$D$ (min)	$k$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
45	1247,73±16	0,0018±0,0002	375,604±9
50	237,79±5	0,0096±0,003	71,583±5
55	105±3	0,0219±0,001	31,61±2
60	20,74±1	0,1109±0,002	6,245±0,03
65	3,08±0,9	0,7474±0,005	0,927±0,008

D'après ces résultats, on constate que les valeurs  $D$  et  $t_{1/2}$  diminuent rapidement avec l'augmentation de la température, ce qui est conforme à l'inactivation thermique de la PPO, reconnue comme une enzyme non thermostable (Gouzi et *al.*, 2012).

L'énergie d'activation de processus de dénaturation thermique de la PPO des truffes de désert a été déterminée à partir de la représentation graphique de la figure 13.

Les graphiques d'Arrhenius présentent un aspect linéaire dans toute la gamme des températures explorée expérimentalement que ce soit en absence ou en présence d'acide citrique.

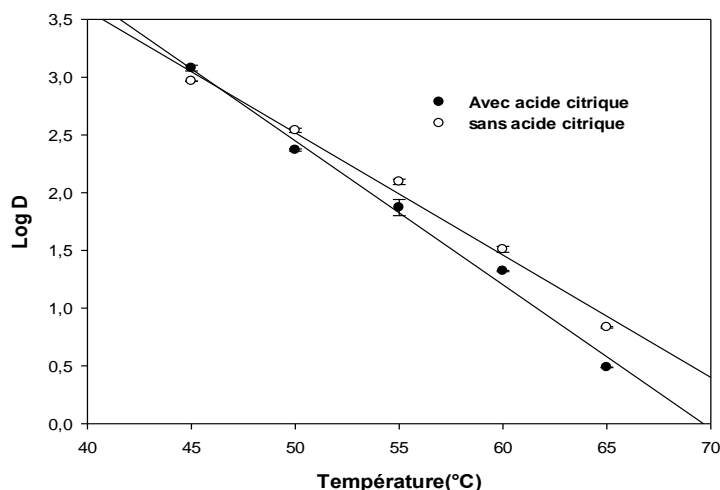


**Figure 13** : Représentation graphique d'Arrhenius relatif à la variation de la vitesse d'inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis*

L'énergie d'activation est estimée à partir de la pente ( $E_a/R$ ) et est égale à 217.37 KJ/mol Et à 257,8 kJ/mol pour la PPO de truffes en absence et en présence de l'acide citrique, respectivement. Ces valeurs d'énergie d'activation ( $E_a$ ) sont plus élevées à celles rapportées dans la littérature, pour la PPO de vanille 92,1 kJ/mol (Krzysztof et *al.*, 2009), de Taro (*Colocasia antiquorum*) 87.78 kJ/mol (Yemenicioglu et *al.*, 1999), d'ananas (Chut intrasri & Noomhorm, 2006) 23.70 kJ/mol , de Yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata cv*

Longbô) (Gnangui et al., 2009) 67.67 kJ/mol, d'artichaut (*Cynara scolymus L.*) 15,8 kJ / mol (Tulin, 2004), de truffes (*Terfezia leonis*), 215 kJ/mol (Gouzi et al.,2013). Mais elle est inférieure à celles de la PPO du raisin blanc (*var. Victoria*, l'Afrique du sud) ,221.5 kJ/mol (Rapeanu et al., 2006), de raisin de table (*Crimson Seedless*) ,295.5 kJ/mol (Fortea et al., 2009), de pêche,502 kJ/mol (Chan et Yang, 1971), de banane ,413 kJ/mol (Dimick et al., 1951), de raisin Emir (*Vitis vinifera L. cv. Emir*) ,251.4 kJ/mol (Ünal et Şener, 2006), de l'igname blanc (*Dioscorea rotundité*), 216 kJ/mol (Eze et al., 2010).

La relation entre le temps de réduction et la température est représentée dans la figure (14).La valeur  $Z_T$  est déterminée à partir de la courbe de représentation de  $\log D$  en fonction de la température (T en °C).



**Figure 14 :** Effet de la température sur la valeur-D de l'inactivation de la PPO de *Terfezia leonis*

Pour la PPO de *Terfezia leonis* les valeurs de  $Z_t$  obtenus en absence et en présence d'acide Citrique sont respectivement 9,44°C et 7,96°C. Ces valeurs de  $Z_t$  (°C) qui représentent l'augmentation de la température nécessaire pour une réduction de 90% de la valeur D indiquent que l'acide citrique augment d'autant la sensibilité de l'enzyme. En plus de la PPO de truffes de désert , il a été trouvé que les PPO d'autres sources végétales présentent des sensibilité vis-à-vis de la température de même ordre de grandeur, ainsi il a été estimé que les valeurs de  $Z_T$  sont comprises entre 8,5 et 10,95°C (Cheng et al.,2013, Gouzi et al., 2012,Ünal et al., 2007 ,Ünal & Şener, 2006,Râpeanu et al., 2006,Strubi et al., 1975, Vámos-Vigyázó, 1981).

### 3.6 Aspect thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis*

En ce qui concerne l'aspect thermodynamique de la dénaturation de la PPO induite par l'augmentation de la température, les paramètres thermodynamiques ; l'enthalpie ( $\Delta H$ ), l'entropie ( $\Delta S$ ) et l'énergie libre ( $\Delta G$ ) ont été calculés et ceci en absence et en présence d'acide citrique, les résultats ainsi obtenus sont récapitulés dans les tableaux 06 et 07, respectivement. Pour les calculs les équations suivantes ont été utilisées :

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

$$\Delta G = -R.T \ln \frac{K_{h_p}}{K_{B.T}}$$

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

**Tableau 06** : paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO de truffes (*Terfezia leonis*)

T °C	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol/K°)
45	214±1	112,745±0,03	320,675±14
50	214±1	111,609±0,1	319,103±13
55	214±1	110,383±0,2	317,855±14
60	214±1	108,308±0,2	319,193±14
65	214 ±1	105,659±0,04	322,162±13

Les valeurs moyennes de  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  et  $\Delta G$  sont 214KJ/mol, 109,74 KJ/mol et 319,79 KJ/mol/ K°, respectivement. Les valeur de l'enthalpie de la PPO de truffes est supérieure à celles de la PPO de pomme de terre (98.02 kJ/mol) (Duangmal & Owusu, 1999), de *Lepista nuda* (13 kJ/mol) , *Hypholoma fasciculare* (36 kJ/mol) ,d'*Armillaria mellea* (64 kJ/mol) (Yang & Wang,2008),et de l'igname comestible (*Dioscorea cayenensis-rotundata cv Longbô*) (64.950 kJ/mol) (Gnangu et al., 2009), de vanille (89,2483 kJ/mol) (Krzysztof, 2009) et de Marula (35,5435 kJ/mol) (Mdluli, 2005).

La PPO de truffe de désert étudiée dans ce travail est une enzyme moins thermostable, la valeur élevée de  $\Delta H$  indique que l'enzyme subit un changement considérable de conformation durant le processus de dénaturation. La valeur positive de  $\Delta H$  indique que la réaction d'oxydation est endergonique. Les valeurs positives de  $\Delta S$  indiquent la présence de processus significatif d'agrégation. L'énergie libre de la PPO diminue légèrement avec l'augmentation de la température. Aux différentes températures, les valeurs de  $\Delta G$  sont

positives indiquant que la réaction d'oxydation n'est pas une réaction spontanée. Les valeurs élevées en terme d'énergie d'activation et d'enthalpie montrent que pour initier le processus de dénaturation, il faut un apport élevé en énergie (Cheng et *al.*, 2013). Ceci est lié au fait que la PPO présente une conformation moléculaire stable.

**Tableau 07** : Paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO des truffes (*Terfezia leonis*) en présence de l'acide citrique [7,5mM].

T °C	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol/K°)
45	255±2	112,95±0,02	447,16±18
50	255±2	110,32±0,2	448,26±19
55	255±2	109,84±0,2	442,76±18
60	255±2	107,07±0,05	444,32±16
65	255±2	103,361±0,1	448,60±17

En présence d'acide citrique, il n'y a pas une grande variation dans les valeurs d'énergie libre tandis qu'on a noté que l'inactivation thermique de la PPO nécessite une variation entropique et enthalpique beaucoup plus grande. Les valeurs de  $\Delta G$  restent toujours positives indiquant que l'acide citrique n'affecte pas la spontanéité de la réaction.

En outre, pour les valeurs de  $\Delta S$ , elles sont nettement supérieures à celles qu'en absence d'acide citrique reflétant un changement net dans le désordre de l'enzyme et le système solvant accompagnant la formation de l'état de transition. (Gnanguï et *al.*, 2009).

L'effet de l'acide citrique sur les paramètres thermodynamique a été également rapporté pour l'activité catécholase de la PPO d'*Agricus bisporus* en utilisant le pyrocatechol comme substrat (Wei et *al* 2013), ils ont trouvés des valeurs de  $\Delta G = 98.197 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta H = 130 \text{ kJ mol}^{-1}$  et de  $\Delta S = 99.96 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$  après un traitement à 45°C en présence de 15mM d'acide citrique, de même à 65°C il ont estimés des valeurs d'environ 96,4 kJ mol<sup>-1</sup>, 130,99 kJ mol<sup>-1</sup> 99 J mol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup> pour  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ , respectivement .

*Conclusion*

## ***Conclusion***

Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de ce mémoire s'est focalisé à approfondir nos connaissances dans le domaine agroalimentaire via la mise en place d'un moyen préventif de brunissement enzymatique, dont nous avons étudié l'effet combiné de l'acide citrique et l'inactivation thermique sur la tyrosinase des truffes. Ce qui nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

- La méthode d'extraction de la PPO du truffes de désert, est simple à mettre en œuvre, nous a permis d'obtenir un extrait enzymatique riche en PPO et également très stable.

- L'étude de la stabilité thermique de l'activité tyrosinase de la PPO montre que sa température optimale apparente est comprise entre 30-40°C.

- L'inactivation thermique est le procédé le plus utilisé pour stabiliser les champignons. En effet, l'inactivation thermique de la PPO de truffes peut être convenablement décrite par un modèle cinétique de premier ordre, dans la gamme des températures comprise entre 45 à 65°C, avec une  $Z_T = 9,44^\circ\text{C}$  et une  $E_a$  de 217 kJ/mol.

- En présence d'acide citrique, la vitesse d'inactivation est accélérée d'un facteur de 425 fois dont la constante d'inactivation à 45°C est de  $0,0018 \text{ min}^{-1}$  alors qu'à 65°C elle est de  $0,7474 \text{ min}^{-1}$ . En effet l'acide citrique amplifie la vitesse d'inactivation d'un facteur d'environ 2,6 avec des valeurs de  $Z_T = 7,69^\circ\text{C}$  et une  $E_a$  de 257,8 kJ/mol.

- En terme des paramètres thermodynamique, on n'a pas remarqué une grande variation dans les valeurs d'énergie libre tandis qu'on a noté que l'inactivation thermique de la PPO nécessite une variation entropique et enthalpique beaucoup plus grande en présence d'acide citrique.

- La combinaison entre l'effet de l'acide citrique et le traitement thermique sur la PPO de *Terfezia leonis* permet d'inhiber directement l'activité de l'enzyme et indirectement le brunissement, dont un traitement thermique de courte durée à 50°C en présence de 7,5mM d'acide citrique peut être adopté comme moyen efficace de contrôle de brunissement enzymatique notamment des truffes.

En perspectives, il serait envisageable de purifier l'enzyme pour l'utiliser par la suite aussi bien pour le développement des biocapteurs que pour le dosage des composés phénoliques. En revanche, une attention doit être également donnée à la recherche des inhibiteurs naturels de la PPO des truffes et/ ou à l'étude de l'inactivation de l'enzyme par les méthodes physiques en particulier la pression.

*Références*  
*Bibliographique*

## *Références Bibliographiques*

### A

**Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J.** (2010). Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*. 55: 2363–2367.

**Aka, J.P., Courtois, F., Louarme, L., Nicolas, J., Billaud, C.** (2013). Modelling the interactions between free phenols, L-ascorbic acid, apple polyphenoloxidase and oxygen during a thermal treatment. *Food Chemistry* 138.1289–1297.

**Ameer, Q & Adeloju, S.B.** (2009). Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B*. 140: 5–11

**Anosike E.O & Ayaebene A.O.** (1982). Properties of polyphenol oxidase from tubers of the Yam (*Dioscorea bulbifera*.) *Phytochemistry*, 21, 1889-1893.

**Anthon G. E & Barrett D. M.** (2002). Kinetics parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4119-4125.

**Arslan O., Doğan S.** (2005). Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 85, 1499-1504.

**Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I.** (1997). Polyphenol oxidase from *Allium* sp.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:2861–2863.

**Arzu Z., Colak A., Dincer B., Guner S.** (2004). A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae). *Food Chemistry.*, 85, 431–437.

**Asanuma, M., Miyazaki, I., Ogawa, N.** (2003). Dopamine or-L-DOPA-induced neuro toxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 5 (3):165-176

**Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E.** (2009). An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.

**Aydemir, A.** (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chem.*, 87, 59-67.

**Aydemir, T.**(2010). Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus officinalis L.* International Journal of Food Properties. 13: 475-485.

**Aydemir T., Akkanli G.**(2006). Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens L.*) and the investigation of the effects on the enzyme activity of some inhibitors. J. Food Sci. Tech., 41, 1090–1098.

## B

**Bach,A., Chodat,R.**(1904).Studies about the function of peroxides in the Chimes of the living cell. II About peroxide formation in living cells. Ber., 35, 2466-24.

**Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E. And Mayer, A.M.**(1977).Olive catechol oxidase-changes during fruit development. J. Sci. Food Agric. 28, 545-550

**Benjakul, S., Visessanguan W., Tanaka M.**(2005). Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*).” Journal of Food Biochemistry. 29: 470-485.

**Bertrand G.**(1896 ).Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelque champignon. C. R. Acad. Sc., 123, 463-465.

**Bordner A., Nelson J.M.**(1939). On the oxidation of p-cresol by means of tyrosinase. J. Amer. Chem. Soc., 61, 1507-1513.

**Bradai,L., Bissati,S., Chenchouni,H.**(2014). Desert Truffles of the North Algerian Sahara: Diversity and Bioecology. Emir. J. Food Agric. 425-435.

## C

**Chan, H. T & Yang, H. Y.**(1971). Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the mcfarlin cranberry. Journal of food science. 35: 169.

**Chang-Kui D., Kazuo C, Yoshinori U, Chien Y.W.**(2002). Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. Food Chemistry 76,213–218.

**Chazarra,S., Cabanes,J., Escribano ,J., García-Carmona,F.**(1997). Kinetic study of the suicide inactivation of latent polyphenoloxidase from iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) induced by 4-tert-butylcatechol in the presence of SDS. Biochim Biophys Acta. 1339(2):297-303.

**Chen, Q.X., Lu, H.Y., Zhu, C.M., Lin, H.N., Zhou, H.M.**(1998). The effect of Nthiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem Mol Biol Int.* 45: 465-73.

**Cheng,X.-F., M.,Zhang,M.,Adhikari,B.**(2013).The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments, *Ultrasonics Sonochemistry* 20,674–679.

**Chutintrasri,B & Noomhorm,A.**(2006). Thermal inactivation of polyphenol oxidase in pineapple puree. *Lebensmittel-wissenschft.*, 36, 492-495.

**Claus, H & Decker,H.**(2006).Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*,29:13-14.

**Cullere L.,Ferreira,V.,Chevret,B., Venturini,M,E., Sanchez-Gimeno,A,C., Blanco ,D.**(2009).Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber mela nosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography– olfactometry. *Food Chem* 122:300–306.

**Cowan, M.,Horst,E. A.,Luengpailin,S.,Doyle,R,J.,**(2000).Inhibitory effects of plant polyphenoloxidase on colonization factors of *Streptococcus sobrinus* 6715.Anti microbial Agents and Chemotherapy 44 (9):2578-2580.

**Cuff M,Millerki E,Van Holdeke,Hendrick Sonwa.**(1998).Crystal structure of a functional unit from Octopus dofleini hemocyanin .*JMolBiol* 1998 ;278 :855–70

**Cui, Y., BarforD, J.P.,Renneberg, R.**(2006). A disposable, screen-printed electrode for the ampero-metric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences.* 22 : 1279-1281.

## D

**Dalmadi,I.,Rapean,G.,Loey,An.,Smout,C.,Hendrickx ,M.**(2006). Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. *Journal of Food Biochemistry*,V 30, p 56–76.

**Dimick, K.P., Ponting, J.D., Makower, B.**(1951). Heat inactivation of polyphenol oxidases in fruit pure'es. *Food Technol.* 6: 237–240.

**Díez J, Manjón JL, Martín F.**(2002). Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania* host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia* 94: 247–259,

**Dogan S., Turan P., Dogan M., Alkan M., Arslan O.**(2007). Inhibition Kinetic of *Ocimum basilicum* L.Polyphenol Oxidase. 5, 46.

**Dogan, M & Dogan, S.**(2003). Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. chaubardii*). *J Food Chem.* 39: 1-9.

**Doğru,Y,Z &,Erat,M**(2012). Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum, Apiaceae*) *Food Research international*,49, 411-415

**Duangmal, K., Owusu Apenten, R.K.**(1999). A comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chem.* 64:351-359.

**Dundar,A., Faruk,O, Acay,H, Okumus,V, Ozdemir,S, Yildiz,A** (2012) Antioxidant properties,chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (Chatin) from Turkey. *FoodSci Technol Int* 18:317–328

**Duran,N.,Esposito,E.**(2000).Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ.* 28: 83–99.

## E

**Eicken, C., Krebs, B., Sacchetti, J.C.**(1999).Catechol oxidase:structure and activity.Catalysis and regulation.*Current Opinion in Structural Biology.* 9: 677-683.

**Eidhin, N., Myrphy, E., O’Beirne, D.**(2006). Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh .cv Bramley’ Seedling) purification strategies and characterization. *Journal Of Food Science.* 71: 51-58.

**Emilia ,S., Deirdre ,N ., Charlotte ,S C., Jacob, N ., Anne ,L. ,Sonia, Ha., Eric ,R., David ,O., Johanna ,B., Kristiina.**(2007). Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *Journal of Biotechnology* 130, 471–480

**Espin, J.C., Morales, M., & Varon, R.** (1996). Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and di-phenolase activities of pear polyphenoloxidase. *J. Food Sci.* 61(6), 1177.

**Erat, M., Nuri, Y. Gülşah, S.A., Demirkol, A.** (2010). Partial characterization of polyphenol oxidase from a hybridized wheat (*Triticum aestivum L.*) *European Food Research and Technology.* 23, 6, 899-905.

**Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F.** (1997). Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chemistry.* 45: 1090-1094

**Espin, J.C. & Wichers, H.J.** (1999). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3518-3525.

**Es-Safi, N.E., Cheynier, V., Moutounet, M.** (2003). Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *J Food Comp Anal.* 16:535–553.

**Eze, S., Chilaka, F.C., Nwanguma, B.C.** (2010). Studies on Thermodynamics and Kinetics of Thermo-Inactivation of Some Quality-Related Enzymes in White Yam (*Dioscorea rotundata*). *J Thermodyn Catal.*

## F

**Fan, Y & Flurkey, W.H.** (2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry.* 65: 671-678.

**Fante, L., & Zapata Noreña, C. P.** (2012). Enzyme inactivation kinetics and colour changes in Garlic (*Allium sativum L.*) blanched under different conditions. *Journal of Food Engineering,* 108(3), 436 e 4 43.

**Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F and Tudela, J.** (2004). Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.

**Ferrar P.H., Walker J.R.L.**(1999). Microorganisms as potential source of novel diphenol oxidase inhibitors. *J. Food Biochem.*, 23, 1-15.

**Fortas., Z.,Gérard ,C.**(1992). Effet des conditions de culture sur la mycorhization de l'*Helianthemum guttatum* par trois espèces de Terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. *Canadian Journal of Botany.*,70(12): 2453-2460.

**Fortea, M.I.,Lopez-Miranda, S., Serrano-Martinez, A., Carreno, J And Nunez-Delicado, E.** (2009). Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (*Crimson seedless*). *Food Chemistry.* 113: 1008-1014.

**Fujita, S., Saari, N., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N., & Tono, T.**(1995). Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea L.*). *Journal of Agricultural Food Chemistry.* 43(113)1138–1142.

## G

**Gandía-Herrero *Dioscorea cayenensis-rotundata* cv longbô, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F And Escribano, J.**(2005). Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* 386: 601-607.

**Garcia-Borron ,J,C., Solano F.**(2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173

**Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., & Swieca, M.**(2008). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *Capitata L.*). *Food Chemistry.* 107: 129–135.

**Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G.**(2010). Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci.* (3):369-385

**Gioacchini, A. M., Menotta, M., Bertini, L., Rossi, I., Zeppa, S., Zambone Ili, A.** (2005). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , 19, 2365.

**Gnangui,S,N.,Dué, E. A.,N'guessan Kouadio, J-P. E.,Kouamé, L. P.** (2009). Effect of heat treatment on edible yam polyphenol oxidase activity: kinetic and thermodynamic analysis. *Journal of animal & plant sciences.* 2,( 3),128 – 137.

**Golan-Goldhirsh, A., Whitaker, J. R., Kahn, V.(1984).** Relation between structure of polyphenol oxidase and prevention of browning. *Adv. Exp. Med. Biol.*177:437-456.

**Golbeck, J.H & Cammarata, K.V.(1981).** Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67: 977-984.

**Goldfeder,M., Kanteev,M., Adir,N., Fishman,A.** (2013).Influencing the monophenolase/diphenolase activity ratio in tyrosinase. *Biochim Biophys Acta.* 1834:629–633

**Gouzi, H & Benmansour, A.(2007).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering.* 5: 1-11.

**Gouzi H., Coradin T., Delicado E.M., Ünal U., Benmansour A.,(2010).** Inhibition Kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach Polyphenol Oxidase. *The Open Enzyme Inhibition Journal.*, 3, 1-7.

**Gouzi H.,Depagne C., Benmansour, A., Coradin .(2013).** First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle(*Terfezia leonis Tul.*) and its thermal behavior. *Eur Food Res Technol.*

**Gouzi, H., Depagne, C., & Coradin, T.** (2012). Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 500–506.

**Golan-Goldhirsh A.Whitaker J.R.; Kahn, V.(1984).**Relation between polyphenol oxidase and prevention of browning. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety*; Friedman, M., Ed.; Plenum: New York, 457-495.

**Goyeneche,R., Di Scala,K , Roura.(2013).**Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish(*Raphanussativus var.sativus*) *Food Science and Technology.*(54), 57-62

## H

**Halaouili, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., Lomascolo, A.,(2006).** Fungal tryrosinases: new prospects in molecular characteristics,bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 100, 219–232

**Haldane, J.B.S.**(1930). The enzymes. Green and Co Ed, Londres.

**Hall, I. R., Brown, G. T., & Zambonelli, A.** (2007). Taming the truffle. Portland, Oregon, USA: Timber Press, Inc..

**Harry,W.,Duckworth.,Joseph,E.,Colema.**(1970). Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *Biological. Chem.*, 7, 1613-1625

**Hasegawa, S. and Maier, V. P.** (1980). Polyphenol oxidase of dates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 891-893.

**Hernández-Romero,D, Sanchez-Amat,A, Solano,F.**(2006). A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio. *FEBS J.* 273(2):257-70.

**Harel, E., Mayer, A.M., Shain, Y.**(1964). Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiologica Plantarum.* 17: 921-930

**Hernández-Romero ,D., Sanchez-Amat ,A., Solano F.**(2006). A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio. *FEBS Journal*, V273, 257–270.

**Hussain G.,Al-Ruqaie,I,M.**(1999).Occurrence, Chemical Composition, and Nutritional Value of Truffles: An Overview. *Pakistan Journal of Biological Sciences.*V2, 510-514.

**Jaenicke, E & Decker, H.,**(2003). Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochem. J.* 371, 515–523.

**Janakat, S., Al-Fakhiri, S., & Sallal, A. K. (2005).** Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia clavaryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Medical Journal*, 26(6), 952–955.

**Janakat, S., & Nassar, M.** (2010). Hepatoprotective activity of desert truffle (*Terfezia clavaryi*) in comparison with the effect of *Nigella sativa* in the rat. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9, 52–56

**Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M. Nd Nicolas, J.J.** (1990). Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1437-1441

**Jiang, Y. M.**(1999). Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chemistry*. 66:75–79.

**Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G.**(1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102 : 1459-1483

**José H. Martinez, Francisco Solano, Rafael Pei-Iaffiel, Jesijs D. Galindo, Josi L. Iborra And Joé A. Lozano.**(1986). Comparative study of tyrosinases from different sources: relationship between halide inhibition and the enzyme active site.

**José L. Navarro, A.T., Miguel A,S, Enrique,S.**(2014) .Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. *Food Chemistry*, V 157,Pages 283-289.

**Joy, R.W.,Sugiyama, M., Fukuda, H. And Komamine, A.**(1995). Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol.* 107, 1083-1089.

## K

**Kahn, V.**(1997). Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *J.Food Sci.* 42: 38–43

**Kahn, V. And Pomerantz, S.H.**(1980). Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidases. *Phytochemistry* 19, 379-385

**Kagan-Zur,V., & Roth-Bejerano, N.** (2008). Dessert truffles. *Truffles* , 1,32 – 37

**Kanade,SR., Paul ,B., Rao,AG., Gowda, LR.**(2006). The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid-pH activation. *Biochem J.* 2006 May 1;395(3):551-62.

**Krzysztof N. Waliszewski,**(2009). Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean.(*Ofelia Márquez, Violeta T. Pardio*) . *Food Chemistry*.117 196-203

**Keilin, D & Mann, T.**(1938). Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.* 125: 187-204

**Khatun, S., Absar, N., And Ashraduzzaman, M.**(2001). Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera* L.) Leaves at Mature Stage. Pakistan Journal of Biological Sciences. 4: 1129-1132.

**Kiattisak, D., Richard, K., Owusu, A.**(1999). A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). Journal of Food Chemistry, 64, 351-359.

**Kim, J., Marshall, M.R. And Wei, C.**(2000). Polyphenoloxidase. In Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality, (N.F. Haard and B.K. Simpson, eds.) pp. 271-315, Marcel Dekker, New York.

**King, R.S. And Flurkey, W.H.**(1987). Effect of limited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. 9. Sci. Food Agric. 41, 231-240.

**Klabunde, T., Eicken, C., Sacchetti, J., Krebs, B.**(1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. Nat Struct Biol; 5: 1084-90.

**Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M.**(2008). Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. Microchemical Journal. 89: 171-174.

**Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N.**(2006). Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). Food Chemistry. 101: 778-785.

**Kovacs, G.M., Trappe, J.M., Alsheikh, A., Hansen, K., Healy, R.A., Vági, P.**(2011). American truffle mycota as two new genera and *Mattirolomyces* species emerge. Mycologia. vol. 103 no. 4, 831-840.

**Kubowitz, F.**(1938). Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. Biochemisches Zeitung. 299: 32-57.

**Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T. C., Murugan. K.**(2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). Food Chemistry. 110: 328-333.

**Kuwabara,T.,& Katoh,Y.**(1999). Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* 40: 1029-1035.

## L

**Læssøe T, Hansen K.**(2007). Truffle trouble:What happened to the Tuberales? *Mycol Res* 111:1075– 1099, doi:10.1016/j.mycres.2007.08.004

**Laveda, F., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F. And Sanchez-Ferrer, A.**(2000). Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.*379, 1-6.

**Lax A.R & Vaughn K. C.**(1991).Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31

**Lerch, K.**(1983). *Neurospora sp* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* 52, 125-138.

**Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J.**(2010). Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B.* 144 : 18–22.

**Lineweaver, H & Burk,D.**(1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658-666.

**Liu,B.,Liu,HY.,Liu,ZH.**(2002).Hypogeous fungi from China. *Edible fungi of China* 21–1: 3–4 and 2:14–15

**Loera,C,O.,Pérez,P,M.,Cristina ,I,B., Rodríguez,J,R and Villaseñor,O,F.**(2006). dvances in Agricultural and Food Biotechnology.323-340.

**Loizides,M., Hobart.,C., Konstandinides,G E.,Yiangou Y.**(2012). Desert Truffles: the mysterious jewels of antiquity. *Field Mycology*,V 13(1), P 17–21

**Luard, E.** (2006). *Truffles*. Childs Hill, London: Berry & Co., Ltd..

**Ludwig B. J., Nelson,J. M.**(1939). Inactivation of Tyrosinase in the Oxidation of Catechol. *J. Am. Chem. Soc.*61 (10), pp 2601–2606

## M

**Madhavi ,V.,& Lele,S,S.(2009).**Laccase properties,use,,Bioresources.1694-1717

**Majid,Y..Moridania,B.,Arnosiraki,A., Tatiana-Chevaldina,A., Hughscobie ,Peter.,O'brien J.(2004).** Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* .145(2):213-23.

**March RE, Richards DS, Ryan RW.(2006).**Volatile compounds from six species of truffle—head-space analysis and vapor analysis at high mass resolution. *Int J Mass Spectrom* 249:60–67.

**Marques, L., Fleuriet, A.,Macheix, J.(1995).** Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 193-200.

**Martinez-Cayuela, M., Rodriguez-Vico, F., Faus, M.J. And Gil, A. (1989).** Partial purification and intracellular localization of cherimoya (*Annona cherimolia* Mill.) Polyphenol oxidase.*J.Plant Physiol.*133, 660-663.

**Martínez.C, M., Corzo,N .,Villamiel,M., Del Castillo,M,D.(2012).**chapitre 4 Browning Reactions. *Food Biochemistry and Food Processing, Second Edition.*

**Martinez V.M. & Whitakerj.R.,(1995).** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, 6, 195-200.

**Marusek, C.M., Trobough, N.M., Flurkey, W.H., Inlow, J.K.,(2006).**Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Chem.* 100,108–123.

**Mayer A.M.,(2006).** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. *Phytochemistry.*, 67, 2318–2331

**Mayer, A.M. (1987).** Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants–Recent

**Mayer, A.M.; Harel, E. 1991. Phenoloxidas and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science. 373-398.**

**Mayer,A.M.,Harel,E.,(1979).**Polyphenol oxidases in plants .*Phytochemistry* 18,193

**Mcevely, A.J., Iyengar, R. And Otwell, W.S. (1992).** Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32,

**Mccord, J. D & Kilara, A.**(1983). Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Science*, 48:1479–1483.

**Mdluli, K. M.**(2005). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*). *Food Chemistry*, 92:311–323.

**Mesquita, V, L, V., Queiroz, C.**(2013). Chapter 10 ;Enzymatic Browning. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*, 387-418.

**Min, K., Yoo, Y.J.**(2009). Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.

**Miranda, M., Bonfigli, A., Zarivi, O., Ragnelli, M., Pacioni, G., Botti, D.**(1992). Truffle tyrosinase: Properties and activity. *Plant Science*. 81: 175-182.

**Miranda, M., Zarivi, O., Bonfigli, A., Ragnelli, M., Rocchina, P., Aimola, P., Pacioni, G.**(1996). White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science*. 120: 29-36.

**Montealeali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R.** (2010). A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189–194.

**Moore, B.M. And Flurkey, W.H.**(1990). Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem*. 265, 4982-4988.

**Muller., L.A; Hinz, U; and Zrýd, J-P.** (1996). Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*, Vol. 42. No 6. pp. 1511-1515.

**Muñoz-Muñoz ,Jl., Garcia-Molina,F., Varon,R., Tudela,J., Garcia,F., Rodríguez-López,Jn.** (2010) New features of the steady-state rate related with the initial concentration of substrate in the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase . *J Math Chem*. .

**Murcia MA, Martinez-Tome M, Jimenez A, Vera A, Honrubia M, Parras P** (2002) Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *J Food Protect* 65:1614–1622.

**Nagai T & Suzuki N.**(2006). Polyphenol Oxidase from Bean Sprouts (*Glycine max* L.). *Journal of Food Science* V 68, pages 16–20.

**Nan-yi ,L., Wei-ming, C., Qun-li, J., Qiao-ping ,Q., Fu-lai ,R.**(2011). Molecular Cloning and Expression of Polyphenoloxidase Genes from the Mushroom, *Agaricus bisporus*. *AGRIC SCI CHINA*-2927.

**Na-Na,L.,Wei L,Dai-Jie,W.,Yi-Bin Z.,Xiao-Jing ,L.,Xiao W A., Sheng-Bo ,Li.**(2013.) Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb.*Chemistry*, V 138,P478- 483.

**Nazzaro, F., Fratianni, F., Picariello, G., Coppola, R., Reale, A., & Luccia, D. A.** (2007).

**Neeley E., Fritch G., Fuller, A., Wolfe J., Wright J., Flurkey W.**( 2009). Variations in IC50 Values with Purity of Mushroom Tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 3811-3823

**Nerya,A O.,Ben-Arie R, Luzzatto Tal., Musaa R Khativa S, Vaya J.**(2006). Prevention of *Agaricus bisporus* postharvest browning with tyrosinase inhibitors. *Postharvest Biology and Technology* V 39, P 272–277

**Nicolas J., Billaud C.**(2006). Prévention du brunissement enzymatique. in *Les polyphénols en agroalimentaire*. P. Sarni-Manchado et V. Cheynier Eds. Paris, Tec et Doc. Lavoisier., 173-210.

**Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M. And Aubert, S.Y.**(1994)Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 109-157.

**Njagi J., Chernov ,M.M., Leiter L.C., Andreescu ,S.**(2010). Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.

**Nozue, M., Souri, M., Arakawa, D.,Kojima, M.** (1998).Purification and characterization of two isoforms of chlorogenic acid oxidase from sweet potato cells in suspension culture. *J. Plant Physiol.* 153, 552-557.

## O

**O'Donnell, K., Cigelnik, E., Weber, N.S., Trappe, J.M. (1997).** Phylogenetic Relationships among Ascomycetous Truffles and the True and False Morels Inferred from 18S and 28S Ribosomal DNA Sequence Analysis. *Mycologia* Vol. 89, pp. 48-65.

**Önez Z., Karakuş E., Pekyardimci Ş. (2008).** Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera* L.): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry*. 32, 396–414.

## P

**Papa, G., Pessione, E., Leone, V., And Giunta, C. (1994).** Agaricus bisporus tyrosinase—I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem*. 26: 215-221.

**Patil, S.S And Zucker, M. (1965).** Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of Biological Chemistry*. 240: 3938-3943

**Patnaik, P.R. (2002).** Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology*, ( 31), 198-200.

**Perez-Gilabert M., Morte A., G-Carmona, F. (2004).** Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science*. 166: 365–370

**Perez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M And Garcia-Carmona, F. (2001).** Monophenolase activity of latent *Terfezia clavaryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum*. 133: 203-209

**Pifferri P.G., Baldassari L., Cultrera R. (1974).** Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J. Sci. Food. Agric.*, 25, 263-270

**Polaina, J & Maccabe, A P. (2007).** Industrial enzymes: structure, function and applications .Springer, XII, 642 p

## Q

**Quarta, A, Mita, G., Durante, M., Arlorio, M., De Paolis, A. (2013).** Isolation of a polyphenol oxidase (PPO) cDNA from artichoke and expression analysis in wounded artichoke heads. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 68, Pages 52-60

**Queiroz ,C.,Maria,L M,Fialho ,E.,Vera.,Lúci,A.**(2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 24, 361–375

## R

**Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., & Hendrickx, M.** (2006). Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera ssp. Sativa*). *Food Chemistry*, 94, 253–261

**Reinhammar B., Malmström B. G.**(1981)."Blue"copper-containing oxidases. in *Copper Proteins*. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons: 109-149.

**Robert ,C., Rouch ,C., Cadet ,F.**(1997). Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem.*, 59, 355-60.

**Robinson, S.P., Loveys, B.R. And Chacko, E.K.** (1993). Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Aust. J. Plant Physiol*. 20, 99-107.

**Rodriguez C,S & Toca Herrera ,J.L.**(2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24 (5):500-13.

**Rodriguez-Lopez J. N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F.** (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem*. 267: 3801-3810

**Riousset ,G.,Chevalier,G., Riousset ,L.,. Bardet,M.C.**(2012). *Truffes d'Europe et de Chine*. Editions Quae,181 pages.

## S

**Saeidian ,S., Keyhani ,E., Keihani ,J.**(2007). Polyphenol oxidase activity in dormant saffron (*Crocus Sativus L.*) *Acta Physiol Plant*, 29: 463-471.

**Saeidian S , Bahaaldin,R.**(2013).Effect of Sodium dodecyl sulphate on partial purified polyphenol oxidase activity in Red and Green tomatoes (*Solanum Lycopersicum*). *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*.V1(7),691-700.

**Sakiroglu H., Kufrevioglu I.O., Kocacaliskan I., Oktay M., Onganer Y.,** (1996). Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis Rechst.*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 2982–2986.

**Samborska, K.**(2007). Enhancement of thermal stability of *Aspergillus oryzea* alpha-amylaze using stabilizing additives. *Acta Agrophysica.* 9: 233-244.

**Sanchez Ferrer,A.,Rodriguez-Lopez,J.N.,Garcia Canovas,F.,Garcia Carmona,F.** (1995) .Tyrosinase:a comprehensive review of its mechanism.*Biochim.Biophys .Acta* 1247 ,1–11.

**Saltarelli R, Ceccaroli P, Cesari P, Barbieri E, Stocchi V** (2008) Effect of storage on biochemical and microbiological parameters of edible truffle species. *Food Chem* 109:8–16.

**Serrdell,M.,Rozenfeld,P,A.,Martínez,G,A.,Civello,P,M.,Chaves,A,R.,Añón,M,C.b** (2000) . Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa, Duch., cv Selva*): characterisation and partial purification. *J of the Scie of Food and Agric* V80, pages 1421–1427.

**Seo, S.-Y., Sharma, V.K., Sharma, N.,**(2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.

**Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S.**(2004).Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183

**Sharma, N.M., Kumar, S., Sawhney, S.K.**(2003). A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38: 137-141.

**Shengmin Lu., Yaguang Luo., Hao Feng.**(2006). Inhibition of Apple Polyphenol Oxidase Activity by Sodium Chlorite. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3693-3696.

**Shi Y-L., Benzie I.F.F., Buswell J A.,**(2002). Role of tyrosinase in the genoprotective effect of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Life Sciences.* 70 : 1595–1608.

**Siegbahn, P.E.M.**(2003). The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem.* 8: 567-576.

**Simsek, S., & A. Yemenicioglu.**(2007).Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry.*

**Slama,A.,Neffati,M.,Boudabous,A.**(2010).Biochemical composition of desert truffle *Terfezia boudieri* Chatin. *Acta Horticulturae* 853:285–289, Proceedings of the International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, 2009

**Smith,S.E.,Read,D.J.**,(2008).MycorrhizalSymbiosis.3rdedn.AcademicPress,London

**Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y.**(2000). Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2071–4.

**Sojo, M.M., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F.,Sánchez-Ferrer, A.**(1998). Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 800 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4924-4930.

**Solomon, E.I., Chen, P., Metz, M., Lee, S-K., and Palmer, A.E. (2001).** Oxygen binding, activation and reduction to water by copper proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 4570-4590.

**Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., Thipyapong, P.**(1998). Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 23-250.

**Suriyan ,S , Pattama,P., Racha ,T.**(2012). Browning inhibition in fresh-cut rose apple fruit *cv. Taaptimjaan* using konjac.glucomannan coating incorporated with pineapple fruit extract. *Postharvest Biology and Technology*.v73.p46–49.

**Suttirak W., Manurakchinakorn S.**(2010). Potential Application of Ascorbic Acid, Citric Acid and Oxalic Acid for Browning Inhibition in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. *Walailak . J. Sci. Tech.*,7(1), 5-14.

## T

**Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J.**(2010). Amperometric Catechol Biosensor Based On Polyaniline–Polyphenol Oxidase. *Biosensors And Bioelectronics.* 25: 1681–1687.

**Todaro,A.,Cavallaro,R.,Argento,S., Brancand,F.,Spagna,G.**(2011).Study and Characterization of Polyphenol Oxidase from Eggplant (*solanum melongena* L.) *.J. Agric. Food Chem.*,59 (20),11244–11248.

**Tomita Y, Hariu A, Mizuno C, Seiji M.**(1980). Inactivation of tyrosinase by dopa. *J Invest Dermatol.*75(5):379-82.

**Tony C, De Rigal,D, Mbeguie,D, Gaillard,F, Richard-Forgetand,F,Bernard R.**(1999).Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol Oxidase ,Plant Physiology,vol. 119 no. 4 1261-1270

**Trappe,J.M.,Claridge,A.W.**(2010).The hidden life of truffles .Sci. Am .302 (4),78

**Trebst, A et Depka, B.**(1995). polyphenol oxydase and photpsynthesis research. Photosynththesis Research 46:41-44.

**Tuena De Gomez-Puyou, M & Gomez-Puyou, A.**(1998). Enzymes in Low Water Systems. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 33, No. 1, pp. 53-89

**Tulin, A. (2004).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*). *heads Food Chemistry* 87:59–67.

## U

**Ullah, M.R.**(1991). Tea. In Food Enzymotogy, (P.F. Fox, ed.) pp. 163-187, Elsevier Science Publishing, New York

**Umit,U.**(2007). Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry* ., 100, 909–913.

**Ünal M.Ü.**(2007.) Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry.*, 100, 909-913.

**Ünal, M. Ü & Şener, A.** (2006). Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera L. cv. Emir*). *J Sci Food Agric.* Vol. 86, pp. 2374–2379.

**Urszula G ., Urszula Z., Michal W.**(2007). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var. capitata L.*) *Food Chem.*, 8, 20-704

## V

**Vámos-Vigyázó, L.**(1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.

**Van Gelder,C.,W.G., Flurkey, W.H, Wichers, H.J.**(1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phyto-chemistry* 45, 1309- 1323.

**Virador, V.M., Grajeda, J.P.R., Blanco-Labra, L., Mendiola-Olaya, E., Smith, M, G., Moreno, A., Whitaker, J.R. (2010).** Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. *Agric. Food Chem.* , 58, 1189–1201.

**Voet, D., Voet, J.G. (2011).** *Biochemistry*, 4th Edition. Courier/Kendallville. USA.

## W

**WANG, J., JIANG, W., WANG, B., LIU, S., GONG, Z., AND LUO, Y. (2007).** Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. “Tainong”) pulp. *Journal of Food Biochemistry*. 31: 45–55.

**Webb KJ1, Cookson A, Allison G, Sullivan ML, Winters AL. (2013).** Gene expression patterns, localization, and substrates of polyphenol oxidase in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 7421 – 7430.

**WEEMAES C.A., LUDI KHUYZE L.R, VANDENBROECK I., HENDRICKS M.E., P.P. TOBBACK. (1998).** Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenol oxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums, *Lebensm. Wiss. Technol.* 31 :440e449.

**WEI L , LI-QIANG Z, JUN-PING L, ZHAO-QIN Z, CHENG-MEI L, RUI-HONG L. (2013)** The effect of citric acid on the activity, thermodynamics and conformation. *Food Chemistry* 140, 289–295.

**Wichers, H.J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C.F.M., Biancone, G., Hoerberichts, F.A. (2003).** Cloning, expression and characterization of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 336–341

**Whitaker, J.R. (1994).** *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, second ed. Marcel Dekker, New York. 271–556.

**Whitaker, J & Lee, C.Y. (1995).** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society : 2-7.

## X

**Xu, Y. M., A. H. Stokes, R. Roskoski, And K. E. Vrana.**(1998). Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *Journal of Neuroscience Research* 54 (5):691-697.

**Xuan, L., Yanxiang, G., Honggao, X., Qinfeng, H., Guangmin, L., Qi, W.**(2010). Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris L.*) extract with continuous high pressure carbon dioxide. *Food Chemistry* 119:108–113

## Y

**Yağar, H.**(2004). Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Celery. – Wong, T.C; Luh, B.S; and Whitaker, J.R. 1971. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes of Clingstone Peach. *Plant Physiol.* 48:19-23

**Yagar, H.,& Sagiroglu, A.** (2002) Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk. J. Chem.* Vol. 26, pp. 97-103.

**Yakup K.**(2012). Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentia*). *Process Biochemistry* 12/2012; 47-2449–2454.

**Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, K., Kashiwada, A., Matsuda, K., and Hirata, M.**(2005). Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829

**Yang, C., Fujita, S., Ashraf-Uzzaman, M., Nakamura, N. And Hayashi, N.** (2000). Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum L.*) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48,2732-2735

**Yang, Y & Wang, Z.**(2008). Some Properties Of Polyphenol Oxidase From Lily. *International Journal Of Food Science And Technology* 43: 102-107.

**Yemenicioglu, A., Zkan, M., Cemeroglu, B.**(1997). Heat inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510

**Yemenicioglu, A & Cemeroglu, B.**(2003). Consistency of Polyphenol Oxidase (PPO) Thermostability in Ripening Apricots (*Prunus armeniaca L.*): Evidence for the Presence of

Thermostable PPO Forming and Destabilizing Mechanisms in Apricots. *J. Agric. Food Chem.* 51:2371-2379.

**Yemenicioğlu, A.**(2002). Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.

**Ylostalo, J., Srivastava, K and Flurkey, W.H.**(2001). Characterization of a tyrosinase isoform from the cap skin of Portabella mushrooms. *Journal of Food Biochemistry.* 25: 493-507.

**Yoruk, R & Marshall, M.R.,**(2003). Physiochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Chem.* 27,361–422.

**Yue-Ming, J., Zauberman, G., and Fuchs, Y.**(1997). Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biology and Technology.* 10: 221–228.

## Z

**Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., Eskin, N.A.M.**(1991). Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods.* D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.

**Zarivi, O., Bonfigli, A., Cesare, P., Amicarelli, F., Pacioni, G., Miranda, M.** (2003). Truffle thio- flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters.* 220: 18-88.

**Zarivi, O., Bonfigli, A., Colafarina, S., Aimola, P., Ragnelli, AM., Pacioni, G., Miranda M.**(2011). Tyrosinase expression during black truffle development: from free living mycelium to ripe fruit body. *Phytochemistry.* 72(18):2317-24.

**Zinkernagel V.**(1986). Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol.* 115, 257-266

**Zhang, G.H., Wang, Y.F., Zhang, X.Q., Nag, T.Z., Wang, H.X.**(2010). Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. *Process Biochemistry.* V45, Pages 627–633

**Zhang,Y.,Wang,Y., Zhou,L., Liao,X.**(2010). A comparative study of inactivation of peach polyphenol oxidase and carrot polyphenol oxidase induced by high-pressure carbon dioxide. *International Journal of Food Science & Technology*,V(45,11), p 2297–2305.

**Zhou,H,W & Feng,X.**(1991). Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*,V57, p 307–313.

**Ziyan, E & Pekyardimci,S.**(2003). Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem.* 27: 217-225.

**Ziyan, E And Pekyardimci, S.**(2004).Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.*28:547-557.