

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat
Faculté des Sciences
Département de Biologie

جامعة عمار ثليجي - الأغواط -
كلية العلوم
قسم البيولوجيا



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie
Option : Génie biologique*

Thème

**Etude de l'inhibition de la tyrosinase (EC 1. 10. 3. 1)
des truffes de désert (*Terfezia leonis* Tul.) par le
cyanure de potassium**

Présenté par :

M^{me}. Gourine Fatima Zohra.

M^{me}. Benmessaoud Aicha Mamma.

Soutenu le, 10 Juin 2012 devant le Jury composé de :

M. Chaibi Rachid Maître Assistant à l'Université Amar Telidji-Laghouat (Président).

M. Khiari Mohamed Maître Assistant à l'Université Ziane Achour-Djelfa (Examinateur).

M. Gouzi Hicham Maître de Conférences à l'Université Amar Telidji-Laghouat (Encadreur).

M. Leboukh Mourad Maître Assistant à l'Université Amar Telidji-Laghouat (Co-Encadreur).

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat
Faculté des Sciences
Département de Biologie

جامعة عمار ثليجي - الأغواط -
كلية العلوم
قسم البيولوجيا



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie
Option : Génie biologique*

Thème

**Etude de l'inhibition de la tyrosinase (EC 1. 10. 3. 1)
des truffes de désert (*Terfezia leonis* Tul.) par le
cyanure de potassium**

Présenté par :

M^{me}. Gourine Fatima Zohra.

M^{me}. Benméssaoud Aicha Mamma.

Soutenu le, 10 Juin 2012 devant le Jury composé de :

M. Chaibi Rachid Maître Assistant à l'Université Amar Telidji-Laghouat (Président).
M. Khiari Mohamed Maître Assistant à l'Université Ziane Achour-Djelfa (Examineur).
M. Gouzi Hicham Maître de Conférences à l'Université Amar Telidji-Laghouat (Encadreur).
M. Leboukh Mourad Maître Assistant à l'Université Amar Telidji-Laghouat (Co-Encadreur).

Dédicaces

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

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

A celle qui a inséré le goût de la vie et le sens de responsabilité ma MERE. A celui qui a été toujours la source de l'inspiration et le courage mon PERE. Je vous dis merci et je vous adore, que DIEU vous garde pour nous.

A mon Mari qui a été toujours à mes côtés pour m'aider, m'encourager et me Conseillé et à toute sa famille.

A mes chers frères : Ahmed, Bachir et Yacine, vous êtes les meilleurs dans le monde.

A la mémoire de mes grands-parents.

A toute ma famille : GOURINE et SACI.

A ma chère amie intime et ma confidente Aicha avec qui j'ai partagé une tranche de ma vie universitaire.

A mes collègues groupe de révision : Ahmed, Aicha, Amine, Dahou Farouk, Oussama et Tidjani. Merci pour votre aide et votre soutien durant le pire et les moments de joie que nous avons partagés durant ces cinq ans.

Fatima...

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A ALLAH le tout puissant

Qui a illuminé mon chemin et qui m'a armé de courage et de foi pour achever mes études.

A la mémoire de mes parents

Pour m'avoir faite, telle que je suis, et pour toujours m'avoir soutenue, que ce soit affectivement, moralement ou financièrement, afin que je parvienne ou je suis aujourd'hui.

A mon mari

Merci pour ta patience, ton soutien, tes conseils, ta compréhension, et ta tolérance.

A mon fils "Anes"

A toi mon diamant rare

Que Dieu te protège et te prête bonne santé et longue vie.

A mes chers frères et sœurs

Qui m'ont soutenu dans les moments les plus durs je ne les remercierais jamais assez.

A notre groupe de révision «surtout mon binôme Fatima»

Merci pour vos aides et vos soutiens morales durant le pire et pour tous les moments de joie et de tristesse que nous avons partagés.

A tous ce qui ont contribué de près ou de loin dans l'élaboration de ce mémoire, seront toujours dans mon cœur.

Aicha...

Remerciements

Les recherches exposées dans ce mémoire ont été menées à l'Université de Laghouat, au sein de laboratoire d'enzymologie, sous la direction de Messieurs GOUZI Hicham et LËBOUKH Mourad, enseignants-Chercheurs au département de biologie de l'Université de Amar Tèlidji de Laghouat.

Lorsqu'un mémoire s'achève, un désire s'empare de nous afin de remercier chacune des personnes dont la contribution a permis à ce travail de voir le jour qui est pour nous le point de départ d'une merveilleuse aventure, celle de la recherche, source de remise en cause permanente et de perfectionnement perpétuelle, et qui a bénéficié des conseils scientifique des uns, de l'appui moral et de soutien des autres.

En premier lieu, nous tentons à remercier DIEU Miséricordieux le tout puissant qui nous a donné la force, la volonté et le savoir pour poursuivre nos études et réalisé ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances à notre encadreur M Gouzi Hicham et notre co-encadreur M LËBOUKH Mourad pour nous avoir confiées un travail aussi intéressant et pour leurs soutiens, leurs orientations et leurs prodigieux conseils durant nos travaux,

Nous exprimons toutes nos gratitudes à Monsieur le président de jury de l'honneur qu'il nous fait de présider ce mémoire.

Nous remercions Monsieur l'examineur et lui sommes reconnaissantes de l'intérêt qu'il lui a accordé.

Nous remercions aussi Oum-elkheir pour son soutien, sa gentillesse et sa bonté.

Nos remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui ont contribué à l'obtention de ce diplôme de loin ou de près sans exception.

RESUME

Ce travail avait pour objectif d'étudier le mécanisme d'inhibition de la PPO responsable du brunissement enzymatique des truffes par le KCN en utilisant le catéchol, le 4-méthylcatéchol et le pyrogallol comme substrats. L'activité catécholase de la PPO a été mesurée par spectrophotométrie à 410 nm, 400 nm et 420 nm respectivement, à pH 7.0 et à 30°C.

La PPO catalyse efficacement le 4-méthylcatéchol comme substrat ($K_m=0.21\text{mM}$). La représentation de Lineweaver-Burk indique que le KCN est un inhibiteur non compétitif des activités di- et triphénolase. Le degré d'inhibition dépend de la concentration du KCN et du type de substrat ainsi que la source d'enzyme. Le KCN inhibe réversiblement l'activité de la PPO de truffe. L'activité triphénolase de la PPO est fortement inhibée par le KCN car la valeur d' IC_{50} est la plus faible ($13.28\pm 0.72\ \mu\text{M}$).

Mots-clés : Truffe, Brunissement enzymatique, PPO, Inhibition, Inhibiteurs, cinétique, IC_{50} .

ملخص

كان الهدف من هذا العمل دراسة آلية تثبيط البوليفينول أكسيداز المسؤول عن التشوه الإنزيمي للكمامة بواسطة سيانيد البوتاسيوم وذلك باستخدام الكاتيكول و4-مethyl كاتيكول و البيروقالول كدعامات. توبع اختبار تثبيط نشاط الكاتيكولاز بواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي على طول موجات 410 نانومتر، 400 نانومتر و 420 نانومتر بالترتيب ودرجة حموضة 7.0 و 30° م .

تحفز البوليفينول أكسيداز بطريقة جد فعالة 4-methyl كاتيكول ($K_m=0.21\text{Mm}$). أظهرت بيانات لينويفر و بارك بلن سيانيد البوتاسيوم مثبت من نوع الغير تنافسية لنشاطات ثنائيات و ثلاثيات الفينولاز إن درجة التثبيط متعلقة بتركيز سيانيد البوتاسيوم في الوسط التفاعلي و نوع الدعامات وكذا منبع الإنزيم. يثبط سيانيد البوتاسيوم بللية رجعية نشاط OPP الكمأة. النشاط الأكثر تثبيطاً من طرف سيانيد البوتاسيوم هو ثلاثي الفينولاز لأن قيمة IC_{50} هي الصغرى ($13.28\pm 0.72\text{M}\mu$).
الكلمات المفتاحية : الكمامة، التشوه الإنزيمي، PPO، تثبيط، مثبطات، حركية، CI_{50} .

ABSTRACT

This work aimed to study the mechanism of inhibition of the PPO responsible for the enzymatic browning of truffles by the KCN by using the catechol, the 4-methylcatechol and pyrogallol as substrates. The catecholase activity of the PPO was measured by spectrophotometry with 410 nm, 400 nm and 420 nm, respectively, with pH 7.0 and 30C.

The PPO catalyses effectively the 4-méthylcatéchol like substrate ($K_m = 0.21\text{mM}$). The representation of Lineweaver-Burk indicates that the KCN is a noncompetitive inhibitor of the di- activities and triphenolase. The degree of inhibition depends on the concentration of cyanide and the type of substrate as well as the source of enzyme. The KCN reversibly inhibits the activity of the truffle PPO. The triphenolase activity of the PPO is strongly inhibited by the KCN because the value of IC_{50} is lowest ($13.28\pm 0.72\ \mu\text{M}$).

Key words: Truffle, enzymatic browning, PPO, Inhibition, Inhibitors, Kinetics, IC_{50} .

SOMMAIRE

CHAPITRE 1. INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
2.1 Les truffes	5
2.1.1 Historique.....	5
2.1.2 Définition.....	5
2.1.3 Classification.....	8
2.1.4 La répartition géographique des truffes en Algérie.....	8
2.2 La polyphénoloxydase	10
2.2.1 Le brunissement enzymatique des fruits et légumes.....	10
2.2.2 Aspects économiques du brunissement enzymatique.....	11
2.2.3 Rôle physiologique des polyphénols oxydases.....	11
2.2.4 Caractéristiques réactionnelles et structurales des polyphénols oxydases.....	12
2.2.5 Les différents sous-groupes de PPO.....	12
2.2.5.1 Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1).....	12
2.2.5.2 Activité catécholoxydase (EC 1.10.3.1).....	13
2.2.5.3 Activité laccase (E.C. 1.10.3.2).....	14
2.2.6 Mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique.....	14
2.2.7 Caractéristiques du site actif.....	16
2.2.8 Substrats phénoliques et spécificité enzymatique.....	17
2.2.9 Prévention du brunissement enzymatique.....	19
2.2.9.1 Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique.....	20
2.2.9.2 Moyens chimiques de contrôle du brunissement enzymatique.....	21
CHAPITRE 3. MATÉRIELS ET MÉTHODES	24
3.1 Matériels.....	25
3.1.1 Matériel biologique.....	25
3.1.2 Produits chimiques.....	25
3.2 Méthodes.....	25
3.2.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO.....	25
3.2.2 Détermination de l'activité PPO.....	26
3.2.3 Détermination du type d'inhibition de la PPO de truffe par le cyanure.....	26
3.2.4 Détermination de l'IC ₅₀	27
3.2.5 Effet de la concentration de l'enzyme.....	27

3.3 Analyse des résultats expérimentaux.....	27
CHAPITRE 4. RESULTATS ET DISCUSSION.....	28
4.1 Spécificité de substrat de la PPO de truffe (<i>Terfezia leonis</i> Tul.).....	29
4.2 Etude cinétique de l'inhibition de la PPO de truffe par le cyanure de potassium...	31
4.3 Effet du cyanure du potassium sur la PPO de truffe.....	35
4.4 Effet de la concentration de l'enzyme.....	37
CHAPITRE 5. CONCLUSION GENERALE.....	38
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	40

Liste des figures

Figure 1: La fissuration du sol sableux révèle la présence d'une truffe du désert, dans ce cas une espèce <i>Terfezia</i> (Loizides et al., 2012).....	5
Figure 2: <i>Terfezia arenaria</i> est l'espèce la plus répandue et <i>Terfezia</i> pousse en association avec <i>Helianthemum</i> (Loizides et al., 2012).....	6
Figure 3: <i>Terfezia claveryi</i> est une autre espèce qui se développe avec <i>Helianthemum</i> . La glèbe marbrée rosée, est visible dans l'échantillon de coupe (Loizides et al., 2012).....	7
Figure 4: <i>Tirmania nivea</i> est la Truffe de désert très répandue en Afrique du Nord et le Moyen-Orient (Loizides et al., 2012).....	7
Figure 5: Position des Terfèzes dans la classification des ascomycètes (Trappe, 1979 ; Delmas, 1989).....	8
Figure 6: La répartition géographique de <i>Terfezia</i> et <i>Tirmania</i> dans les régions du sud et de l'ouest d'Algérie (Loumani, 1999).....	9
Figure 7: Représentation Schématique de la réaction d'oxydation par la PPO (Fang C, 2007).....	10
Figure 8: Formation des quinones catalysée par la diphénoloxydase en présence d'oxygène (CHERIOT S, 2007).....	13
Figure 9: Formation des mélanoidines à partir de la tyrosine (adapté de Lerner, 1953), (CHERIOT S, 2007).....	13
Figure 10: Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases (CHERIOT S, 2007).....	14
Figure 11: Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la tyrosinase (d'après Lerch, 1995), (CHERIOT S, 2007).....	16
Figure 12: Structures de composés phénoliques substrats des polyphénoloxydases (CHERIOT S, 2007).....	18
Figure 13: <i>Terfezia leonis</i> Tul d'Algérie (Wilaya de Djelfa), (Benmebarek S, Chaher F, 2011).....	25
Figure 14: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition des activités diphénolase et triphénolase de la PPO de truffe (<i>Terfezia leonis</i> Tul.) sur le catéchol (A), le 4-méthyle catéchol (B) et le pyrogallol (C) par le cyanure de potassium. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm ES.....	34
Figure 15: Effet de la concentration du cyanure de potassium sur la l'oxydation de catéchol (A), de 4-méthylcatéchol (B) et du pyrogallol (C) par la PPO de truffe (<i>Terfezia leonis</i> (Tul.). Les conditions d'essai : 30°C, 1.0 ml de milieu réactionnel contient 0.05 M de tampon phosphate de sodium (pH 7.0). Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm ES.....	36
Figure 16: Vitesse initiale de l'oxydation du catéchol en fonction de la concentration de la PPO de truffe (<i>Terfezia leonis</i> Tul.) en absence et en présence de cyanure de potassium.....	37

Liste des tableaux

Tableau 1: Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de McEvily et al., 1992), (CHERIOT S, 2007).....	22
Tableau 2: La constante de Michaelis-Menten (K_m), la vitesse maximale (V_{max}) et la spécificité (V_{max}/K_m) de la réaction d'oxydation de catéchol, le 4-méthyle catéchol et le pyrogallol par la PPO obtenue à partir de différentes sources.....	30
Tableau 3: Types d'inhibition, K_{IS} et IC_{50} de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> avec le catéchol, le 4-méthylcatéchol et le pyrogallol comme substrats.....	32
Tableau 4: Les valeurs d' IC_{50} de cyanure trouvées pour la PPO obtenue à partir de différentes sources.....	35

CHAPITRE 1.

INTRODUCTION GENERALE

Les truffes sont considérées comme l'une des plus anciennes denrées alimentaires connues (Al-Rahmah, 2001) pour leurs valeurs nutritives et leur goût délicieux, surtout lorsqu'on les compare avec de la viande et le poisson (Al-Delaimy, 1977). Les truffes sont une source riche en fibres brutes (7-13%), protéines (20-27%), matières grasses (3 à 7,5%), acide ascorbique (2-5%) et des minéraux (Al-Naama et al., 1988 ; Bokhary et al., 1989). Bien que ces attributs culinaires contribuent à la valeur de la truffe sur le marché libre, des enquêtes plus récentes ont montré que les truffes possèdent des bioactivités y compris des bioactivités antioxydantes (Al-Laith, 2010 et Murcia et al., 2002) , antivirales (Hussan et Al-Ruqaie, 1999), antimicrobiennes (Janakat et al., 2004 et Janakat et al., 2005), hépatoprotecteurs (Janakat et Nassar, 2010), anti-mutagènes et anti-inflammatoires.

Les truffes du désert appelées localement "Eterfès ou Al-Kamaa", sont nutritives saisonnières et socio-économiques sont des champignons comestibles importants à l'état sauvage dans la partie sud de l'Algérie. Elles sont distribuées naturellement autour de la Méditerranée, l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient. Parmi les différentes variétés de truffes de désert comestibles connues, seulement deux espèces de truffes de couleur brune foncée appartenant au genre *Terfezia* et une espèce de truffe de couleur blanche appartenant au genre *Tirmania* se trouvent sur la péninsule arabe (Al-Rahmah, 2001). Elles ont une grande valeur économique et, parmi tous les autres champignons, sont les plus chères du monde. Chaque kilogramme de truffes est vendu dans le marché libre à partir de 600€-6000€ selon les espèces (Luard, 2006). Visuellement, les truffes ont des caractéristiques physiques différentes qui les rendent très facile de les distinguer des autres champignons (Brown et Zambonelli, 2007; Luard, 2006). Les truffes matures ont tendance à être ferme, dense, et boisé (Hall et al., 2007). Comme pour beaucoup d'autres denrées alimentaires d'origine végétale, la durée de conservation des truffes du désert est limitée à quelques jours, principalement en raison de brunissement enzymatique qui fait suite à l'altération lors 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). Les enzymes responsables de ce phénomène appartiennent à la famille des polyphénols oxydases (PPO) qui peut exposer l'activité catécholase, c.-à-d. l'oxydation d'o-diphénols en o-quinones et/ou l'activité crésolase, c.-à-d. l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols suivie d'une oxydation en o-quinones. Ces o-quinones ont une forte tendance à se polymériser, conduisant à la formation de pigments bruns (Varoquaux, 1978). Ces réactions d'oxydation observées dans les produits alimentaires, qu'elles soient catalysées ou non par des enzymes, nuisent fréquemment à leurs qualités organoleptiques et

nutritionnelles (Cheriot, 2007). C'est pour cela, l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO, en particulier par l'intermédiaire d'un traitement chimique, est un défi majeur de l'industrie alimentaire pour le contrôle du brunissement des aliments. En plus de leur pertinence pour la conservation des aliments, ces données peuvent être utiles pour l'analyse et la sécurité alimentaire où pour les biocapteurs à base de la PPO pour la détermination du cyanure. Cet examen mettra l'accent sur la recherche effectuée sur les biocapteurs basés sur l'inhibition de l'enzyme pour la détermination des polluants et de composés toxiques ont attiré une grande attention (Amine, 2006), selon Robb (1984) le cyanure fait partie des espèces chimiques simples capables de se fixer avec le cuivre, et se comporte en tant qu'inhibiteur purement compétitif vers la fixation du dioxygène. Bien avant Harry et *al.* (1969) avaient rapporté que le cyanure était un inhibiteur très puissant de la PPO du champignon et se comporte comme un inhibiteur non compétitif vis-à-vis du catéchol. Et d'après Tülin (2003) une concentration de 1 mM du cyanure de potassium inhibe 51% de l'activité de PPO d'artichauts (*Cynara scolymus L.*).

Notre projet de fin d'étude présenté en quatre parties est séquencé comme suit.

La première partie concerne une synthèse bibliographique sur les truffes de désert Algérien (*Terfezia leonis Tul*) et sur le brunissement enzymatique et sa prévention et sur la PPO. Dans la seconde partie, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales.

La troisième partie est consacrée à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de cette étude. Les paramètres cinétiques et les constantes d'inhibition ont été déterminés pour pouvoir élucider les mécanismes d'inhibition observés.

Nous présenterons les résultats des cinétiques d'inhibition de l'activité catécholase de la PPO par le cyanure. Afin de déterminer les valeurs d'IC₅₀, nous présenterons les résultats expérimentaux de l'effet de la concentration de l'inhibiteur sur l'activité catécholase.

Pour terminer, une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur l'inhibition de la PPO sont présentées.

CHAPITRE 2.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Les truffes

2.1.1 Historique

Et quand la rosée a disparu, sur la face de la terre qui était une petite chose ronde ; comme de petites gouttes de glace sur la terre ... Moïse leur dit, c'est le pain que le Seigneur a donné pour que tu manges ... Que rien ne se réserve jusqu'au matin. Mais il ne fit pas attention à certains d'entre eux qui gardaient une certaine quantité et il y avait des vers dedans et ça puait ... Et ce pain a été nommé Manna par la maison d'Israël (Loizides et *al.*, 2012) il était blanc, comme une graine de céréales et il avait un goût de gâteaux faits avec du miel. Selon plusieurs (Tulasne et Tulasne, 1851), cette description se réfère aux truffes du désert.

2.1.2 Définition

Le terme truffe est utilisé pour décrire les espèces du genre *Terfezia* et *Tirmania*, mais aussi des espèces moins connues du genre *Picoa*, *Mattiolomyces* et *Loculotuber*. Ces champignons hypogés fascinants ont évolué dans les conditions dures et néfastes dans les régions arides et semi-arides du Moyen-Orient, l'Afrique du Nord et la Méditerranée orientale, formant à la fois des associations ectomycorhizal et endomycorhizal avec des plantes de la famille des *Cistaceae* et spécialement avec le genre *Helianthemum*. Contrairement à l'espèce *Tuber* qui peut atteindre jusqu'à 30 cm sous la surface de la terre, les Truffes de désert sont assez proches de la surface pour être détectés sans l'aide des chiens ou des porcs. Elles sont généralement repérées par le gonflement distinct ou une fissure sur le sable à cause de leur maturité (Figure 1), tandis que dans le cas de *Tirmania nivea*, le corps du fruit entier émerge souvent dans le sable, et apparaissant comme une petite pierre blanche (Loizides et *al.*, 2012).



Figure 1 : La fissuration du sol sableux révèle la présence d'une truffe du désert, dans ce cas une espèce *Terfezia* (Loizides et *al.*, 2012).

L'espèce la plus répandue de toutes les truffes est probablement *Terfezia arenaria* (= *Terfezia leonis*) (Figure 2), qui se trouve dans des sols sableux acides à travers la Méditerranée, ainsi que l'Afrique du Nord, l'Asie Mineure et le Moyen-Orient en association avec *Tuberaria* (= *Helianthemum*) et surtout *Terfezia guttata*. Le corps de fruits est de 3-7 cm de largeur, sous forme d'une sphère irrégulière ou en forme d'une poire, avec une base courte et étroite portant parfois les fils mycéliens. La surface extérieure est lisse ou vaguement tomenteuse, souvent fissurée, de couleur blanchâtre, rosâtre, ocre rose, rose rougeâtre ou brunâtre (Loizides et al., 2012).



Figure 2 : *Terfezia arenaria* est l'espèce la plus répandue et *Terfezia* pousse en association avec *Helianthemum* (Loizides et al., 2012).

La glèbe est élastique, marbrée, d'abord blanchâtre ou rosâtre, plus tard, vert grisâtre ou gris rougeâtre et enfin brun, avec un cadre agréable, l'odeur est vaguement spermatique. Les spores sont sphériques avec une épaisseur de 16-19 μm , des arrondis ou des tronquées verrues jusqu'à 7 μm de long. Les asques sont sphériques ou subsphériques, avec 8 spores, 80-100 x 60-87 μm . *Terfezia clavaryi* (Figure 3) est une autre espèce fréquente, s'accroît aussi en association avec *Helianthemum* et gastronomiquement elle est considérée supérieure à *Terfezia arenaria*. Le corps du fruit est de 3-12 cm de largeur, irrégulièrement sphérique, en forme de poire ou de pomme de terre, avec une base rudimentaire. La surface extérieure est sèche, souvent lobé, beige, ocre beige ou beige rosé, à maturité devient brun rougeâtre, brun grisâtre ou brun noirâtre (Loizides et al., 2012).



Figure 3 : *Terfezia claveryi* est une autre espèce qui se développe avec *Helianthemum*. La glèbe marbrée rosée, est visible dans l'échantillon de coupe (Loizides et *al.*, 2012).

La glèbe est élastique, généralement en marbre, de couleur blanchâtre, devenant rose, blanc rosé ou beige rosé, souvent avec des tons jaunâtres, avec une légère odeur spermatique. Les spores sont sphériques, 19-22.5 μm avec des verrues jusqu'à 2 μm de long, formant un motif réticulé. Les asques sont ovales ou subsphériques, avec 8 spores, 65-90,5 x 50-75 μm .

L'annexe *Tirmania nivea* (figure 4) est plus fréquent en Afrique du Nord et le Moyen-Orient, où il est connu sous le nom de Zoubaidi, Terfez ou Fagaa et est considéré largement comme le meilleur de toutes les truffes du désert, et se diffère de l'espèce *Terfezia leonis* dans ses spores lisses et ses asques amyloïdes. Le corps du fruit est de 5-12 cm de largeur, irrégulièrement sphérique, en forme de poire ou lobé, généralement avec une base conique. La surface extérieure est blanche ou crème, avec de l'ocre, ocre-rouille ou ocre-brun avec des taches et des fissures à la maturité (Loizides et *al.*, 2012).



Figure 4 : *Tirmania nivea* est la Truffe de désert très répandue en Afrique du Nord et le Moyen-Orient (Loizides et *al.*, 2012).

La glèbe est compacte, élastique et blanche, souvent avec des tons rose pâle ou ocre et non distinctes des veines blanches. elle a une odeur douce et agréable. Les spores sont lisses ovales à ellipsoïdes, 14-18 x 10-14 µm et les asques sont fortement amyloïde, 60-105 x 40-55 µm (Loizides et *al.*, 2012).

2.1.3 Classification

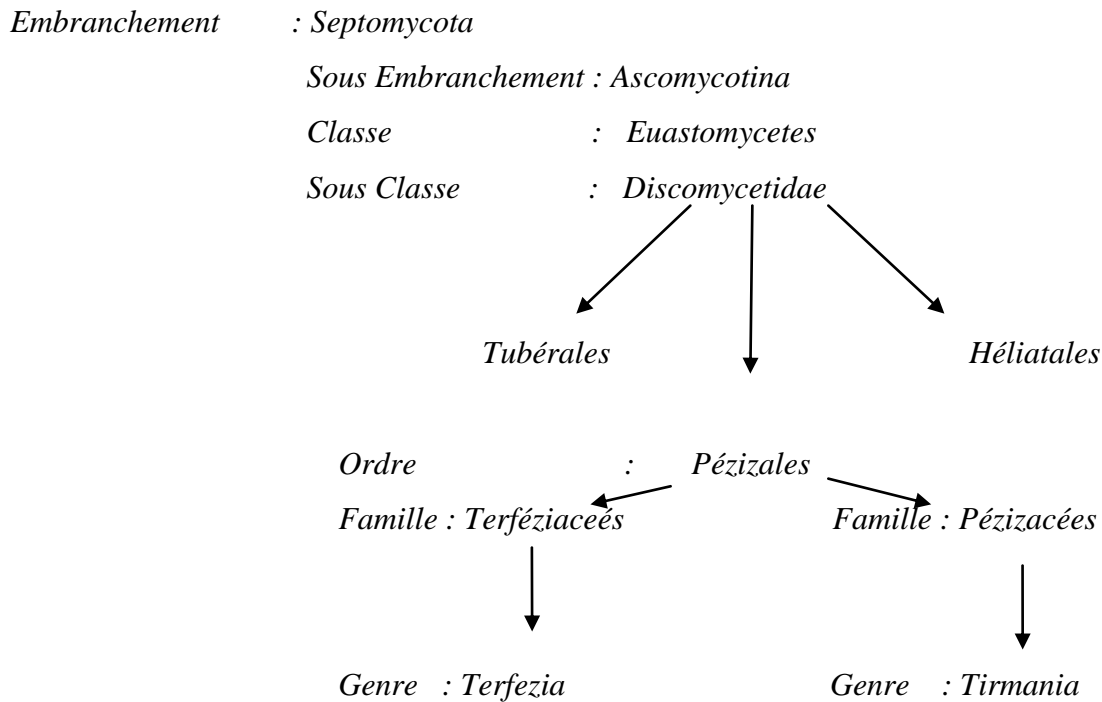


Figure 5 : Position des Terfèzes dans la classification des ascomycètes (Trappe, 1979 ; Delmas, 1989).

Les espèces les plus connues sont: *Terfezia leonis*, *Terfezia clavery*, *Tirmania nivea*, *Tirmania pinoyi*, *Tirmania leptoderma*, *Tuber melanobosporum*, *Tuber brumale*, *Tuber aestivum (uncnatum)*, et *Tuber uncinatum* ; chacune d’entre elles possède des critères qui lui est spécifique (Calonge et *al.*, 1977; Pegler, 2002; Hall et *al.*, 2008).

2.1.4 La répartition géographique des truffes en Algérie

Plusieurs espèces se trouvent dans le bassin méditerranéen. En Afrique du nord on signale la présence d’une douzaine d’espèces dont les plus abondantes sont : *Terfezia leonis* Tul, *Terfezia boudieri* Chat, et *Tirmania pinogi* Maire.

Dans le sud-est algérien ; sud de Biskra ; Barika (région de Batna) et Laghouat, les espèces les plus répandues sont : *Terfezia boudieri*, *Terfezia claveryi* et *Tirmania nivea*. Dans les hauts plateaux l’espèce la plus répandu est *Terfezia leonis* (Figure 6).

Au Maghreb les espèces les plus répandues sont : *Terfezia arenaria* Tul, *Terfezia boudieri* Tul, *Terfezia claveryi* hat, *Terfezia leptoderma* Tul, *Terfezia eremita* Malecon, *Tirmania pinoyi* et *Terfezia Nivea*.

Au centre Marocain ; Ksar, Es souk, Bou-Bernous, sud-est de Boudnibet et figuig on rencontre *Terfezia claveryi*. Entre Rabat et tanger, l'espèce la plus répandue est *Terfezia arenaria*.

En Europe, le genre *Terfezia* présente quelques rares espèces dont les plus répandues sont : *Terfezia claveryi* chatin, *Terfezia arenaria* Maris trappe, et *Terfezia heptoderma* Tul.

Au Moyen Orient quatre espèces sont connues : *Terfezia claveryi* chatin, *Terfezia boudieri*, *Tirmania pinoyi*, et *Tirmania nivea*. Elles sont très répandues dans les zones plus ou moins désertiques du Koweït et des pays voisins (Syrie et Iraq). En Chine, il y'a une seule espèce connue *Terfezia arenaria* (Bessaih, 1994).

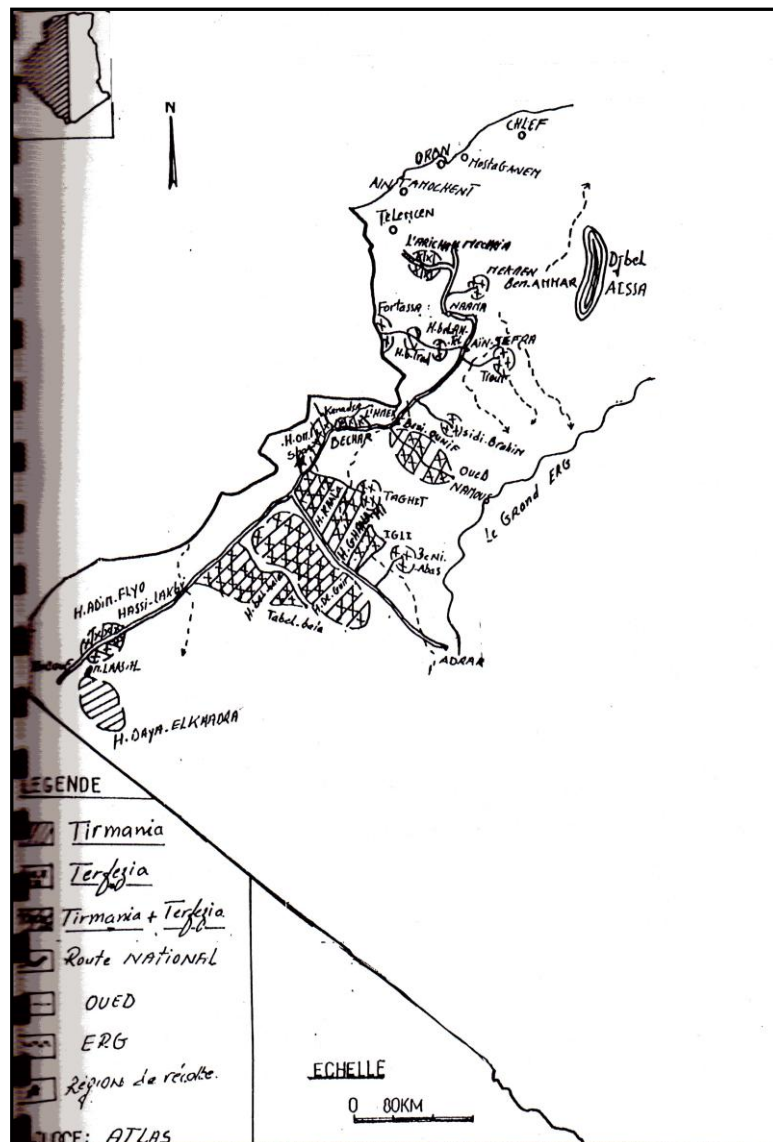


Figure 6 : La répartition géographique de *Terfezia* et *Tirmania* dans les régions du sud et de l'ouest d'Algérie (Loumani, 1999).

2.2 La polyphénol oxydase

2.2.1 Le brunissement enzymatique des fruits et légumes

Parmi les caractéristiques organoleptiques des aliments, la couleur est l'une des propriétés principales pour évaluer la qualité des aliments par les consommateurs. Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte le plus la couleur des fruits et des légumes. Mais ce phénomène peut également se produire lors de la transformation et le stockage de certains fruits de mer. Il ne sera ici question que du brunissement enzymatique des fruits et légumes catalysé par la polyphénoloxydase (1,2 benzènediol ; oxygène oxydoréductase, EC.1.10.3.1) notée PPO. Cette appellation regroupe également les termes de phénoloxydase, phénolase, monophénoloxydase, diphénoloxydase et tyrosinase (Marshall et *al.*, 2000). La PPO est une enzyme du cuivre associée à deux sites de liaison pour les substrats phénoliques. Elle était d'abord été considéré comme un tétramère contenant quatre atomes de cuivre par molécule dans les champignons (Jolley et *al.*, 1974). La PPO est localisée dans le chloroplaste lié aux membranes des thylakoïdes (Golbeck et Cammarata, 1981). Elle est activée lors de sa libération dans le cytosol quand les tissus végétaux subissent des dommages physiques tels que des ecchymoses, des coupures ou des mélanges. En présence d'oxygène atmosphérique et de la PPO, le monophénol est hydroxylé en o-diphénol (activité monophenolase ou crésolase), et le diphénol peut être oxydé en o-quinones (activité diphénolase ou catécholase). Les o-quinones générés, instables très réactives réagissent ensuite entre eux, les acides aminés ou les protéines sont en train de devenir marron, rouge ou noir ce sont des polymères hétérogènes responsables de la perte de qualité dans de nombreux aliments (Matheis et Whitaker, 1984; Carmona et *al.*, 1988) (Figure 7).

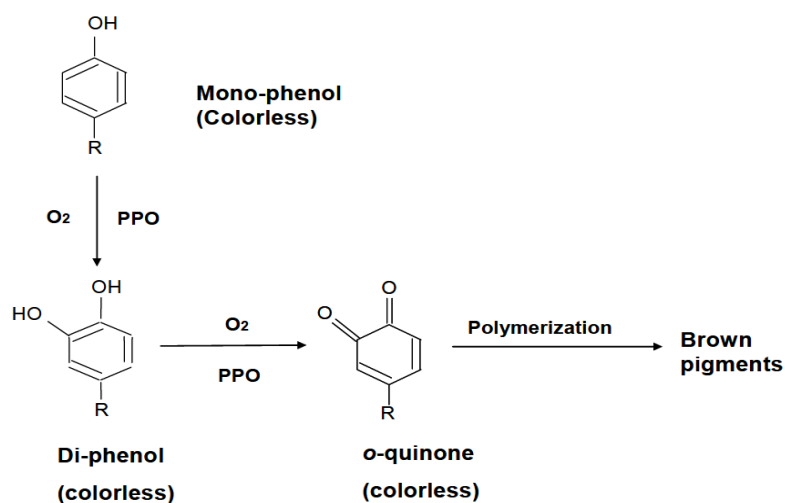


Figure 7 : Représentation Schématique de la réaction d'oxydation par la PPO (Fang, 2007).

2.2.2 Aspects économiques du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique peut parfois être très bénéfique à l'acceptabilité du produit par le consommateur. En effet, que ce soit pour le thé noir, ou vert, le brunissement enzymatique est nécessaire au développement de leur couleur et flaveur au cours du procédé de fabrication. De même, l'apparition de la couleur du cacao est facilitée par le brunissement enzymatique lors de la fermentation et le séchage des fèves. Les polyphénoloxydases sont par ailleurs responsables de la couleur dorée caractéristique des fruits secs (raisins, prunes, dates et figes). Or, le thé, le café et le chocolat sont des marchandises essentielles à l'économie de certains pays émergents tels que l'Inde, la Chine, le Sri Lanka ou le Kenya (Ensminger et *al.*, 1995). Cependant, le brunissement enzymatique est aussi une réaction très néfaste pour le marché des fruits et légumes. Mal contrôlé, ce phénomène est responsable de plus de la moitié des pertes économiques dans ce secteur (Whitaker et Lee, 1995). Ces lourdes pertes ont suscité un intérêt considérable dans la compréhension et le contrôle de l'activité polyphénol oxydase dans les aliments. Les salades et autres légumes feuillus, les pommes de terre et autres tubercules riches en amidon tels que les patates douces, l'igname, de même que les champignons, les pommes, les bananes, les pêches et encore beaucoup d'autres fruits ou légumes sont sensibles au brunissement enzymatique. Ils peuvent donc être l'objet de pertes économiques pour tous les acteurs du secteur de la transformation des fruits et légumes. Ces pertes sont d'autant plus grandes que la détérioration des produits a lieu en fin de chaîne de production, peu de temps avant l'achat par le consommateur alors que des coûts (stockage, manutention, de transport) ont déjà été engendrés. Il est donc primordial de contrôler le brunissement enzymatique depuis la récolte jusqu'à l'achat par le consommateur afin de minimiser les pertes et maintenir la valeur économique du produit.

2.2.3 Rôle physiologique des polyphénols oxydases

Les PPO ont été découvertes dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles sont majoritairement présentes dans les plastides des plantes, mais il y en a également abondamment dans le cytoplasme des fruits murs (Vaughn et Duke, 1984). Selon Walker et Ferrar (1995), la localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et / ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara et Katoh, 1999). En support à cette hypothèse, Lax et Vaughn (1991) ont montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*).

Dans les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker, 1995). Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPO sont cependant largement controversés (Vaughn *et al.*, 1988 ; Mayer et Harel, 1991 ; Walker et Ferrar, 1998) et plusieurs hypothèses sont émises. Les polyphénols, ont des propriétés anti-fongiques (Friedman, 1997). La polyphénol oxydase catalyse l'oxydation de ces composés phénoliques en quinones, elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel, 1986), qui se polymérisent ensuite pour former des polymères bruns insolubles. Ces derniers forment une barrière, et grâce à leurs propriétés anti-microbiennes, limitent la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante (Zawistowski *et al.*, 1991). Selon Craft et Audia (1962), ces barrières de protection ont été observées dans les patates douces, les carottes, les betteraves, les courges, les navets et les pommes de terre.

2.2.4 Caractéristiques réactionnelles et structurales des polyphénol oxydases

La classe des polyphénol oxydases est divisée en deux sous-groupes en fonction du substrat dont elles catalysent l'oxydation :

- hydroxylation en position ortho d'un substrat monophénolique (activité monophénoloxydase, crésolase ou tyrosinase)
- oxydation d'un diphénol en benzoquinone (activité diphénoloxydase, également appelée laccase, et spécifiquement catécholase lorsqu'il s'agit o-diphénol).

Ces deux réactions utilisent l'oxygène moléculaire comme co-substrat. Lorsque ces deux activités enzymatiques sont simultanément observées dans les plantes, le ratio activité monophénoloxydase sur diphénoloxydase est généralement de 1/10 et peut aller jusqu'à 1/40 (Nicolas *et al.*, 1994). Les différentes affinités relatives pour les substrats mono- et di-phénoliques observées pour une même enzyme est attribué à l'existence de sous-unités dont les propriétés chimiques, physiques et cinétiques varient et peuvent ainsi conférer à une même enzyme des activités mono- et diphénoloxydase.

2.2.5 Les différents sous-groupes de PPO

2.2.5.1 Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols. Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de

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

2.2.5.2 Activité catécholoxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats o-diphénoliques en o-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité o-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase. Cette dernière a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanoidines comme le montrent les Figures 8 et 9.

La Figure 9 montre plus spécifiquement comment l'activité tyrosinase, évoquée précédemment, englobe l'activité monophénoloxydase et catécholoxydase.

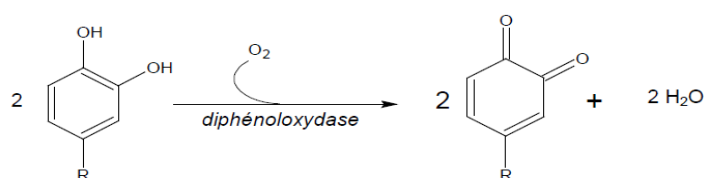


Figure 8 : Formation des quinones catalysée par la diphenoloxydase en présence d'oxygène (Cheriot, 2007).

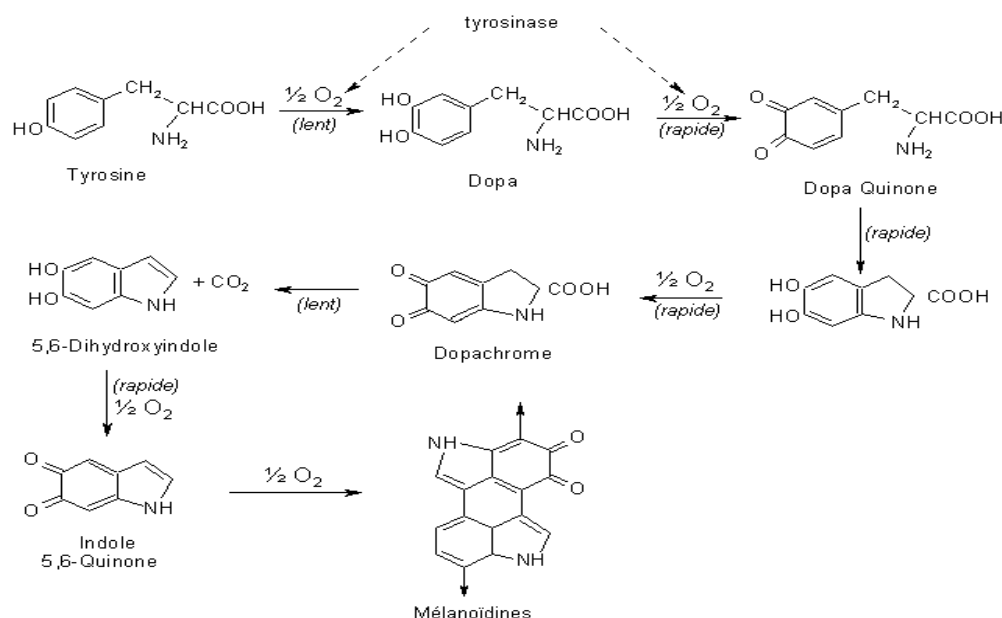


Figure 9 : Formation des mélanoidines à partir de la tyrosine (Lerner, 1953; Cheriot, 2007).

2.2.5.3 Activité laccase (E.C. 1.10.3.2)

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

On peut distinguer les o- des p- diphénoloxydases en fonction de leurs spécificités de substrats et d'inhibiteurs. Un taux d'oxydation différent pour le cuivre du site actif ainsi que les différences des mécanismes réactionnels de catalyse enzymatique peuvent en partie expliquer les taux différents d'inhibition de ces deux enzymes pour un même inhibiteur. Par exemple, la laccase n'est pas inhibée par le monoxyde de carbone, la phénylhydrazine ou le 2,3-naphtalènediol qui sont de puissants inhibiteurs de la catécholoxydase (Keilin et Mann, 1940). Un résumé de ces différentes activités PPO est présenté en figure 10. Dans un souci de simplification, le terme PPO sera utilisé pour toutes les activités enzymatiques décrites ci-dessus.

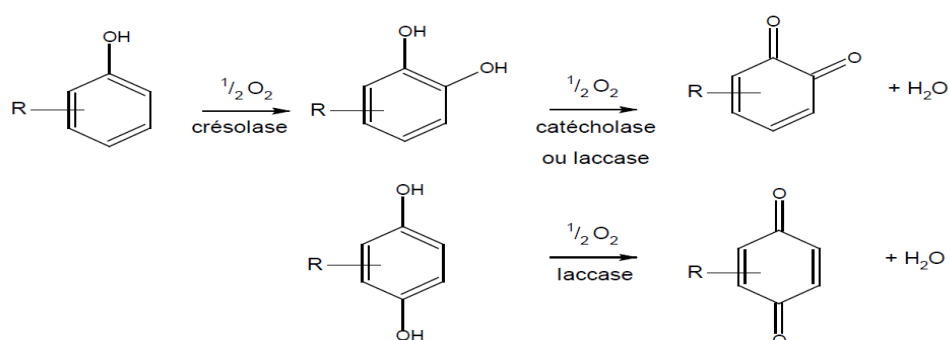


Figure 10 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases (Cheriot, 2007).

2.2.6 Mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les tyrosinases d'origines fongiques. D'après Sanchez-Ferrer et al. (1995), le site actif des tyrosinases peut exister sous trois formes selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : deoxy (CuI-CuI), oxy (CuII-O₂-CuII) et met (CuII-CuII). La forme met est convertie en forme deoxy par double réduction électronique, et la forme deoxy résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme oxy

(Figure 11). In vivo, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme met, incapable de fixer l'oxygène moléculaire (Lerch, 1981). Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence décrite par Cabanes et al. (2002). Bien que le mécanisme exact des réactions catalysées par les tyrosinases soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des o-diphénols catalysée par les tyrosinases suit une cinétique de Michaelis-Menten, tandis que l'hydroxylation des monophénols est caractérisée par une phase de latence (Sanchez-Ferrer et al., 1995). Cette phase de latence peut être supprimée par un faible ajout d'o-diphénols (Espin et Wichers, 1999).

Le modèle des mécanismes réactionnels des tyrosinases incluant l'activité catécholase (figure 11, cycle A) et crésolase (figure 11, cycle B) est basé sur des informations quant à la structure électronique et géométrique du complexe de cuivre binucléaire et sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (Lerch, 1995). Les formes oxy peuvent réagir avec les mono- et les di- phénols tandis que la forme met ne peut réagir qu'avec les diphénols. Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des o-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (Rodriguez-Lopez et al., 1992).

Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme oxy semble beaucoup plus instable que dans le cas des tyrosinases, ce qui réduit fortement l'affinité des PPO pour les mono-phénols (Eicken et al., 1999). L'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (Janovitz-Klapp et al., 1989). Pour les laccases, le mécanisme est différent puisqu'il s'agit d'un mécanisme ping-pong avec formation de radicaux semi-quinones et d'eau. Par la suite, il y a dimérisation de deux semi-quinones pour donner une quinone et le phénol d'origine ou un dimère phénolique.

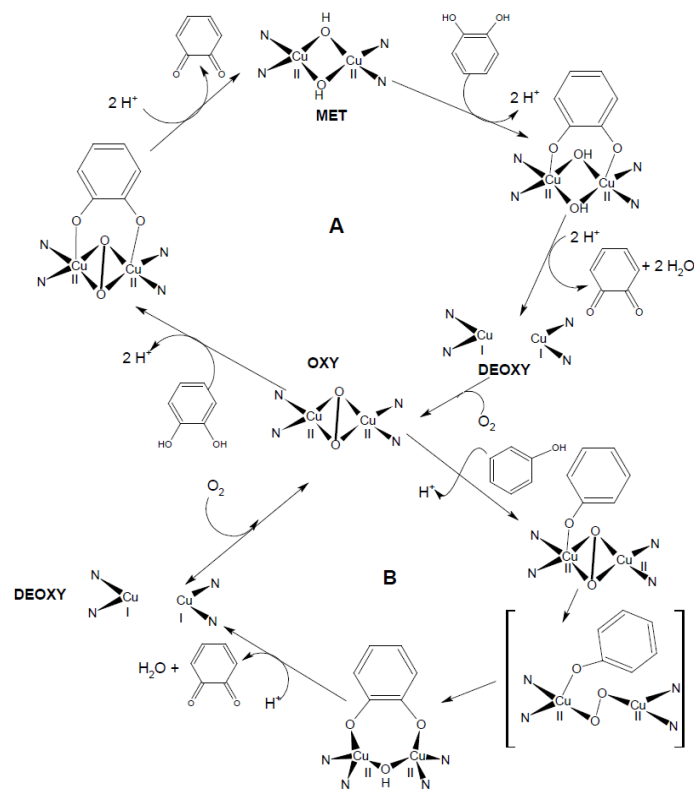


Figure 11: Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la tyrosinase (Lerch, 1995; Cheriot, 2007).

2.2.7 Caractéristiques du site actif

La structure cristallographique des PPO n'a pas été élucidée. Cependant, on peut supposer que les tyrosinases, les hémocyanines (protéine oligomérique servant au transport de l'oxygène chez les invertébrés, dont le site actif contient du cuivre) et les catécholoxydases possèdent des sites actifs de structures comparables. En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables

lors de la fixation de l'oxygène (Della Longa et *al.*, 1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmelwright et *al.*, 1980), et des similitudes de séquence primaires (Van Gelder et *al.*, 1997). Par ailleurs, les hémocyanines montrent une activité catécholoxydase après traitement au SDS ou par une protéase (Jaenicke et Decker, 2004).

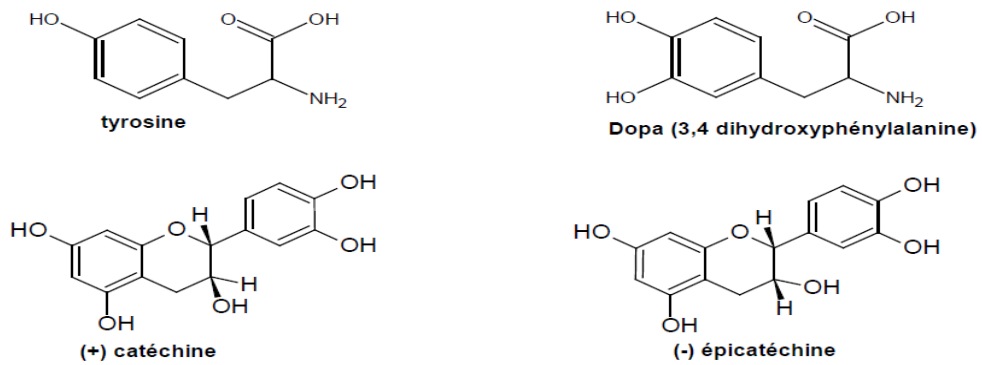
Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la tyrosinase comme une sphère hydrophile délimitée par 4 hélices α contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile est située dans une poche hydrophobe formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des tyrosinases est maintenue par des forces électrostatiques ou par des interactions ioniques.

Une autre caractéristique du site actif des tyrosinases est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (Lerch, 1982). Une telle liaison covalente cystéine-histidine est également rapportée dans la catécholoxydase de patate douce (*Ipomea batatas*) (Klabunde et al., 1998).

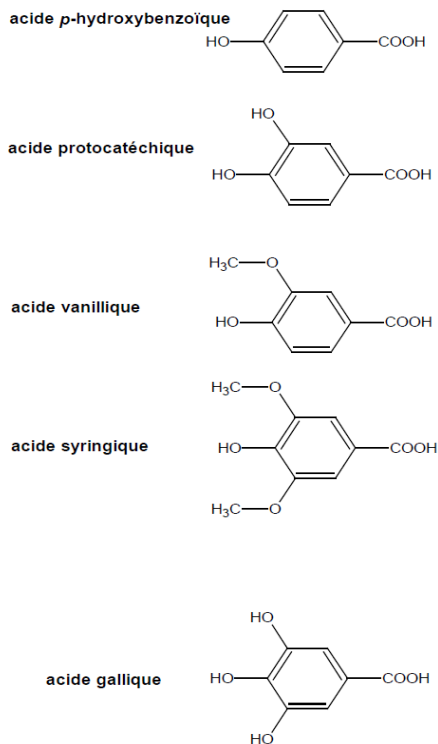
Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des o-diphénols et permet ainsi un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox.

2.2.8 Substrats phénoliques et spécificité enzymatique

Les substrats phénoliques qui participent à la couleur, l'astringence, l'amertume et au goût des fruits et légumes, comportent un noyau aromatique porteur d'un ou plusieurs groupe(s) hydroxyle. La composition en polyphénols dans les végétaux varie selon l'espèce, le cultivar, la maturité, les conditions de culture et de stockage. La figure 12 présente les structures des composés phénoliques substrats les plus courants des PPO. Les dérivés de l'acide caféique, tels que l'acide chlorogénique, sont souvent cités comme étant les composés o-diphénols majoritaires dans les végétaux où ils sont présents sous forme glycosylés. Il faut alors noter que les monophénols tels que l'acide sinapique ou l'acide syringique forment alors des semi-quinones.



Série des acides benzoïques



Série des acides cinnamiques

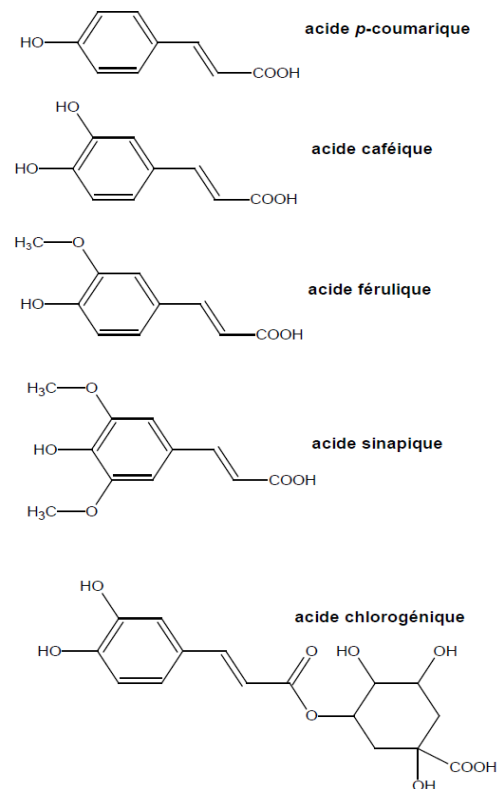


Figure 12 : Structures de composés phénoliques substrats des polyphénoloxydases (CHERIOT S, 2007).

L'acide chlorogénique, dont la biosynthèse est effectuée à partir de la phénylalanine (Villegas et Kojima, 1986) représente environ 90 % de la teneur en phénols des tubercules de pomme de terre. Les composés phénoliques sont majoritairement distribués entre le cortex et la peau. Environ 50 % des composés phénoliques sont localisés dans la peau et les tissus proches tandis que leur concentration décroît depuis l'extérieur vers l'intérieur des tubercules de pomme de terre (Hasegawa et al., 1966).

La spécificité de substrat des PPO varie selon la source végétale de la PPO. Les composés phénoliques endogènes sont responsables des réactions de brunissement enzymatique des fruits et légumes lors de leurs transformations. La relation entre le brunissement et la teneur en composés phénoliques et l'activité PPO a été établie dans différents fruits tels que les pommes (Coseteng et Lee, 1987), les raisins (Lee et Jaworski, 1988) et les pêches (Lee et al., 1990).

Si certains composés phénoliques sont des substrats de la PPO, d'autres peuvent être des inhibiteurs de cette même enzyme. Différents acides cinnamiques sont des analogues de substrats et ainsi de bons inhibiteurs compétitifs de la PPO de pomme.

2.2.9 Prévention du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique ne se produit que lorsque les tissus sont endommagés par la coupe, le tranchage ou le broyage : les vacuoles contenant les substrats phénoliques sont rompues et ces derniers sont ainsi mis en contact avec la PPO cytoplasmique. Le taux de brunissement enzymatique dépend de la quantité de PPO active dans les tissus, de la teneur en polyphénols, du pH, de la température et de la disponibilité en oxygène.

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

- L'élimination de l'oxygène à la surface des fruits et légumes retarde le brunissement enzymatique. Cependant, le brunissement reprend rapidement au moment de l'exposition à l'oxygène. L'exclusion de l'oxygène est possible par immersion dans l'eau, du sirop, ou par traitement sous -vide.

- Le groupe prosthétique des PPO est indispensable à la catalyse enzymatique. Certains agents chélateurs sont efficaces pour piéger le cuivre et le rendre inutilisable pour la catalyse.

- L'inactivation de la PPO par des traitements thermiques (tel que la décoloration) est effectivement appliquée pour contrôler le brunissement des fruits et légumes de conserves ou surgelés. Cependant, les traitements thermiques ne peuvent être utilisés pour la commercialisation des fruits et légumes frais.

- La modification des substrats phénoliques de la PPO peut également empêcher le brunissement enzymatique. D'autres techniques plus récentes comme par exemple les «killer enzymes» ou les radiations ionisantes ont été proposées comme traitement alternatif aux traitements thermiques et aux traitements chimiques (Nicolas et Billaud, 2006).

2.2.9.1 Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique

Le chauffage : Les traitements thermiques sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique. Cependant, cette méthode ne peut être utilisée dans les procédés de transformation des fruits et légumes frais.

Les températures appliquées lors du blanchiment varient considérablement en fonction du végétal à traiter et des enzymes à inactiver. En général, une exposition des PPO à des températures de l'ordre de 70-90 °C entraîne la destruction de leur activité catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981). Bien qu'il est très efficace, le blanchiment nuit à la qualité des produits en provoquant des pertes en vitamines, arômes, couleurs, texture, sucres et autres composés hydrosolubles.

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

La déshydratation : La teneur en eau influence très fortement les activités enzymatiques : celles-ci diminuent généralement avec un abaissement de l'activité de l'eau. La déshydratation a des effets variés sur les enzymes en raison des réponses différentes en fonction de la concentration des solutés. Les sucres et les protéines ont en général un effet protecteur contre l'inactivation enzymatique. La lyophilisation permet d'éliminer l'eau d'un produit congelé. Ainsi, ce procédé inhibe les réactions chimiques et biochimiques indésirables tout en minimisant la perte en composés aromatiques. La congélation rapide minimise le brunissement enzymatique et produit des aliments de bonne qualité (Fang et Chiang, 1975).

Autres traitements utilisés pour contrôler le brunissement enzymatique : L'irradiation est de plus en plus reconnue comme une méthode pour diminuer les pertes après récolte tout en assurant une bonne qualité hygiénique des aliments et facilitant leur commercialisation à large échelle. Le brunissement des tubercules de pomme de terre et de fruits tropicaux après irradiation aux rayons gamma a été largement étudié par Thomas (1984 ; 1986). Ces rayons inhibent la germination des tubercules de pomme de terre et ont un effet sur les substrats phénoliques (Pendharkar et Nair, 1987). Cependant une irradiation trop forte des produits peut entraîner la rupture des membranes et la libération de PPO. Par ailleurs, les radicaux libres produits par des radiations ionisantes peuvent réagir avec d'autres composés alimentaires et entraîner des effets secondaires tels que le brunissement des tissus, l'oxydation des lipides et des pertes vitaminiques. Les traitements par hautes pressions peuvent induire des inactivations réversibles ou irréversibles des activités enzymatiques. La perte en activité catalytique du fait des hautes pressions varie selon l'enzyme, la nature des hautes pressions, la température et la durée du traitement (Cheftel, 1992). Cependant, la PPO est relativement résistante aux traitements par les hautes pressions : des pressions de 5 et 7 kbar sont nécessaires à l'inactivation de la PPO de pomme à pH 4,5 et 5,4 respectivement (Nicoli et al., 1994).

Les traitements au dioxyde de carbone supercritique se sont montrés efficaces pour inactiver les PPO. Par exemple, la PPO de pomme de terre présente une perte d'activité dépendante du temps de traitement à 43 °C avec du dioxyde de carbone à 58 atm (Chen et al., 1992).

L'ultrafiltration pour contrôler le brunissement enzymatique en remplacement des sulfites a été étudiée plus particulièrement en vinification par les équipes de Sims (1989 ; 1990) et de Goodwin et Morris (1991).

La combinaison des traitements thermiques avec des ultrasons peut également contribuer à l'inactivation enzymatique. Lorsqu'il est appliqué en milieu liquide, le traitement par ultrasons entraîne la formation de bulles dont les interfaces changent continuellement de forme et de taille. Les ondes acoustiques peuvent affecter les structures enzymatiques et ainsi promouvoir la dénaturation des enzymes (El'piner et al., 1965).

2.2.9.2 Moyens chimiques de contrôle du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique peut être inhibé en ciblant l'enzyme, les substrats (oxygène et polyphénols) ou les produits de la réaction. L'utilisation d'inhibiteurs du brunissement enzymatique ne peut se concevoir que s'ils n'ont aucun effet toxique et ne modifient pas le goût ni la couleur des produits, et évidemment si le surcoût économique est supportable. Mc Evily et al. (1992) classent les inhibiteurs de la PPO en six catégories (tableau 1) : les agents

réducteurs, les acidifiants, les agents chélateurs, les agents complexants, les inhibiteurs d'enzyme, les traitements enzymatiques.

Tableau 1 : Inhibiteurs du brunissement enzymatique (McEvily et al., 1992; Cheriot, 2007).

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

Inhibition ciblant l'enzyme : Mayer et Harrel (1979) ont classé les inhibiteurs qui agissent directement sur la PPO en deux groupes. Le premier groupe est celui des agents chélateurs de métaux, tels que les ions azoture, cyanure, halogénés et la tropolone. Le chlore (Cl⁻) est un inhibiteur non compétitif de la PPO de pomme alors que d'autres composés halogénés ont montré une inhibition compétitive. Le second groupe d'inhibiteurs consiste en analogues de substrats : ces acides carboxyliques de la série des acides benzoïque et cinnamique sont des inhibiteurs compétitifs de la PPO (Janovitz-Klapp et al., 1990).

Inhibition ciblant les substrats : L'élimination de l'oxygène est sans doute le moyen le plus efficace pour prévenir l'oxydation des polyphénols par la PPO. Cependant, la suppression totale de l'oxygène favorise le métabolisme anaérobie entraînant l'apparition d'arrière-goût (Ballantyne et al., 1988). L'emballage sous vide d'air de pommes de terre pelées augmente leur date limite de consommation. Cependant, le brunissement enzymatique se produit rapidement dès l'exposition à l'oxygène lors de l'ouverture de l'emballage (Langdon, 1987).

Certains adsorbants, qui se complexent avec les substrats phénoliques peuvent également être utilisés pour l'élimination des substrats phénoliques des aliments. L'utilisation des cyclodextrines à cet effet fait l'objet d'un brevet (Hicks et al., 1990) : les cyclodextrines

possèdent une cavité hydrophobe capable de complexer les polyphénols (Sapers et al., 1989). Cependant, la capacité de piégeage des cyclodextrines dépend de la nature des cyclodextrines et de celle des polyphénols (Fayad et al., 1997)

Les modifications enzymatiques des substrats peuvent également servir pour inhiber le brunissement enzymatique. Par exemple, l'o-méthyltransférase convertit les o-dihydroxyphénols en leurs dérivés méthoxy correspondants qui ne peuvent être utilisés comme substrats par la PPO (Finkle et Nelson, 1963). De la même façon, la protocatéchuate-3,4-dioxygénase purifiée de *Pseudomonas aeruginosa* empêche le brunissement enzymatique du jus de pomme en modifiant le substrat phénolique (Kelly et Finkle, 1969).

Cependant, l'utilisation de ces enzymes n'est pas envisageable au niveau industriel en raison de leur coût.

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

CHAPITRE 3.

MATERIELS ET METHODES

3.1 Matériel

3.1.1 Matériel biologique

La polyphénol oxydase (PPO) brut a été extraite à partir des truffes du genre *Terfezia* (*Terfezia leonis* Tul.). Les truffes sont achetées du marché local de la Wilaya de Djelfa dans la semaine précédente de leur utilisation. Elles doivent être noires, fraîches et jeunes. L'extrait est conservé pendant une année à -10°C.



Figure 13. *Terfezia leonis* Tul d'Algérie (Wilaya de Djelfa), (Benmebarek et Chaher, 2011).

3.1.2 Produits chimiques

Le catéchol, le 4-méthylcatéchol et le pyrogallol sont fournis par Fluka. Le sodium dodécyl sulfate (SDS) et le cyanure de potassium sont fournis par Merck. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

3.2 Méthodes

3.2.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO

L'extraction de la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul) a été réalisée l'année dernière par Benmbarek et Chaher selon le protocole décrit par Choucha et Zaroual (2009). Tout d'abord les truffes sont lavées avec l'eau distillé afin d'éliminer les traces de sol résiduel, puis sont séchées à l'aire libre. 100 g d'écorce de truffe est broyée à l'aide d'un mixeur en présence de 200 ml de tampon phosphate (0.05M- pH 7.0) contenant 2 g de sodium dodécyl sulfate (SDS). L'addition de SDS dans le milieu réactionnel peut activer l'enzyme et par conséquent raccourcir la période de latence (Jimenez et Garcia-Carmona 1996; Sojo et al, 1998b). Le broyat est filtré par pressage manuel à travers quatre couches de la gaze. Le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000 tours/min.

Le surnageant obtenu dont le volume était de 172 ml représente l'extrait brut de la PPO.

L'extrait enzymatique est reparti dans des tubes Eppendorf de 2 ml qui seront conservés à -10°C pendant une année.

3.2.2 Détermination de l'activité PPO

L'activité catécholase de la PPO de truffe est déterminée par la mesure directe de la formation des o-quinones, à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 6405 UV/Vis) à 400, 410 et à 420 nm en présence oxygène/aire (Espín et *al.*, 1995), pour le 4-méthylcatéchol, le catéchol et le pyrogallol comme substrats phénoliques, respectivement. Le milieu réactionnel (1 ml) contient le catéchol ou le pyrogallol à 20 mM ou bien le 4-méthylcatéchol à 5 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout d'un volume approprié d'extrait enzymatique brut. L'augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel est enregistrée chaque 10 secondes dès l'addition de l'enzyme.

La vitesse initiale (V_0), est calculée à partir de la pente de la courbe de l'absorbance en fonction du temps (Ünal, 2007). Tous les substrats phénoliques (0.1 M) utilisés dans cette étude sont préparés dans l'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM (Fan et Flurkey, 2004).

En spectrophotométrie une unité enzymatique (UE) est définie comme la quantité d'enzyme qui cause l'augmentation de l'absorbance de 0.001 min^{-1} (Gawlik-Dziki et *al.*, 2007).

3.2.3 Détermination du type d'inhibition de la PPO de truffe par le cyanure

Pour déterminer le type d'inhibition de la PPO de truffe par le cyanure de potassium, l'activité catécholase de l'enzyme a été mesurée dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations du cyanure et à différentes concentrations de substrats comprises entre 2.5-20 mM pour le catéchol, 0.25 ml à 4 mM pour le 4-méthylcatéchol et 1-6 mM pour le pyrogallol. Les autres conditions physico-chimiques sont maintenues constantes.

Les types d'inhibition ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale en fonction de la concentration des différents substrats (Arslan et Doğan, 2005). Les constantes d'inhibition (K_I et K_{IS}) ont été calculées à partir des graphes secondaires des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur, comme c'est décrit précédemment (Chen et *al.*, 1998). K_I et K_{IS} représentent les constantes de dissociation du complexe Enzyme-Inhibiteur (EI) et du complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur (ESI), respectivement.

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

3.2.4 Détermination de l'IC₅₀

Pour déterminer la concentration du cyanure de potassium qui provoque une diminution de l'activité enzymatique de 50 % (IC₅₀), l'activité de la PPO a été mesurée à 30°C en absence et présence de différentes concentrations de cyanure pour une concentration constante des différents substrats. Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (Chen et *al.*, 1998).

Le pourcentage de l'activité catécholase résiduelle de la PPO (la polyphénol oxydase) est calculé par comparaison avec l'activité de l'enzyme en absence d'inhibiteur (A₀) (Dogan et *al.*, 2005) selon l'équation suivante :

$$AR (\%) = \left(\frac{A_I}{A_0} \right) \times 100$$

Avec :

A₀: est l'activité catécholase en absence d'inhibiteur ;

A_I: est l'activité catécholase en présence d'inhibiteur.

Toutes les expériences ont été réalisées deux fois.

3.2.5 Effet de la concentration de l'enzyme

L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse d'oxydation du catéchol (10 mM) a été étudié par la mesure de la vitesse initiale pour des volumes croissants de l'extrait brut de la PPO compris entre 10 et 50 µl. L'activité enzymatique a été mesurée à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) et à 30°C en absence et en présence du cyanure à 0.2 mM.

3.3 Analyse des résultats expérimentaux

L'analyse des données cinétiques de l'inhibition de la PPO observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2DTM (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 2007) et SigmaPlot 2012 (Systat Software, Inc. Copyright©2011, Windows Version 12.0).

CHAPITRE 4.

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Spécificité de substrat de la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.)

La constante de Michaelis-Menten (K_m) et la vitesse maximale (V_{max}) de la réaction de la PPO avec différents substrats phénoliques sont données dans le Tableau (2). L'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat est d'autant plus importante que le K_m est petit (Varoquaux, 1978). Par conséquent, la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) a une affinité plus grande pour le 4-méthyle catéchol et le pyrogallol. Il a été trouvé que la valeur de K_m pour l'activité PPO varie avec le type de substrat, le tampon et la source d'enzyme (Doğan et al., 2006).

En termes de "pouvoir catalytique" (V_{max}/K_m) (Todaro et al., 2011), le 4-méthyle catéchol semble être le meilleur substrat pour la PPO de truffe (Rocha et al., 1998 ; Yağar, 2004; Dagan et al., 2002 ; Dincer et al., 2002; Wang et al., 2007). La présence du groupement méthyle en position para augmente l'efficacité catalytique de l'enzyme. Ce groupement est un donneur d'électron. Par conséquent, nos résultats sont en accord avec les données montrant que les substituants attracteurs d'électron diminuent la vitesse de la réaction enzymatique.

Des résultats similaires ont été trouvés pour la PPO d'avocat (Tableau 2) (Gómez-López, 2002).

Tableau 2: La constante de Michaelis-Menten (K_m), la vitesse maximale (V_{max}) et la spécificité (V_{max}/K_m) de la réaction d'oxydation de catéchol, le 4-méthyle catéchol et le pyrogallol par la PPO obtenue à partir de différentes sources.

Sources	Substrats									Références
	Catéchol			4-Méthyle catéchol			Pyrogallol			
	V_{max} (UE/mL)	K_m (mM)	V_{max}/K_m (UE/mL/mM)	V_{max} (UE/mL)	K_m (mM)	V_{max}/K_m (UE/mL/mM)	V_{max} (UE/mL)	K_m (mM)	V_{max}/K_m (UE/mL/mM)	
Marula (<i>Sclerocarya birrea</i> subsp. Caffra)	69.5	1.45	47.9	122	4.99	24.2	-	-	-	Mdluli (2005)
<i>Thymus longicaulis</i> var. subisophyllus	4070	9.8	415	4830	18.00	269	6990	5.5	1260	Dogan et al. (2004)
Artichaut	16158	11.6	1393	7457	10.7	697	6390	5.2	1220	Dogan et al. (2005)
Pomme (Amasya)	552	3.1	178	2000	34	58.8	1215	27	45	Nagai et Suzuki (2001)
<i>Thymbra spicata</i> L. var. spicata	2516	3.0	831	6813	20	340	5123	39.4	130	Dogan et al. (2006)
<i>Persea americana</i> Mill. Var : Booth 1	2830	10.4	272.11	1470	0.73	2013.69	883	1.98	445.95	Gomez-Lopez (2002)
Julio Millán	10100	9.24	1093.07	6940	0.58	11965.52	3350	2.10	1595.23	
Truffe (<i>Terfezia leonis</i> Tul.)	14630.5	5.18	2824.42	7979.1	0.21	37995.7	10496.77	0.54	19438.46	Notre étude

4.2 Etude cinétique de l'inhibition de la PPO de truffe par le cyanure de potassium

L'effet inhibiteur du cyanure sur les activités diphénol et triphénol oxydases de l'extrait brut de la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) est étudié en utilisant le catéchol, le 4-méthyl catéchol et le pyrogallol comme substrats.

Les résultats trouvés, montrent que le cyanure provoque une diminution significative des activités di- et triphénol oxydases de la PPO et que son pouvoir inhibiteur, dépend non seulement de sa concentration dans le milieu réactionnel, mais aussi de la concentration du substrat utilisé.

Les coefficients de régression linéaire (R^2) des représentations de Lineweaver-Burk en absence et en présence de cyanure pour les différents substrats utilisés sont indiqués dans le Tableau (3). Leurs valeurs sont comprises entre 0.75-0.98, ce qui indique bien que les données expérimentaux, sont parfaitement ajustées par les équations choisies.

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de catéchol, de 4-méthyl catéchol et de pyrogallol par la PPO de truffe, suit une cinétique de Michaelis-Menten. La cinétique d'inhibition du cyanure agissant sur l'enzyme a été déterminée par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk.

Les résultats indiqués dans la Figure (14) montrent que les représentations en double inverse forment une famille de courbes droites avec un seul point d'intersection sur l'axe des abscisses ($1/[S]$) mais avec différentes pentes, indiquant que le cyanure est un inhibiteur non compétitif de l'enzyme. Dans l'inhibition compétitive, la valeur de V_{max} ne change pas quand celle du K_m augmente (Tableau 3).

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

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

Avec :

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

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

$$K_I = K_{IS}$$

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

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

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

Tableau 3 : Types d'inhibition, K_{IS} et IC_{50} de la PPO de *Terfezia leonis* avec le catéchol, le 4-méthyl catéchol et le pyrogallol comme substrats.

Substrats	[I] (mM)	K_{IS} (mM)	K_m (mM)	V_{max} (UE/mL)	Types d'inhibition	R^2
Catéchol	0		5.18±1.01	14630.5±971.4		0.931
	0.02	0.0216	4.33±0.68	8067.3±399.6	Non	0.949
	0.04		4.22±0.30	5228.36±116.38	compétitive	0.989
4-Méthyle catéchol	0		0.21±0.03	7979.1±263.06		0.966
	0.02	0.055	0.17±0.05	5770.84±324.18	Non	0.753
	0.04		0.26±0.07	4690.29±145.33	compétitive	0.959
	0.06		0.32±0.041	3705.74±117.63		0.969
Pyrogallol	0		0.54±0.086	10496.77±355.15		0.982
	0.02	0.0259	0.79±0.11	5743.16±220.73	Non	0.951
	0.04		0.89±0.18	4090.55±233.95	compétitive	0.917

Le cyanure diminue la valeur apparente de la vitesse maximale sans modifier l'affinité de l'enzyme. Le comportement observé montre que l'inhibiteur peu se fixer sur l'enzyme libre et sur le complexe enzyme-substrat, et les constantes d'équilibre de la fixation de cyanure avec l'enzyme libre, K_I , et le complexe enzyme-substrat, K_{IS} , sont identiques (Chen et al., 2005).

Les valeurs de K_{IS} indiquées dans le Tableau (3) suggèrent que le cyanure de potassium inhibe efficacement l'activité diphénolase et triphénolase de la PPO de truffe en présence de catéchol et de pyrogallol.

Duckworth et Coleman (1970) ont trouvé que le cyanure de potassium est un inhibiteur non compétitif de la PPO de champignon comestible *Agaricus bisporus* lorsque le catéchol est utilisé comme substrat. Cho et Ahn (1999) en utilisant le catéchol comme substrat ont montré que le cyanure de potassium est un inhibiteur compétitif de la PPO de pomme de terre, avec une constante d'inhibition de 0.032 mM. Le caractère inhibiteur du cyanure est due à son pouvoir chélateur du cuivre du site actif de l'enzyme (Mayer et Harel, 1979 ; Yagar et Sagioglu, 2002 ; Sathyanarayana et al., 2011).

Wilox et al. (1985) suggèrent que le cyanure de potassium se fixe sur la forme réduite de la PPO (forme *deoxy*) et la stabilise, agissant donc comme un inhibiteur compétitif de la PPO vis-à-vis de la fixation de l'oxygène avec la forme *deoxy* et comme inhibiteur non compétitif par rapport à l'oxydation de la L-dopamine.

Nos résultats sont similaires avec ceux trouvés par Duckoworth et Coleman (1970) et Gülçin et *al.* (2005). Ces chercheurs ont observés respectivement, que le cyanure est un inhibiteur non compétitif de la PPO de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) ($K_I = 0.0147-0.0189$ mM) et de l'ortie (*Urtica dioica* L.) ($K_I = 0.074$ mM), en présence de catéchol comme substrat. Par contre, Aydemir et Akkanlı (2006), Kavrayan et Aydemir (2001), Cho et Ahn (1999) et Aydemir et *al.* (2003) ont montré respectivement, que le cyanure est un inhibiteur compétitif de la PPO de menthe (*Mentha piperita*), de la céleri (*Apium graveolens* L.) et de la pomme de terre et d'artichaut, lorsque le catéchol était utilisé comme substrat.

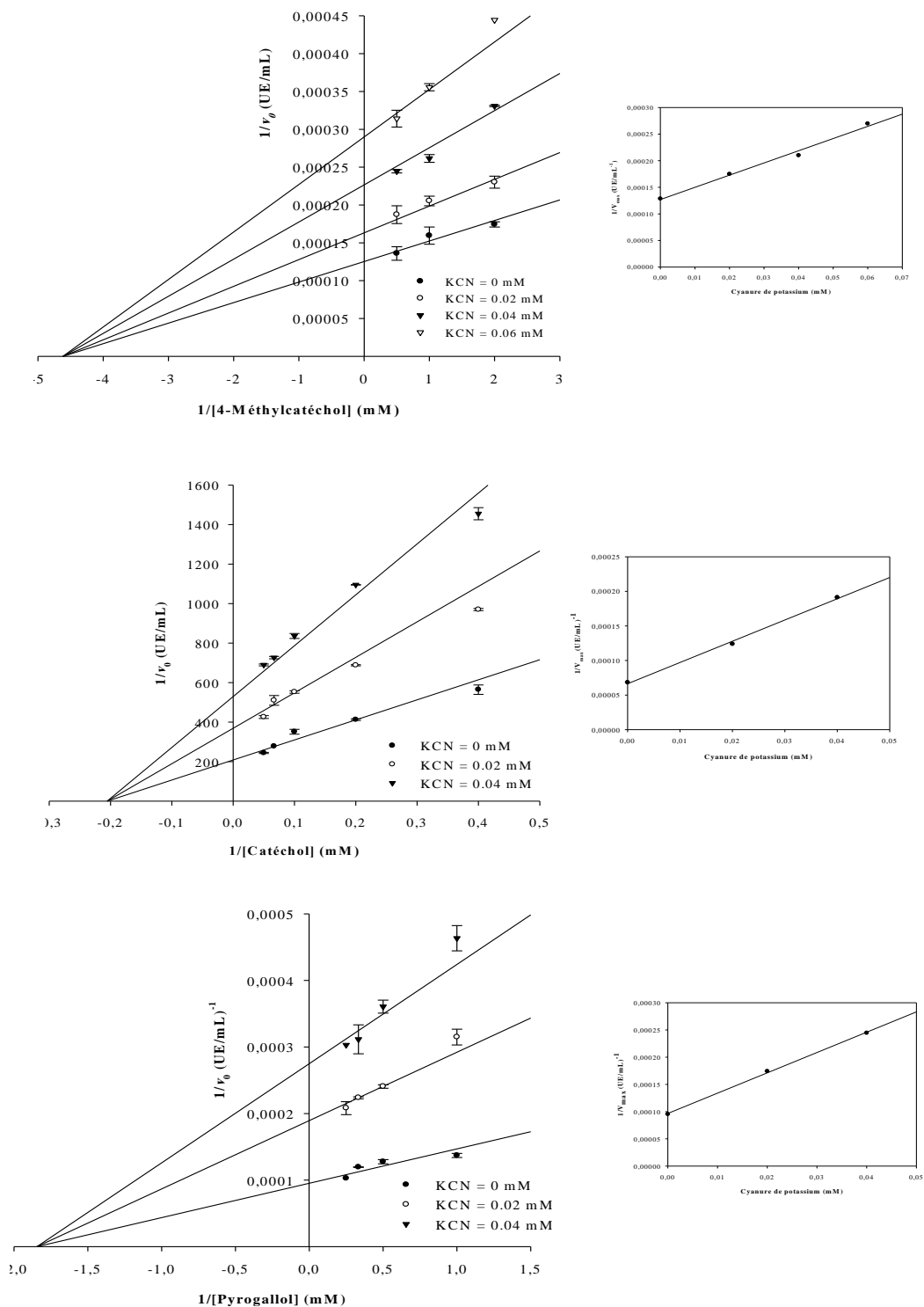


Figure 14: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition des activités diphérolase et triphénolase de la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) sur le catéchol (A), le 4-méthyle catéchol (B) et le pyrogallol (C) par le cyanure de potassium. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm ES.

4.3 Effet du cyanure de potassium sur la PPO de truffe

L'effet de différentes concentrations du cyanure de potassium sur l'oxydation du catéchol, du 4-méthylcatéchol et du pyrogallol par la PPO des truffes est étudié. La Figure (15) représente le pourcentage d'inhibition de la PPO par le cyanure de potassium avec les trois substrats phénoliques utilisés. On remarque que la PPO de truffe est fortement inhibée par le cyanure et le degré d'inhibition dépend de la concentration du cyanure dans le milieu réactionnel.

Afin de déterminer le pouvoir inhibiteur du cyanure, la valeur IC_{50} , définie comme étant la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50%, a été déterminée dans les mêmes conditions pour le catéchol, le 4-méthylcatéchol et le pyrogallol. Les valeurs d' IC_{50} ainsi obtenues sont regroupées dans le Tableau (4).

D'après les résultats obtenus on constate que le pouvoir inhibiteur du cyanure dépend étroitement du type de substrat choisi pour la mesure de l'activité catécholase de la PPO de truffe. L'oxydation du pyrogallol par la PPO de truffe semble être la plus fortement inhibée par le cyanure.

Les valeurs de l' IC_{50} du cyanure trouvées pour l'activité de la PPO de *Terfezia leonis* ont été comparées avec celles obtenues pour d'autres PPOs (Tableau 4). On constate que l' IC_{50} varie de manière significative avec la source d'enzyme.

Tableau 4: Les valeurs d' IC_{50} de cyanure trouvées pour la PPO obtenue à partir de différentes sources.

Sources	Substrats	IC_{50} (μM)	Références
	Catéchol	60.85 \pm 1.87	
Truffe (<i>Terfezia leonis</i> Tul.)	4-Méthyle catéchol	78.45 \pm 0.63	Notre étude
	Pyrogallol	13.28 \pm 0.72	
Menthe (<i>Mentha piperita</i>)	Catéchol	140	Kavrayan et Aydemir (2001)
Blé	4-Méthyle catéchol	130	Interesse et al. (1983)
Céleri (<i>Apium graveolens</i> L.)	Catéchol	28	Aydemir et Akkanlı (2006)

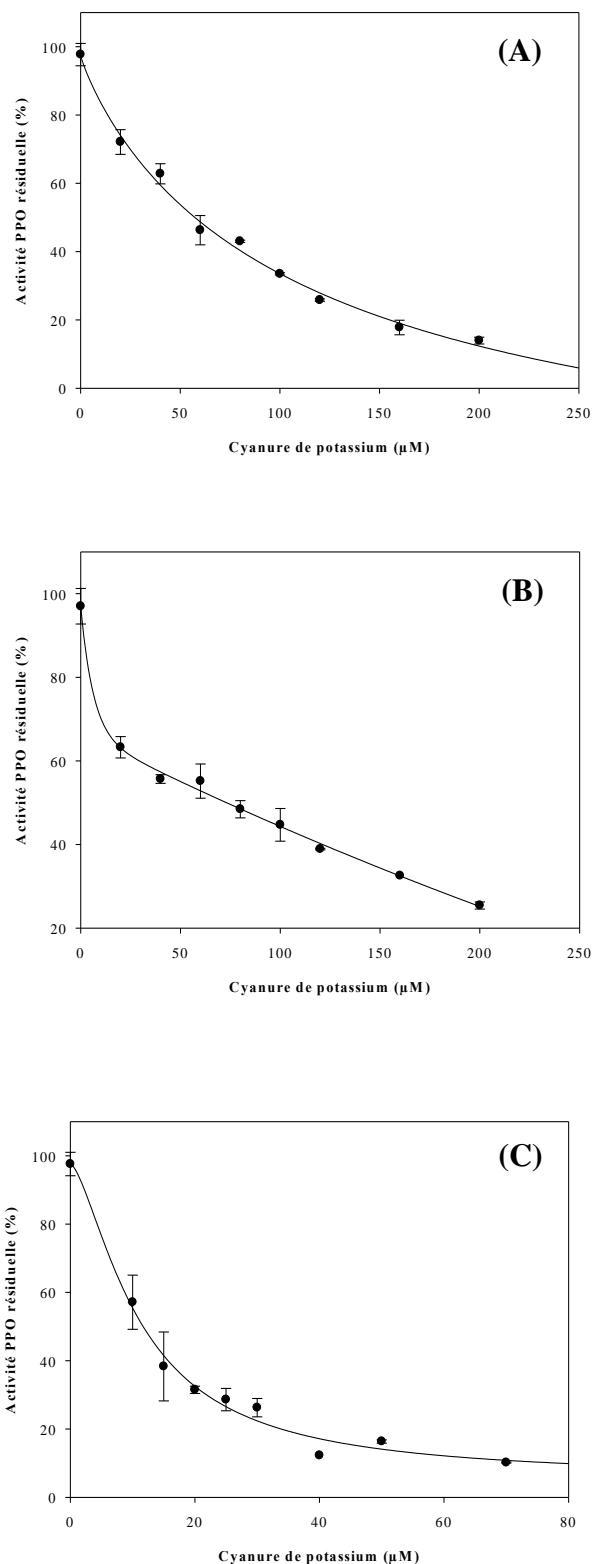


Figure 15: Effet de la concentration du cyanure de potassium sur la l'oxydation de catéchol (A), de 4-méthylcatéchol (B) et du pyrogallol (C) par la PPO de truffe (*Terfezia leonis* (Tul.)). Les conditions d'essai : 30°C, 1.0 ml de milieu réactionnel contient 0.05 M de tampon phosphate de sodium (pH 7.0). Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm ES.

4.4 Effet de la concentration de l'enzyme

La représentation de l'activité PPO en fonction de la concentration de l'enzyme en présence et en absence de cyanure fournit une droite rectiligne, qui passe par l'origine (Figure 16). Le cyanure provoque une diminution de la pente de la courbe, indiquant que l'inhibition de l'activité catécholase de la PPO de truffe par le cyanure est réversible. La présence de cyanure ne peut pas réduire la quantité de l'enzyme efficace, mais résulte juste de l'inhibition de l'activité enzymatique (Han et *al.*, 2008).

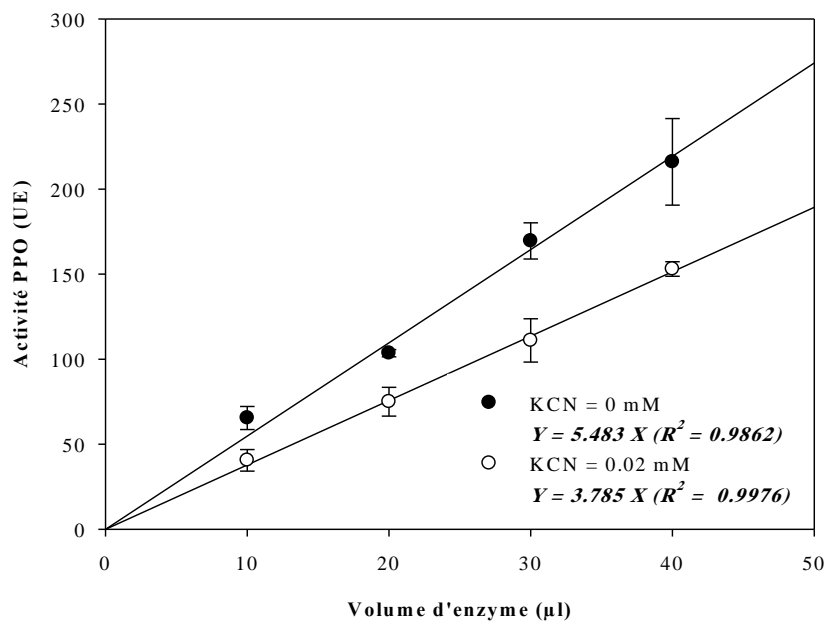


Figure 16: Vitesse initiale de l'oxydation du catéchol en fonction de la concentration de la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) en absence et en présence de cyanure de potassium.

CHAPITRE 5.

CONCLUSION GENERALE

Parmi les facteurs qui interviennent dans le brunissement des truffes de désert (*Terfezia leonis* Tul) et de nombreux autres produits végétaux, la polyphénol oxydase joue un rôle essentiel.

La PPO met en jeu deux activités enzymatiques : les activités crésolasique et catécholasique. Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de cette thèse s'est focalisé en particulier sur l'activité catécholasique d'un extrait partiellement purifié. Ce qui nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

- 1- L'extrait brut de truffe (*Terfezia leonis* Tul) possède une activité di- et triphénolase.
- 2-La PPO catalyse efficacement le 4-méthylcatéchol comme substrat.
- 3-Cette enzyme est fortement inhibée par le cyanure de potassium et qui se comporte comme un inhibiteur non compétitif vis-à-vis des trois substrats choisis.
- 4-Le degré d'inhibition de l'activité enzymatique dépend du type de substrat ainsi que la source d'enzyme.
- 5-Le cyanure provoque une diminution de la pente de la courbe de l'effet de la concentration d'enzyme, indiquant que l'inhibition de l'activité catécholase de la PPO de truffe par le cyanure est réversible.
- 6-Le cyanure inhibe fortement l'oxydation du pyrogallol. Par conséquent ce substrat serait très utile pour le développement d'un biocapteur à base de PPO pour le dosage de cyanure.
- 7-L'enzyme ainsi obtenue peut être utilisée pour la dégradation des phénols présents dans les eaux usées industrielles.

En perspectives, il serait envisageable de purifier la PPO de truffe, et d'étudier l'inhibition de son activité monophénolasique en présence de la L-tyrosine comme substrat.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Delaimy KS. (1977). Protein and amino acid composition of truffles. *Can Inst Food Sci Technol.* 10: 221-222.
- Al-Laith. (2010). Antioxidant components and antioxidant/ antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *J Food Composit Analysis.* 23:15-22.
- Al-Naama NM, Ewaze JO, Nema JH. (1988). Chemical constituents of Iraqi truffles. *Iraqi J Agri Sci.* 6:51-56.
- Al-Rahmah AN. (2001). Truffle of Deserts and Jungles (In Arabic). Riyadh, Saudi Arabia: King Saud University Publications.
- Amine A, Mohammadi H, Bourais I, Palleschi G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics.* 21:1405-1423.
- Arslan O, Dogan S. (2005). Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 85:1499-1504.
- Ballantyne A, Stark R, Selman J D. (1988). Modified atmosphere packaging of shredded lettuce. *Int.J. Food. Sci. Technol.* 23: 267-274.
- Benbarek S et Chafer F. (2011). Etude de l'inhibition de la polyphénol oxydase de *Terfezia leonis* Tul. Par des agents chimiques de synthèse. Mémoire d'ingénieur. PP: 33-34
- Bokhary HA, Suleiman AA, Basalah MO. (1989). The fatty acid components of the desert truffle "AlKamah" of Saudi Arabia. *J Food Protect.* 52:668-69.
- Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. (2002). Tyrosinase kinetics: a semi-quantative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. *J. Theor. Biol.* 214: 321-325.
- Cheftel J C et al., (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: overview. in *High Pressure and Biotechnology.* Eurotext: 195-209.
- Chen J S, Balaban M. O, Wei C. I, Marshall M R, Hsu W. Y. (1992). Inactivation of polyphenol oxidase by high-pressure carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2345-2349.
- Chen L, Mehta A, Berenbaum M, Engeseth N. (1998). The potential use of honey as an inhibitor of enzymatic browning. Presented at Annual Meeting, Institute of Food Technologists, Atlanta, GA.
- Cheriot s. (2007). Rôle des produits de la réaction de maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides. Institut des Sciences et Industries du Vivant

et de l'Environnement (Agro Paris Tech). THÈSE Doctorat, spécialité sciences de l'aliment. 241.

- Choucha F, ZARWAL I. (2009). Extraction, purification et caractérisation de la polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) De *Terfezia leonis* Tul. Mémoire d'ingénieur. pp: 43-50.
- Coseteng M Y, Lee C Y. (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.* 52: 985-989.
- Craft C C, Audia W M. (1962). Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Bot. Gaz.* 123: 211-219.
- Della Longa S, Ascone I, Bianconi A, Bonfigli A, Castellano A C, Zarivi O, Miranda M. (1996). The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 271: 21025-21030.
- Wilcox D E, Porras A G, Hwang Y T, Lerch K, Winkler M E, Solomon E I. (1985). Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase, *J. Am. Chem. Soc.* 107, 4015-4027.
- Dijkstra L, Walker J R L. (1991). Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric.* 54: 229-234.
- Dogan S, Turan, Y, Ertürk, H, Arslan O. (2005). Characterization and purification of polyphenol oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 53: 776-785.
- Dogan S, Turan P, Dogan, M, Arslan O, Alkan M. (2005b). "Purification and characterization of *Ocimum basilicum* L. polyphenol oxidase". *J. Agric. Food Chem.* 53:10224-10230
- Dogan S, Turan P, Dogan M, Alkan M, Arslan O. (2007). *Inhibition Kinetic of Ocimum .basilicum* L. *Polyphenol Oxidase. INTERNATIONAL JOURNAL OF CHEMICAL REACTOR ENGINEERING.* 12: 1542-6580.
- Eicken C, Krebs B, Sacchettini J C. (1999). Catechol oxidase - structure and activity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 677-683.
- El'piner E A, Sokolskaya A V, Margulis M A. (1965). Initiation of chain reactions under ultrasonic waves effects. *Nature.* 208: 945-946.
- Ensminger A H, Ensminger M E, Konlande J E, Robson J R K. (1995). The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition. *Second edition, Boca Raton, CRC Press.* 1178.
- Espín J C, Morales M, Varón R. (1995). A continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple Polyphenol Oxidase. *Analytical Biochemistry.* 231: 237-246.

- 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.
- Fan Y, and Flurkey, W H. (2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry.* 65: 671-678.
- Fang C. (2007). CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE AND ANTIOXIDANTS FROM PAWPAW (*ASIMINA TRIBOLA*) FRUIT. University of Kentucky. Masters Theses. 127.
- Fang T T, Chiang C P. (1975). Prevention of browning and blemish by postharvest treatments and storage conditions for keeping better quality of fresh mushrooms. *J. Chin. Soc. Hortic. Sci.* 21: 274-284.
- Fayad N, Marchal L, Billaud C, Nicolas J. (1997). Comparison of b-cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenol oxidase from different sources. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2442-2446.
- Fennema O R. (1975). Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems. in Water relations of foods. R. B. Duckworth (Ed.). *New York, Academic Press.* 397-413.
- Finkle B J, Nelson R F. (1963). Enzyme reactions with phenolic compounds: effect of o-methyltransferase on a natural substrate of fruit polyphenoloxidase. *Nature.* 197: 902-903.
- Friedman M. (1997). Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540.
- F S Interesse, P Ruggiero, G D'avella and F Lamparell. (1983). Characterization of wheat o-diphenolase isoenzyme. *Phytochemistry.* 22: 1885-1889.
- 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, Sweica M. (2007). characterization of Polyphenol Oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var. capitata* L.). *J Food Chemistry.* 107: 129-135.
- Golbeck J H and Cammarata K V. (1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 67: 977-984.
- Goodwin C O, Morris J R. (1991). Effect of ultrafiltration on wine quality and browning. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 347-353.
- GOUZI H, Belyagoubi L, Abdelali K N, Khelifi A. (2011). *In vitro* Antibacterial Activities of Aqueous Extracts from Algerian Desert Truffles (*Terfezia* and *Tirmania*,

Ascomycetes) Against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 13 : 553-558.

- Gülçin I , Küfrevioğlu İ , Oktay M. (2005). Purification and characterization of polyphenol oxidase from nettle (*Urtica dioica* L.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 20: 297-302.
- Hall I R, Brown G T, & Zambonelli A. (2007). Taming the truffle. Portland, Oregon, USA: *Timber Press, Inc.*
- Han P, Chen C Q, Zhang C L, Song K K, Zhou H T, Chen Q X. (2008). Inhibitory effects of 4-chlorosalicylic acid on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities. *Food Chemistry*. 107: 797-803.
- Harel E, Mayer A M, Lerner H R. (1970). Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric*. 21: 542-544.
- Hasegawa D, Johnson R M, Gould W A. (1966). Effect of cold storage on chlorogenic acid content of potatoes. *J. Agric. Food Chem*. 14: 165-169.
- Henze R E. (1956). Inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid solutions with cysteine and glutathione. *Science*. 123: 1174-1175.
- Hicks K B, Sapers G M, Seib P A. (1990). Process for preserving raw fruit and vegetable juices using cyclodextrins and compositions thereof. *U.S.Patent*. 4:975-293.
- Himmelwright R S, Eickman N C, Solomon E I. (1980). Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc*. 102.
- Hsu A F, Thomas C E, Brauer D. (1988). Evaluation of several methods for estimation of the total activity of potato polyphenol oxidase. *J. Food Sci*. 53: 1743-1745.
- Hsu AF, Shieh JJ, Bills DD and White K. (1988). Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by ascorbic acid derivatives. *J Food Sci* 53:765-771.
- Hussan G, Al-Ruqaie IM. (1999). Occurrence, chemical composition, and nutritional value of truffles: an overview. *Pakistan J Biol Sci*. 2:510-14.
- H W, Duckworth, J E Coleman. (1970). The Journal of Biological Chemistry. Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. 245: 1613-1625
- Jaenicke E, Decker H. (2004). Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. *Micron - XIIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins* 35: 89-90.

- Janakat S, Al-Fakhiri SM, Sallal AK. (2004). A promising peptide antibiotic from *Terfezia claveryi* aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vitro. *Phytotherapy Res.* 18:810-13.
- Janakat S, Al-Fakhiri SM, Sallal AK. (2005). Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfazia claveryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Medical J.* 26:447-50.
- Janakat S, Nassar M. (2010). Hepatoprotective activity of desert truffle (*Terfezia claveryi*) in comparison with the effect of *Nigella sativa* in the rat. *Pakistan J Nutr.* 9:52-56.
- Janovitz-Klapp A H, Richard F C, Nicolas J. (1989). Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry.* 28: 2903-2907.
- Janovitz-Klapp A H, Richard F C, Goupy P M, Nicolas J J. (1990). “Kinetic studies on apple polyphenol oxidase”, *J. Agric. Food Chem.* 38:1437-1441.
- Janovitz-Klapp A H, Richard F C, Goupy P M, Nicolas J J. (1990). Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38: 926-931.
- Jolley R, Evans L, Makino N and Mason H. (1974). Oxytyrosinase. *J. Biol. Chem.* 249: 335–345.
- Kahn V. (1985). Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.* 50: 111-115.
- Kavrayan D, Aydemir T. (2001). Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chemistry*, 74: 147-154.
- Keilin D, Mann T. (1940). Some properties of laccase from the latex of Lacquer trees. *Nature.* 145: 304.
- Kelly S H, Finkle B J. (1969). Action of a ring-cleaving oxygenase in preventing oxidative darkening of apple juices. *J. Sci. Food Agric.* 20: 629-632.
- Klabunde T, Eicken C, Sacchettini J C, Krebs B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struc. Biol.* 12.
- Kuwabara T, Katoh Y. (1999). Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* 40: 1029-1035.
- Langdon T T. (1987). Prevention of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. *Food Technol.* 41: 64-67.
- Lax A R, Vaughn K C. (1991). Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31.

- Lee C Y, Jaworski A. (1988). Phenolics and browning potential of white grapes grown. *Am. J. Enol.Vitic.* 39: 337-340.
- Lee C Y, Kagan V, Jaworski A W, Brown S K. (1990). Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 38: 99-101.
- Lerch K. (1981). Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine-monoxygenase. in Metal ions in biological systems. H. Siegel. *New York, Marcel Dekker.* 13: 143-186.
- Lerch K. (1982). Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257: 6414-6419.
- Lerch K. (1995). Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. in Enzymatic Browning and Its Prevention. *American Chemical Society.* 600: 64-80.
- Lineweaver H and Burk D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. 56: 658-666.
- Loizides M, Hobart C, Konstandinides G, and Yiangou, Y. (2012). Desert truffles: the mysterious jewels of antiquity. *Field Mycology.* 13: 17-21.
- Luard E. (2006). Truffles. *Childs Hill, London: Berry & Co., Ltd.*
- Martinez M V, Whitaker J R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 195-200
- Mayer A M and Harel E. (1979). Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry.* 18: 193-215.
- Mayer A M, Harel E. (1991). Phenoloxidases and their significances in fruit and vegetables. *in Food enzymology.* 323-398.
- McEvily A J, Iyengar R and Otwell W S. (1992). Inhibition of Enzymatic Browning in Foods and Beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 253-273.
- Murcia MA, Martinez-Tome M, Jimenez AM, Vera AM, Honrubia M, Parras P. (2002). Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *J Food Protect.* 65:1614-22.
- Nicolas J J, Richard-Forget F C, Goupy P M , Amoit M J and Aubert S Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 109-157.
- Nicolas J, Billaud C. (2006). Prévention du brunissement enzymatique. in Les polyphénols en agroalimentaire. *Tec et Doc. Lavoisier.* 173-210.
- Nicoli M C, Anese M, Severini C. (1994). Combined effects in preventing enzymatic browning reactions in minimally processed fruit. *J. Food Qual.* 17: 221-229.

- Pegler D N. (2002). Useful Fungi of the World: the 'Poor man's truffles of Arabia' and 'Manna of the Israelites'. *Mycologist*. 16:8-9.
- Pendharkar M B, Nair P M. (1987). Alteration in phenylpropanoid metabolism in gamma irradiated potatoes. *Potato Res.* 30: 589-601.
- 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.
- Robb D A. (1984). Tyrosinase. In Copper Proteins and Copper Enzymes. (ed. R. Lontie) CRC. *Press Boca Raton, U.S.A.* 2:207-241.
- 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.
- Sanchez-Ferrer A, Rodríguez-López J N, Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F. (1995). Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1247: 1-11.
- Sapers G M, Hicks K B, Philips J G, Garzarella L, Pondish D L, Matulaitis R M, McCormack T J, Sondey S M, Seib P A, El-Ataway Y S. (1989). Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors, and complexing agents. *J. Food Sci.* 54: 997-1002, 1012.
- Sayavedra-Soto L A, Montgomery M W. (1986). Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *J. Food Sci.* 51: 1531-1536.
- Sims C A, Johnson R P, Bates R P. (1989). Quality of a non-sulfited *Vitis rotundifolia* and a *Euveitis* hybrid white wine produced from ultrafiltered juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 272-276.
- Sims C A, Bates R P, Johnson R P. (1990). Comparison of pre- and postfermentation ultrafiltration on the characteristics of sulfated and non-sulfated white wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 182-185.
- SOJO M M, NUNEZ-DELICADO E, GARCIA-CARMONA F, SANCHEZ-FERRER A. (1998). Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 47:518-523.
- Tappel A L. (1966). Effects of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems. In Cryobiology. H. T. Meryman (Ed.). *New York, Academic Press*. 163-177.
- Thomas P. (1984). Radiation preservation of food of plant origin, Part 1. Potatoes and other tuber crops. *Food Sci.Nutr.* 19: 327-379.

- Thomas P. (1986). Radiation preservation of food of plant origin, Part 3. Tropical fruits: bananas, mangoes, and papayas. *Food Sci.Nutr.* 23: 147-205.
- Tulasne L R & Tulasne C. (1851). Fungi hypogaei: Histoire et Monographie des Champignons Hypogés. Paris.
- Vámos-Vigyázó L. (1981). Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Food Sci.Nutr.* 15: 49-127.
- Van Gelder CWG, Flurkey WH and Wichers HJ. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry.* 45: 1309-1323.
- Varoquaux P. (1978). Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse de doctorat. Faculté des sciences de la vie et de l'environnement. Dijon. 131 p.
- Vaughn K C, Duke S O. (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112.
- Vaughn K C, Lax A R, Duke S O. (1988). Polyphenol oxidase : The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665.
- Villegas R J A, Kojima M. (1986). Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose. *J. Biol. Chem.* 261: 8729-8733.
- Wang S, Massimo F. Marcone. (2011). The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: Truffles. *Food Research International.* 44: 2567-2581.
- Walker J R L, Ferrar P H. (1995). The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.* 836-839.
- Walker J R L, Ferrar P H. (1998). Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 15: 457-498.
- Whitaker J, Lee C Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. in Enzymatic browning and its prevention. *Washington, American Chemical Society.* 2-7.
- Zawistowski J, Biliaderis C G, Eskin N A M. (1991). Polyphenol oxidase. in Oxidative enzymes in foods. *London, Elsevier Appl.* 217-273.
- 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.