

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

و البحث العلمي وزارة التعليم العالي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى أسطمبولي

معسكر

Faculté des... : Sciences de la nature et de la vie

Département de... :...Biologie

**Laboratoire de**.....<sup>1</sup>Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (LBGMSS), université de Mascara.

<sup>2</sup>Laboratoire d'enzymologie, faculté des sciences, département de biologie, université de Laghouat

## THESE de DOCTORAT en SCIENCES

Spécialité... : .....Sciences de la nature et de la vie.....

Intitulée

**Purification et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases  
de quelques variétés des dattes d'Algérie.**

Présentée par : .....BENACEUR Farouk.....

Le.....13...../....02.../2019.....

Devant le jury :

Président	TIR TOUIL Aicha	Pr	Université de Mascara
Examineur	ABOUNI Bouziane	Pr	Université de Sidi Bel Abbes
Examineur	HARIRI Ahmed	MCA	Université de Mascara
Examineur	CHAIBI Rachid	MCA	Université de Laghouat
Encadreur	GOUZI Hicham	MCA	Université de Laghouat
Co-encadreur	MEDDAH Boumedienne	Pr	Université de Mascara

Année Universitaire : 2018-2019

## **Dédicaces**

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A mes parents Abelkader et Aicha, pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.*

*A mon cher frère Yacine et mes tendres sœurs Ikram et Kenza pour leur complicité et leurs soutiens qu'ils n'ont cessés d'apporter au cours de ma formation, j'espère que la vie leur réserve le meilleur.*

*A mon adorable femme Wafa, pour sa patience, son amour, et son encouragement continuel.*

*A la mémoire de ma grand-mère Hadja Arbia pour sa douceur, ses conseils précieux, ses souvenirs inoubliables et le bonheur qu'elle a su me les partager, qu'Allah lui fasse resplendir d'une pure piété.*

*A toute ma famille ainsi qu'à mes amis.*

*Benaceur Farouk*

## *Remerciements*

*Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance au Dr Gouzi Hicham, ainsi qu'au professeur Meddah Boumedienne, maitre de conférence et Professeur au département biologie de l'université de Laghouat et l'université de Mascara, respectivement, pour m'avoir proposé ce thème et d'avoir accepté de m'encadrer. Pour leur orientations, leur conseils, leur disponibilité, leur encouragement et pour leur grandes qualités aussi bien humaine que scientifiques.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury :*

*Pr TIR TOUIL Aicha ; Pr ABOUNI Bouziane ; Dr HARIRI Ahmed et Dr CHAIBI Rachid qui nous 'ont honoré en répondant favorablement à notre requête tout en consacrant de leur temps précieux et leur effort pour examiner ce modeste travail.*

*Ma profonde reconnaissance va aussi au Dr AREF Neifar et Pr Grgouri Ali chercheurs au laboratoire de biotechnologie moléculaire des Eucaryotes au centre de biotechnologie de Sfax pour leur collaboration positive et leur générosité scientifique.*

*Un grand merci tout ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Sommaire

<b>I. Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1 : Généralités sur les dattes</b>	
1. Le palmier dattier .....	3
1.1. Généralités.....	3
1.2. Le palmier dattier en Algérie .....	4
1.3. Classification botanique .....	5
1.4. Statistiques de production et économie .....	6
1.2. La datte .....	7
2.1. Description morphologique .....	7
2.2. Stades de maturation et classification .....	7
2.3 Variétés des dattes en Algérie et leur distribution .....	9
2.4 Valeur nutritionnelle et composition biochimique .....	11
2.4.1. Source des fibre alimentaires et sucres.....	11
2.4.2 Source d'antioxydants naturels et métabolites secondaires.....	11
2.4.3 Sources de protéines ,acides aminés et enzymes.....	16
2.4.4 Source des sels minéraux et d'acides gras.....	17
2.5 Vertus thérapeutiques et pharmacologiques.....	17
<b>Chapitre 2 : La polyphénol oxydase</b>	
2. La polyphénol oxydase .....	19
2.1 Historique .....	20
2.2 Nomenclature et Activités.....	20
2.3 Localisation subcellulaire et rôle physiologique.....	21
2.3.1 Localisation subcellulaire.....	22
2.3.2 Rôle physiologique.....	22
2.4 Site actif et structure cristalline .....	22
2.5 Mécanisme réactionnel.....	23
2.6 Extraction et purification de PPO.....	25
2.7 Caractéristiques de la polyphénol oxydase.....	27
2.7.1 Poids moléculaire.....	33

2.7.2 Optimum pH et stabilité .....	34
2.7.3 Temperature optimale et stabilité .....	34
2.7.4 Spécificité de substrat .....	36
2.7.5 Paramètres cinétiques (Km et Vmax).....	39
2.8 Applications potentielles des PPO.....	41

### **Chapitre 3 : Brunissement enzymatique et son contrôle**

3. Méthodes de contrôle de brunissement enzymatique.....	46
3.1 Méthodes chimiques.....	47
3.2 Contrôle physique .....	56
3.2.1. Technologies de traitement non thermiques.....	58
3.2.2. Technologies de traitement thermiques .....	64

## **. III. Partie expérimentale**

### **Chapitre 4 : Matériel et méthodes**

4.1. Matériel végétal .....	71
4.2. Méthodes .....	72
4.2.1 Purification des PPO des dattes .....	72
4.2.2 Mesure d'activité et dosage des protéines durant la purification .....	73
4.2.3 Zymogramme, SDS-PAGE et poids moléculaire .....	73
4.2.4 Effet de stockage. ....	74
4.5 Caractérisation des PPOs des dattes .....	74
4.5.1 pH optimum et stabilité de pH .....	74
4.5.2. Température optimale et stabilité thermique .....	74
4.5.3. Effet de substrat.....	75
4.5.4 Paramètres cinétiques (Km et Vmax) .....	75
4.5.5 Effet de la concentration d'enzyme .....	75
4.6 Contrôle de brunissement enzymatique .....	76
4.6.1 Effet des détergents et agents chaotropiques .....	76
4.6.2 Effets des ions métalliques .....	76
4.6.3 Effet des inhibiteurs.....	76
4.6.4 Calcul des valeurs d'IC50 et analyse de type d'inhibition.....	77
4.7 Inactivation thermique.....	77
4.7.1 Analyse cinétique.....	77
4.7.2 Analyse thermodynamique.....	78

4.8.Analyse des données cinétiques.....	80
<b>Chapitre 5 :Résultats et discussion</b>	
5.1.Purification des PPOs de dattes.....	81
5.2.Effet de stockage.....	89
5.3.Caractérisation des PPOs des dattes.....	90
5.3.1 pH optimum et stabilité de pH.....	90
5.3.2Effet de la température et stabilité thermique.....	95
5.3.3Spécificité de substrat.....	99
5. 3.4Efficacité et affinité (Paramètres cinétiques Km et Vmax).....	100
5.3.5.Effet de la concentration de l'enzyme.....	107
5.4.Contrôle de brunissement enzymatique.....	111
5.4.1Effet des détergents et agents chaotropiques.....	111
5.4.2 L'effet des ions métalliques .....	115
5.4.3 Effet des inhibiteurs.....	119
5. 4.4 Cinétique de l'inhibition de la PPOs des dattes.....	122
5.4.4.1 Efficacité des inhibiteurs.....	122
5.4.4.2Mode d'action des inhibiteurs.....	129
5.4.5Inactivation thermique des PPOs des dattes.....	142
5. 4.5.1 Etude cinétique.....	142
5.4.5.2 Etude thermodynamique.....	153
<b>IV.Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>157</b>
<b>V.Références bibliographiques.....</b>	<b>160</b>

## *Liste des abréviations*

- A** : Constante d'Arrhenius
- A<sub>R</sub>** : Activité enzymatique résiduelle
- °C** : Degré Celsius
- °K** : Degré kelvin
- D** : Temps de réduction décimale
- DEAF** : Diethylaminophenol
- E<sub>a</sub>** : Energie d'activation
- EC** : Enzyme commission
- [I]** : concentration d'inhibiteur
- IC<sub>50</sub>** : concentration d'inhibiteur diminuant l'activité enzymatique initiale à 50%.
- IUB** : Union Internationale de la Biochimie
- K** : Constante de vitesse d'inactivation
- kGy** : Kilogray
- K<sub>I</sub>** : constante de dissociation du complexe EI
- K<sub>IS</sub>** : constante de dissociation du complexe
- K<sub>m</sub>** : Constante de Michaelis
- kV** : Kilovolt
- MHz** : megahertz
- ms** : milliseconde
- mW** : milliwatt
- NTP** : Programme national de toxicologie
- PPO** : Polyphénol oxydase
- R** : Constante des gaz parfaits ( $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )
- SDS** : Sodium dodécyl sulfate
- t<sub>1/2</sub>** : Temps de demi-vie
- UI** : Unité internationale
- V<sub>max</sub>** : Vitesse maximale
- Z<sub>t</sub>** : Température de réduction décimale
- ΔG** : Energie libre
- ΔH** : Enthalpie d'activation
- ΔS** : Entropie d'activation
- μs** : microseconde

## *Liste des figures*

N°	Titres	Pages
1	Carte de l'Algérie indiquant les différentes zones de culture de palmiers dattiers; en rouge sont ceux infestés par Bayoud, ceux en vert qui ne sont pas infestés	5
2	Production des dattes en Algérie	6
3	L'anatomie du fruit de la datte(Stade Tamr)	7
4	Différents stades de maturation de la datte selon leur DPP (jours post-pollinisation)	8
5	Les différentes activités de PPO	20
6	Diffraction aux rayons X de la PPO de <i>Coreopsis grandiflora</i> .(A) : Vue de dessus de l'aurone synthase mature. (a-hélices, vert; feuilles- $\beta$ , bleu)(B) Site de liaison du cuivre de l'AUS actif .(C) Centre site actif de l'aurone synthase (D)Distances entre les deux atomes de cuivres	23
7	Le mécanisme réactionnel de l'aurone synthase	26
8	Structure de certains substrats phénoliques	39
9	Domaines d'application potentielle de la Polyphénol oxydase	43
10	Schéma du système de champ électrique pulsé. Ti =température avant d'entrer dans la chambre d'entrée, To = température après la sortie la chambre	57
11	Mécanisme possible de l'inactivation du PPO de champignon induite par le HHP	59
12	Les variétés des dattes utilisées	71
13	Résultats de purification de Ghars PPO (A) Séparation sur chromatographie d'échange d'anions Q-Sepharose Big Beats. (B) Chromatographie par filtration sur gel S-200. (C) pistes 1 et 2 :PAGE-native au bleu de coomasie et avec pyrcatéchol de l'enzyme Pure ; D) SDS-PAGE :piste 3- marqueur de poids moléculaire de la protéine ,piste 4 :Les trois isoformes de PPO de Deglet nour.	85
14	Résultats de purification de Ghars PPO (A) Séparation sur chromatographie d'échange d'anions Q-Sepharose Big Beats. (B) Chromatographie par filtration sur gel Zorbax HPLC. (C) pistes 1 et 2 :PAGE-native de l'extrait brut et pure de Ghars PPO; D) SDS-PAGE :piste 3- marqueur de poids moléculaire de la protéine ,piste 4 et 5 l'extrait brut et pure de Ghars PPO.	86
15	Résultats de purification de Tadela PPO (A) Séparation sur chromatographie d'échange d'anions Q-Sepharose Big Beats. (B) Chromatographie par filtration sur gel Zorbax HPLC. (C) pistes 1 et 2 :PAGE-native de l'extrait brut et pure de Tadela PPO; D) SDS-PAGE :piste 3- marqueur de poids moléculaire de la protéine ,piste 4 et 5 l'extrait brut et pure de Tadela PPO	87



16	Résultats de purification de Tantbouchet PPO (A) Séparation sur chromatographie d'échange d'anions Q-Sepharose Big Beats. (B) Chromatographie par filtration sur gel Zorbax HPLC. (C) pistes 1 et 2 :PAGE-native de l'extrait brut et pure de Tantbouchet PPO ; D) SDS-PAGE :piste 3- marqueur de poids moléculaire de la protéine ,piste 4 et 5 l'extrait brut et pure de Tantbouchet PPO	88
17	Stabilité de l'activité enzymatique des PPOs des dattes à -4°C durant 8 semaines en présence de catéchol comme substrat.	89
18	Influence de pH (A) et stabilité de pH(B) sur la PPO de Deglet nour	90
19	Influence de pH (A) et stabilité de pH(B) sur la PPO de Ghars	91
20	Influence de pH (A) et stabilité de pH(B) sur la PPO de Tadela	91
21	Influence de pH (A) et stabilité de pH(B) sur la PPO de Tantbouchet	92
22	Influence de température (A) et stabilité thermique (B) sur la PPO de Deglet Nour	96
23	Influence de température (A) et stabilité thermique (B) sur la PPO de Ghars	96
24	Influence de température (A) et stabilité thermique (B) sur la PPO de Tadela	97
25	Influence de température (A) et stabilité thermique (B) sur la PPO de Tantbouchet	97
26	Les graphiques de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk pour la PPO de Deglet Nour	101
27	Les graphiques de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk pour la PPO Ghars	102
28	Les graphiques de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk pour la PPO de Tadela	103
29	Les graphiques de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk pour la PPO de Tantbouchet	104
30	Effet de la concentration de des enzymes des dattes ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) sur la vitesse initiale d'oxydation du catécholA)PPO de Deglet Nour,B) PPO de Ghars C) PPO de Tadela,D) PPO de Tantbouchet.	108
31	Effet de la concentration de certains inhibiteurs sur la PPO de Deglet Nour en présence de (A) Catéchol et de (B) pyrogallol comme substrats	124
32	Effet de la concentration de certains inhibiteurs sur la PPO de Ghars en présence de (A) Catéchol et (B) pyrogallol comme substrats	125
33	Effet de la concentration de certains inhibiteurs sur la PPO de Tadela en présence de (A) Catéchol et de (B) pyrogallol comme substrats.	126
34	Effet de la concentration de certains inhibiteurs sur la PPO de Tantbouchet en présence de (A) Catéchol et de (B) pyrogallol comme substrats	127
35	Schéma simplifié de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitive	130
36	Représentations de Lineweaver-Burk de l'inhibition de des PPO des dattes par l'acide ascorbique.(A) PPO de deglet Nour,(B) PPO de Ghars,(C) PPO de Tadela et (D) PPO de de Tantbouchet	131

37	Schéma simplifié de type Michaelis-Menten de l'inhibition noncompétitive	138
38	Représentations de Lineweaver-Burk de l'inhibition de des PPO des dattes par le L-Cysyéine.(A) PPO de deglet Nour,(B) PPO de Ghars,(C) PPO de Tadela et (D) PPO de Tantbouchet	134
39	Schéma simplifié de type Michaelis-Menten de l'inhibition incompétitive	137
40	Représentations de Lineweaver-Burk de l'inhibition de des PPO des dattes par le fluorure de sodium .(A) PPO de deglet Nour,(B) PPO de Ghars,(C) PPO de Tadela et (D) PPO de Tantbouchet	138
41	Représentations de Lineweaver-Burk de l'inhibition de des PPO des dattes par le fluorure de sodium.(A) PPO de deglet Nour,(B) PPO de Ghars,(C) PPO de Tadela et (D) PPO de Tantbouchet	140
42	Les graphes de l'inactivation thermique de la catéchol oxydase de Deglet Nour dans des températures comprises entre 60-75°C	143
43	Les graphes de l'inactivation thermique de l'oxydation de pyrogallol de Deglet Nour dans des températures comprises entre 60-75°C	144
44	Les graphes de l'inactivation thermique de la catéchol oxydase des datte dans des températures comprises entre 60-80°.(A) Ghars PPO,(B) Tadela PPO et (C) Tantbouchet.	145
45	Les graphes de l'inactivation thermique de l'oxydation de pyrogallol par les PPOs des datte dans des températures comprises entre 60-80°.(A) Ghars PPO,(B) Tadela PPO et (C) Tantbouchet	146
46	Les graphiques d' Arrhenius de l'inactivation thermique de l'oyxdation de catechol et pyrogallol par les PPOs des datte dans des températures comprises entre 60-80°.(A) Deglet Nour (B) Ghars (C) Tadela et (D)Tantbouchet.	148
47	Les graphiques de variation de réduction décimale avec la température (60-80°) Pour les PPOs des dattes en présence de catéchol et pyrogallol comme substrats .(A) Deglet Nour (B) Ghars (C) Tadela et (D)Tantbouchet	149

## *Liste des tableaux*

N°	Titres	Pages
1	Espèces du genre Phoenix avec leur commune locale nom et répartition géographique	4
2	Les différents cultivars des dattes algériennes et leur dans les trois zones	10
3	Teneur en phénol totaux (TP), flavonoïdes totaux (TFA), flavonols totaux (TFO) et tanins condensés totaux (CT) de dix cultivars de dattes algériens	14
4	Capacités antioxydantes de dix cultivars de dattes algériens.	15
5	Effet du pourcentage de sulfate d'ammonium sur l'extraction de PPO de différentes sources	27
6	Effet de la séparation de phase induite par la température (TIPS) sur l'extraction de PPO de différentes sources	28
7	Effet du partitionnement triphasé (TPP) sur l'extraction de PPO de différents sources.	29
8	Effet du système à deux phases aqueuses (ATPS) sur l'extraction de PPO de différentes sources.	30
9	Un aperçu sur les différentes méthodes chromatographiques appliquées à la purification de la PPO	32
10	Caractéristiques des PPOs d'origine végétale en terme de poids moléculaire, pH et de température pour différents substrats.	37
11	Applications potentielles et mode d'action de la PPO dans les différents domaines.	44
12	L'effet de certains inhibiteurs et leur mécanisme sur de l'activité de PPO	55
13	Activité résiduelle de la polyphénol oxydase dans certains fruits et légumes après un traitement thermique	69
14	Les valeurs des paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'inactivation thermique des polyphénol oxydases obtenues à partir de quelques sources végétales	70
15	Détail du procédé de purification de PPO à partir de variété Deglet-Noor	82
16	Détail du Procédé de purification de PPO à partir de variété Ghars	83
17	Détail du Procédé de purification de PPO à partir de la variété Tadela	83
18	Détail du Procédé de purification de PPO à partir de la variété Tantbouchet	83
19	Valeurs de pH optimum et stabilité de pH pour les PPOs des dattes	92
20	Valeurs de température optimale et stabilité thermique pour les PPOs des dattes	95
21	Spécificité des PPOs des dattes vis à vis de certains substrats	99
22	Paramètres cinétiques des PPOs des dattes	105

23	Valeurs de constante catalytique des PPOs des dattes	109
24	Effet des détergents et agents chaotropiques la PPO de Deglet Nour	111
25	Effet des détergents et agents chaotropiques la PPO de Ghars	112
26	Effet des détergents et agents chaotropiques la PPO de Tadela	112
27	Effet des détergents et agents chaotropiques la PPO de Tantbouchet	113
28	Effet des ions métalliques sur la PPO Deglet Nour	115
29	Effet des ions métalliques sur la PPO Ghars	116
30	Effet des ions métalliques sur la PPO de Tadela	116
31	Effet des ions métalliques sur la PPO de Tantbouchet	117
32	Effet de certains inhibiteurs sur la PPO de Deglet Nour en présence de (A) Catéchol et de (B) pyrogallol comme substrats	119
33	Effet de certains inhibiteurs sur la PPO de Ghars en présence de (A) Catéchol et de (B) pyrogallol comme substrats	120
34	Effet de certains inhibiteurs sur la PPO de Tadela en présence de (A) Catéchol et de (B) pyrogallol comme substrats	120
35	Effet de certains inhibiteurs sur la PPO de Tantbouchet en présence de (A) Catéchol et de (B) pyrogallol comme substrats	121
36	Efficacité et valeurs d'IC50 de certains inhibiteurs sur les PPOs des dattes	123
37	Paramètres cinétiques de l'inhibition compétitive des PPOs des dattes par l'acide ascorbique	132
38	Paramètres cinétiques de l'inhibition des PPOs des dattes par L-cystéine	135
39	Paramètres cinétiques de l'inhibition des PPOs des dattes par le fluorure de sodium	137
40	Paramètres cinétiques de l'inhibition des PPOs des dattes par le métabisulfite de Sodium	141
41	Paramètres cinétiques d'inactivation thermique pour la PPO de Deglet Nour	150
42	Paramètres cinétiques d'inactivation thermique pour la PPO de Ghars ,	150
43	Paramètres cinétiques d'inactivation thermique pour la PPO de Tadela ,	151
44	Paramètres cinétiques d'inactivation thermique pour la PPO de Tantbouchet,	151
45	Paramètres thermodynamiques d'inactivation thermique des PPOs des dattes	155

# **I.Introduction**

### Introduction

La datte, le fruit du palmier dattier « *Phoenix dactylifera* L » ,est l'un des produits agricoles importants dans les pays nord-africains,et moyen orient.La production globale des fruits de dattes dépasse des millions de tonnes métriques annuellement dans le monde dont l'Algérie est le producteur par excellence de ce fruit en occupant le rang de troisième producteur dans le monde après l'Arabie saoudite et l'Égypte . (Hazzouri et *al.*, 2015).

En Algérie, des centaines de variétés sont connues et identifiées ,différant entre elles par plusieurs caractéristiques morphologiques et/ou organoleptiques comme le goût ,la forme, la couleur et la consistance dont les plus consommées sont la variété « Deglet nour » a réputation nationale et internationale ,la variété « Ghars » ;le choix idéal lors des fêtes et préparations des gâteaux traditionnels, la variété de « Tantbouchet » avec sa couleur noire et sa forme arrondie typique et aussi la variété « Tedala » avec sa forme allongée et gout sublime.(Bouguedoura et *al.*,2015).

La culture de palmier dattier exige un climat aride et/ou semi-aride.En Algérie,la production des dattes est localisée dans le sud et Sud-Est Algérien notamment à Biskra et Ouargla. Un tel fruit doté de grande valeur énergétique constitue entre autres un aliment incomparable pour les algériens durant toutes les saisons et particulièrement pendant le mois sacré de Ramadhan du fait qu'elle représente une source riche en glucides simples y compris le glucose et le fructose,en protéines et pectine, en lipides, en sels, en fibres alimentaires et macroéléments, en vitamines et minéraux et aussi en métabolites secondaires et/ou composés phénoliques. (Markhand et *al.*,2010).

L'oxydation de ces derniers est un phénomène courant au niveau de fruits et légumes touchant entre autres leur couleur et certaines de leur propriétés en influençant surtout l'efficacité de processus de conservation et/ou de stockage. Une telle réaction est connue sous le vocable de « brunissement enzymatique » dont les dattes ne font pas l'exception et leur durée de conservation dépendent également de plusieurs facteurs y compris l'activité d'une enzyme clé appartenant à une famille particulière de métalloenzyme à cuivre nommée « Polyphenol oxydase –PPO-».(Molitor et *al.*,2016)

En présence d'oxygène entant que cofacteur de la PPO,il y aura la formation des polymères d'o-quinone appelés « mélanine »via deux réactions bien distinctes et complémentaires: l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) suivie de l'oxydation des o- diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2). (Zhou et *al.*,2018)

---

En vue de contrôle de brunissement enzymatique et/ou compréhension de mécanisme catalytique de cette enzyme, plusieurs études ont été rapportées sur diverses sources telles que les abricots (Derarja et *al.*,2017 ), Bourrache (Alici et Arabaci.,2016) châtaigne (Gong et *al.*, 2015), de prunes (Ioniță et *al.*,2017; Carvalho et Orlanda., 2017), mangue Attaulfo (Cheema et Sommerhalter.,2015)et Salake (Zaini et *al.*,2013) tandis que la PPO des dattes n'a pas eu une attention similaire. Ceci nous a suscité pour rapporter pour la première fois une étude détaillée sur les polyphénol oxydases de quatre variétés des dattes à haute consommation par le peuple algérien (Deglet Nour,Ghars,Tadala et Tantbouchet) tout en faisant une purification proprement dite avec une caractérisation biochimique en terme des paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_m$ ), l'effet de pH, l'effet de la température ,et de même une approche pratique de contrôle de brunissement enzymatique via deux méthodes, l'une chimique avec le suivi de l'effet de quatre familles des inhibiteurs souvent utilisés en industrie alimentaire(acides organiques,acide aminés,sulfites et fluorures) tout en déterminant leur mécanismes d'inhibition et/ou les valeurs d' $IC_{50}$  correspondantes, de même, une étude de l'effet des détergents et agents chaotropiques a été réalisée ,tandis que la deuxième implique une méthode physique avec le suivie de la cinétique de l'inactivation thermique en exploitant de même la stabilité enzymatique d'un point de vue thermodynamique.Le catéchol et le pyrogallol ont été utilisés comme substrats durant ce travail afin de faire également une comparaison entre la stabilité des activités catécholase et de l'activité triphénolase, respectivement vis-à-vis de plusieurs facteurs.

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

Le première partie concerne une synthèse bibliographique comportant trois chapitres aussi précise et actuels dont un chapitre sur la composition, vertus et propriétés des dattes ,un deuxième sur l'enzyme elle-même « PPO » et un troisième décrivant les méthodes de contrôle de brunissement enzymatique.

Une partie secondaire purement expérimentale englobe deux chapitres, un est conçu pour la présentation de matériels et méthodes utilisés et/ou appliqués et un deuxième est consacré à la discussion des résultats expérimentaux conduits lors de cette thèse.

Une récapitulation et/ou conclusion succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO de dattes sont regroupées dans le dernier chapitre.

# **Chapitre 1 :**

## **Généralités sur les dattes**



### 1.Le palmier dattier

#### 1.1 Généralités

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) est l'une des plus anciennes plantes cultivées par l'homme dans la péninsule arabique, en Asie du Sud-Ouest, en Australie, Mexique, Amérique du Sud, Afrique australe et du nord et aussi aux États-Unis, en particulier dans le sud de la Californie, Arizona et Texas. (Chao et Krueger., 2007 ; Al-Harrasi et al., 2014; Hazzouri et al., 2015). Cet arbre constitue également la culture principale à la fois traditionnelle et moderne de l'agriculture saharienne algérienne. En reconnaissance de ses fruits, le dattier est appelé l'arbre sacré (Porter et Sacred., 1993), l'arbre de vie (Nixon., 1951) et/ou le pain du désert (Simon., 1978).

Le palmier dattier appartient à la famille des acéracées (angiospermes, monocotylédones) et comprend environ 200 genres et plus de 2500 espèces. *Phoenix* (*Coryphoideae phoeniceae*) est l'un des genres avec environ 14 espèces (Tableau 1), originaires des régions tropicales ou subtropicales d'Asie du Sud ou d'Afrique, y compris *Phoenix dactylifera* L (Siddiq et al., 2013; Eoin., 2016). Très récemment, le génome entier du palmier dattier a été séquencé, ce qui permet de mieux comprendre la diversité d'une culture d'arbres fruitiers (Hazzouri et al., 2015).

Le nom de l'espèce *dactylifera* signifie "portant le doigt" dont cette nomenclature est issue de racine du mot grec *dactylus*, qui signifie "doigt", et du mot latin *ferous*, qui signifie "portant" (Ashraf et Hamidi-Esfahani., 2011).

L'économie des provinces du sud se repose principalement sur la culture du palmier dattier et l'utilisation de ses sous-produits sous forme de pâte, de farine, de sirop, de vinaigre, de levure et de confiserie. Cela fournit une source majeure de revenus pour les habitants des oasis. Toutes les parties du palmier dattier peuvent être exploitées, y compris les feuilles et les troncs utilisés pour la vannerie et la construction de maisons, le fruit est consommé sous forme fraîche et sèche, transformé pour produire du sirop (Mimouni et Siboukeur., 2011), ou fermenté pour produire du vin et du vinaigre, tandis que les feuilles et les graines sont utilisées dans l'alimentation des animaux. (Ould El Hadj et al., 2012).

## Chapitre 1 :Généralités sur les dattes

**Tableau 1** : Espèces du genre Phoenix avec leur commune locale ,nom et répartition géographique.( Al-  
Alawi et *al.*,2017)

Espèce	Nom local	Distribution géographique
<i>Phoenix acaulis</i>	Le dattier sans tiges	Bhutan, Nepal, Inde de nord
<i>Phoenix andamanensis</i>	Le dattier d'île Andaman	Myanmar
<i>Phoenix atlantica</i>	Le dattier d'Îles du Cap Vert	Îles du Cap Vert
<i>Phoenix caespitosa</i>	Le palmier dattier	Djibouti, Oman, Saudi Arabia, Somalia, Yemen
<i>Phoenix canariensis</i>	Le dattier d'îles Canaries	Australie, Bermuda,Italie, Espagne
<i>Phoenix dactylifera L.</i>	Le palmier dattier	La péninsule arabe ,Californie, Chine, El Salvador, Fiji,Iran, Inde, Mauritius, Est et Ouest d'Afrique, Pakistan,Espagne
<i>Phoenix loureiroi</i>	Le dattier du montagne	Chine, Himalaya, Inde, Indochine, Philippines
<i>Phoenix paludosa</i>	Le dattier du mangrove	Andaman, Inde, Indochine, Sumatra
<i>Phoenix pusilla</i>	Le dattier du Ceylan	Inde, Sri Lanka
<i>Phoenix reclinata</i>	Le dattier du Senegal	Afrique, La péninsule arabe, Comoros, Madagascar
<i>Phoenix roebelenii</i>	Le dattier Pygmé	Chine (Yunnan) au nord de IndoChine
<i>Phoenix rupicola</i>	Le dattier de falaise	iles d'Andaman, Bhutan, Inde
<i>Phoenix sylvestris</i>	Le dattier de l'inde	Inde Subcontinentale, Myanmar, Sud de la Chine
<i>Phoenix theophrasti</i>	Palmier crétois	Iles de Grece, Turquie

### I.2Le palmier dattier en Algérie

En Algérie ,le palmier dattier est cultivé dans de nombreuses oasis réparties dans le sud du pays,où le climat est chaud et sec. Les oasis sont des espaces de vie établis artificiellement au milieu d'une vaste zone aride où l'eau est présente.(Bouguedoura et *al.*,2015).

Ces systèmes oasis de production intensive complexe sont entretenus avec un équilibre très fragile. Compte tenu de la géographie de l'Algérie, il est possible de décrire plusieurs régions de culture du palmier dattier (Fig.1):

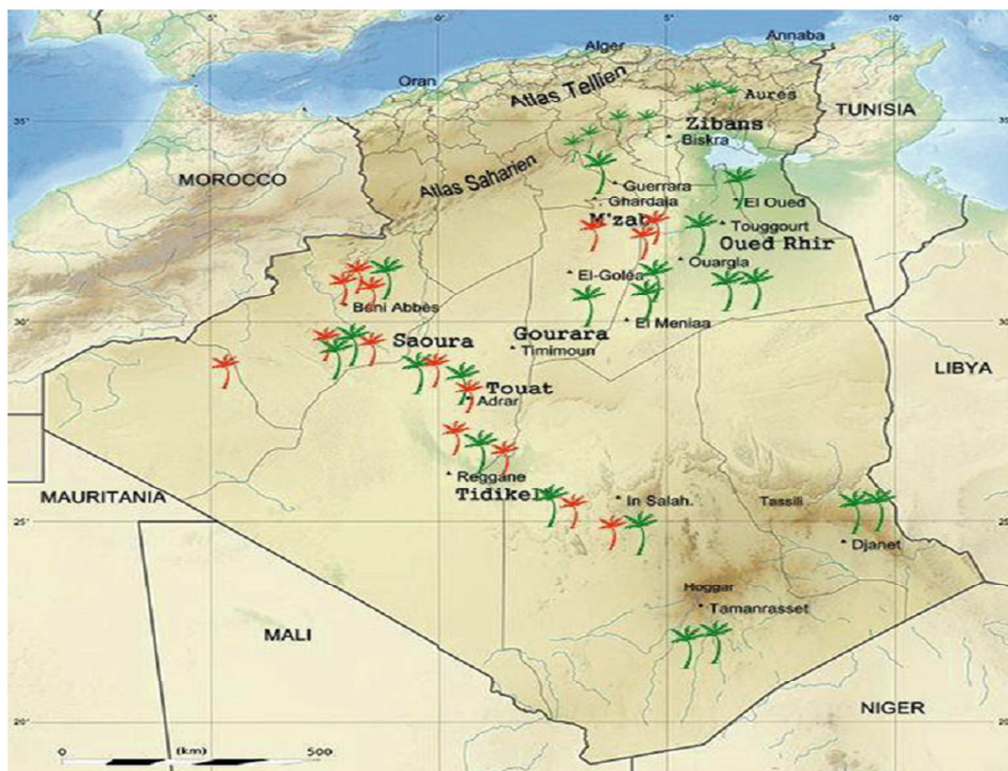
a) Sur les contreforts des montagnes de l'Atlas (Ksour Ouled Naïl, Zibans et Aures), est une chaîne d'oasis qui marque la porte du Sahara.

(b) à l'Est, les Zibans (Biskra), Oued Ghir, Oued Souf (El Oued) et le bassin de Ouar-gla en particulier avec le cultivar Deglet Noor de haute valeur commerciale.

c) à l'Ouest, Saoura (Beni Abbes), le Touat (Adrar), le Gourara (Timimoun),et le Tidikelt (Reggane) où les palmeraies incluent des cultivars de faible qualité commerciale.

C'est dans cette zone que la seule véritable résistance au bayoud existe (Le cultivar Tant bouchet)

(d) Au centre. El Golea, le M'zab (Ghardaïa) et Laghouat. (Bouguedoura et *al.*,2015).



**Fig. 1 :** Carte de l'Algérie indiquant les différentes zones de culture de palmiers dattiers; en rouge sont ceux infestés par Bayoud, ceux en vert qui ne sont pas infestés (Bouguedoura et al.,2015)

### 1.3 Classification botanique

En Algérie, seulement l'espèce du palmier dattier « *Phoenix dactylifera L* » existe. La classification botanique ainsi correspondante a été actualisée en 2016 par le service de conservation des ressources naturelles de département américain d'agriculture (USDA) et est donnée comme suit :

Règne : Plantae

Sous-règne Tracheobionta

Super-embranchement : Spermatophyta

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida – Monocotyledons

Sous-classe : Arecidae

Ordre : Arecales

Famille : Areaceae

Genre : Phoenix L.

Espèce : *Phoenix dactylifera L*

### 1.4.Statistiques de production et économie

La production de dattes en Algérie varie chaque année, en corrélation avec le cycle alterné du palmier dattier, les pratiques culturelles, les conditions climatiques et la région de culture. Cette production est passée de 317184 tonnes en 1994 à 1029526 tonnes en 2016, (FOASTATE.,2016) dont une augmentation de 324%. (Fig. 2).

Depuis 2016, le classement de l'Algérie dans la liste de top 10 producteur a été amélioré avec la troisième position après l'Égypte (1694813 tonnes) et l'Iran (1065704 tonnes). (FOASTATE.,2016).

Plus de 92% de l'augmentation de la production des dattes est due aux nouvelles plantations établies dans le cadre de l'adhésion à la propriété agricole (APFA) et le programme national de développement agricole (PNDA) (Benzouche.,2010), ainsi que le fort intérêt récent accordé à cette culture.

Les statistiques montrent que la production des dattes en Algérie est principalement concentrée dans le sud-est du pays, avec plus de 76% de la production nationale. La province de Biskra occupe la première place avec plus de 31%, suivie par El Oued (27%) et Ouargla avec 18%. Les spécificités édaphiques et pédoclimatiques comme la gestion des cultures et la valeur marchande des cultivars, justifient l'importance de la production dans ces régions. Dans les plantations de dattier ailleurs, la production est moins importante, contribuant à 24% de la production nationale totale de dattes réparties comme suit: sud-ouest (15%) et centre-sud (9%). (Bouguedoura et al.,2015)

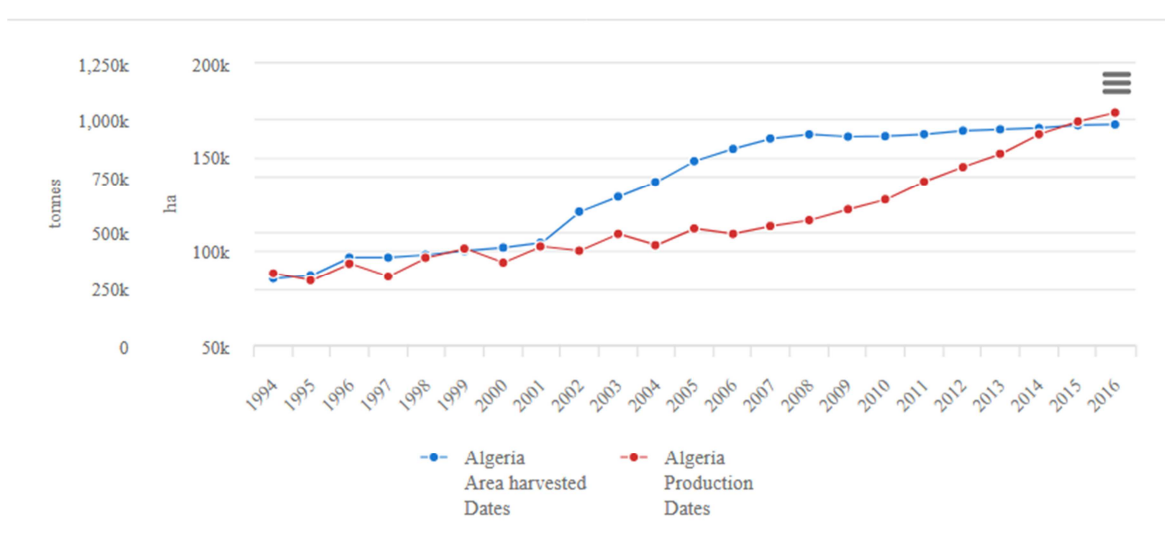


Fig. 2 :Production des dattes en Algérie (FAOSTATE.,2016)

### 2.La datte

#### 2.1.Description morphologique

Le fruit de la datte est composé d'un péricarpe, d'un mésocarpe, d'un endocarpe et une graine (Fig.3). Le mésocarpe, représente la plus grande partie de la pulpe du fruit, constituée de cellules parenchymateuses élargies et divisée en mésocarpe externe et en mésocarpe interne, intermédiaires de 3 à 10 couches du tannin (Shomer et *al.*,1998)

La graine a une face ventrale caractérisée par un sillon de profondeur variable et élargi. Le côté dorsal de la graine est convexe avec un petit trou peu profond appelé le micropyle ,sous lequel se trouve l'embryon. Les graines de différentes variétés de dattes diffèrent par la profondeur du sillon et la position de micropyle (centrale ou périphérique). (Ghnimi et *al.*,2017).

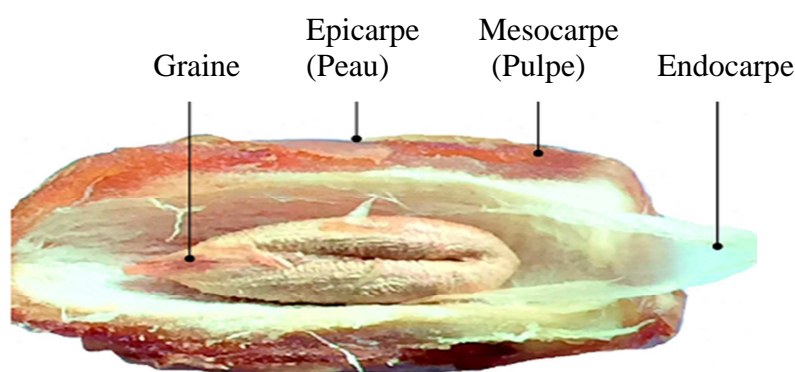


Fig.3 : L'anatomie du fruit de la datte(Stade Tamr) (Ghnimi et *al.*,2017).

#### 2.2.Stades de maturation et classification

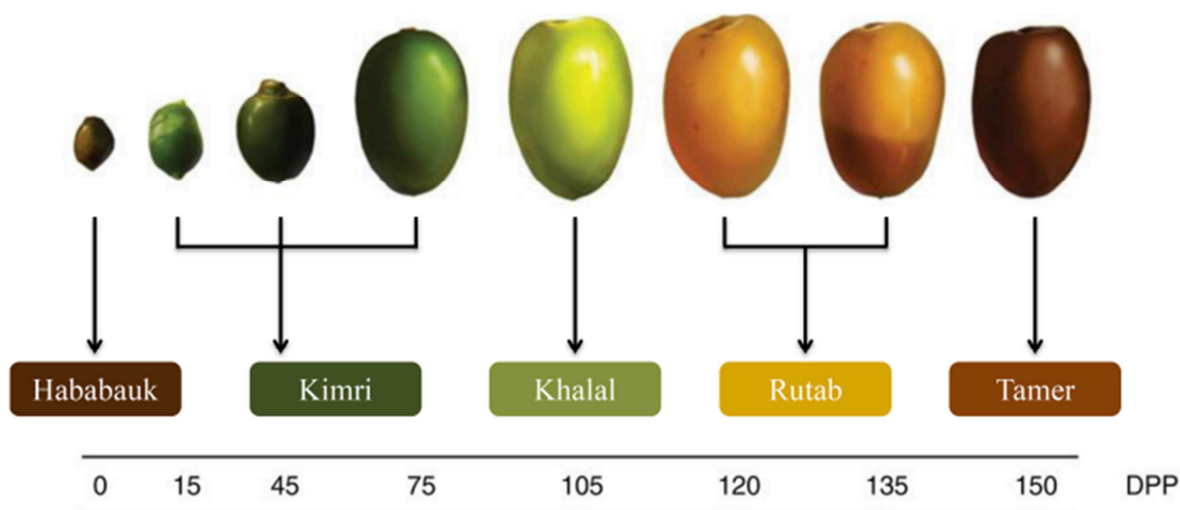
Le fruit de datte se développe à travers cinq stades de maturation différents :Hanabauk, Kimri,Khalal (ou Bistr), Rutab et Tamr ( Fig. 4). Les fruits deviennent comestibles au cours des trois dernières étapes en raison d'une diminution de l'amertume, l'augmentation de la douceur et l'amélioration de la tendresse de la chair et de la succulence (Baliga et *al.*, 2011).

La récolte des différentes variétés des dattes peuvent se faire de manière variable, le meilleur moment de la récolte dépend de caractéristiques de la variété elle-même.Au stade de Tamr, la taille, la forme, la couleur, la texture et la saveur des dattes varient en fonction de la variété et des conditions agro-climatiques (Chafi et *al.*,2015).

La forme des fruits au stade Tamr varie de la forme ovale à la forme cylindrique, avec des dimensions de 3 à 11 cm de longueur et de 2 à 3 cm de diamètre, et une couleur allant du jaune, du brun, du rouge au noir. Les fruits sont également différents dans la dureté de

## Chapitre 1 : Généralités sur les dattes

la partie externe et sont classés en fonction de leur teneur en eau dont nous reconnaissons des variétés molles ( $\geq 30\%$  d'humidité), semi-sèches (20-30% d'humidité) et sèches ( $\leq 20\%$ , activité d'eau  $\leq 0,65$ ) (Hussein et al.,1979).



**Fig.4 :** Différents stades de maturation de la datte selon leur DPP (jours post-pollinisation) (Mssallem et al.,2013)

En général, les dattes molles sont riches en sucres réducteurs. (fructose et glucose) et contiennent peu ou pas de saccharose tandis que les variétés sèches renferment une proportion relativement élevée de saccharose. Selon le type du sucre, les variétés de dattes sont classées en :

- Variétés riches en sucres réducteurs contenant principalement les sucres simples : glucose et fructose (par exemple les variétés Barhi d'Iraq et Saidy de la Libye)
- Variétés contenant des sucres mixtes (par exemple Khadrawy, Halawy, Zahidi d'Iraq et Sayer d'Iran),
- et des variétés ayant le saccharose comme principal sucre (par exemple Deglet Noor et Deglet Beida du nord d'Afrique). (Abbas et Ateya,2011)

La classification des dattes se fait à priori soit en fonction de la teneur en eau soit en fonction de type sucre sachant que la relation entre ces deux n'est pas strictement linéaire en raison de l'interférence des fibres. La quantité de sucres et la proportion relative de sucres influent sur la sorption d'eau, l'humidité et par conséquent la dureté du fruit. (Markhand et al.,2010).

### **2.3.Variétés des dattes en Algérie et leur distribution**

Les ressources génétiques du palmier dattier sont principalement représentées par des cultivars traditionnels des individus femelles sélectionnés par les agriculteurs en fonction de leur incidence (début juillet pour un début et décembre pour les cultivars tardifs), productivité, durée de stockage longue, moyenne ou impropre au stockage, valeur marchande, valeur nutritionnelle, qualités gustatives et leur résistance à la sécheresse et aux maladies, en particulier au bayoud (Bouguedoura et *al.*,2015).

Les cultivars reçoivent des noms vernaculaires locaux, très souvent, un nom berbère pour le fruit relatif à un emplacement géographique, au nom du village, ou même un propriétaire de ferme individuel. La sélection aléatoire chez l'agriculteur algérien depuis des millénaires a conduit à l'évolution de presque 1000 cultivars algériens, chacun bien adapté à des types de sol, de température et d'humidité légèrement différents. (Bouguedoura et *al.*,2015).

Les cultivars ne sont pas répartis équitablement entre les différentes oasis. Grâce au plan d'action du MADR (Ministère de l'Agriculture, du développement rural et de la pêche), qui vise à promouvoir les produits agricoles, le secteur algérien de la culture du palmier dattier a enregistré 994 cultivars à ce jour. Parmi ceux-ci, 7,7 millions de palmiers sont de cv. Deglet Noor, trois millions de cultivars des dattes molles et huit millions de cultivars des sèches. (Tableau 2). (Bouguedoura et *al.*,2015).

**Tableau 2:** Les différents cultivars des dattes algériennes et leur dans les trois zones (Bouguedoura et al., 2015)

Position	Région	localisation	Nombre des cultivars si-sonalés	Noms des cultivars identifiés
Est	Zibans	Biskra	9/140	Arechti, Degla Beida, Deglet Noor, Ghars, Ghazi, Mech Degla, Tantboucht, Tinicine, Zoggar Moggar
	Oued Souf	El Oued, El Meghaier, Djamaa	37/70	Arechti, Degla Beida, Deglet Noor, Ghars, Ghazi, Mech Degla, Tantboucht, Tinicine, Zoggar Moggar, Halimi-Halwa (Halwaya), Kesba, Khodri, Loulou, Masri-okrya, Tachelilt, Tacherwint, Tachlikt, Takermust, Takhedrayt, Tantboucht, Taoudent, Tarmount, Zaghraya, Zehdi, Deglet Noor, Ghars, Takermoust, Tanslit
Centre	Oued Righ	El Arfiane, Ouargla, Toug- gour	22/200	Aliyane, Beidh H'mam, Bentqala, Bouldjib, Degla Beida, Deglet G'rara, Deglet Mechta, Dguel El Hadj, El Caber, El Kid, Ghars-Halwa, Hamraya, Tafezwin, Akermoust, Tanetboucht,, Tanslit, Taoudanet, Tawragha, Tazegakht, Tinicine
	Aures Tassili	Khenchela Batna	3/220 3/180	Buzrur, 'Alig, Buhles, Mech Degla, Tanghimen, Tabanist, Khadaji
Ouest	M'zab	Ghardaïa, Berriane, Guerrara, Zelfana	26/140	Tamezouaret, Tanagarout, Tanetboucht, Tawragha, Tazerzayt, Tazizawt, Timdjouhart, Timedwel, Tinnaser, Tissibi, Adham Bent Q'bala, Ajujl, Baydir, Bent Q'bala, Bouarous, Chikh, Degla Beida, Deglet Noor, Gachouch, Ghars, Naser Ou Salah, Oucht, Sab'a Bedraa, Taddela (El Dala), Tademamt, Tafezwin, Tagerbucht (Akerbouch)
	Touat	Adrar, Ti-mimoun	8/190	Bamekhlouf, Feggus, Hmira, Ouarglia, Taqerbucht, Takerbucht Beida, Takerbucht Hamra, Taqerbucht Safra
Tidikelt	Saoura	Bechar, Béni Abbas	14/80	Adham Boula, Adham Timou, Adhamet El Rob, Cherka, Deglet Talmine, Feggus, Hmira, Hartan, Kenta, Khomira, M'charet, Taqerbucht, Timliha, Tinnaser
			4/60	Tgazza, Taqerbucht, Cheddakh, Agaz



### 2.4.Valeur nutritionnelle et composition biochimique

Les dattes prennent une grande importance dans la nutrition humaine en raison de leur composition riche en nutriments essentiels, dont les carbohydrates, les sels et minéraux, les fibres alimentaires, les vitamines, les acides gras,acides aminés et protéines. Ce qui justifie leur valeur nutritionnelle et économique remarquable.

#### 2.4.1.Source des fibre alimentaires et sucres

Les glucides,y compris les sucres solubles et les fibres alimentaires, sont les composants prédominantes dans les fruits des dattes suivies de petites quantités de lipides, de protéines et de cendres.La teneur en fibres alimentaires totales varie de 6,5 à 11,5% selon la variété et le climat (Al-Shahib et Marshall.,2003).

Les types de fibres alimentaires insolubles et solubles représentent entre 84 et 94% et 6 à 16%, respectivement. Les fibres alimentaires solubles contribuent à la formation d'un gel visqueux dans l'intestin qui ralentit l'absorption intestinale des facteurs anti-nutritionnels tels que le cholestérol. Les fibres insolubles, par contre, apportent de la masse et favorisent la fermentation et la génération d'acides gras à chaîne courte dans l'intestin (Ogles et Ozgoz.,2014).

L'hydrolyse des fibres alimentaires des dattes libère différentes substances :sucres (15,6 25,7%), acides uroniques (10,7-16,7%), cellulose (17,0-24,8%) et du lignine de Klason (33,3-50,4%) ( Mrabet et *al.*,2016).

Les carbohydrates des dattes sont principalement des types de fibres insolubles,par exemple les graines de Deglet Noor contiennent environ 50% de cellulose et 20% d'hémicelluloses.Les graines de datte comprennent un endosperme abritant des cellules vivantes qui stockent les oligosaccharides principalement sous la forme de  $\beta$ -D(1  $\rightarrow$  4) mannane (Bouaziz et *al.*,2010).

Les hétéroxylanes solubles sont également présents dans les graines de dattes et sont principalement composés de xylose (82%) et acide 4-O-méthylglucuronique (17%) avec de petites quantités d'arabinose et du traces de galactose, de glucose et de mannose (Ishurd et *al.*,2003)

#### 2.4.2Source d'antioxydants naturels et métabolites secondaires

Le fruit de datte est riche en composés phytochimiques tels que les caroténoïdes, les polyphénols (par exemple, acides phénoliques, isoflavons, lignanes et flavonoïdes), tanins,et stérols (Martín-Sánchez et *al.*, 2014).

La concentration et la composition de ces constituants est très variée en fonction de plusieurs paramètres, y compris la variété de la date, le stade de la cueillette des fruits, le

stockage, le traitement post-récolte, l'origine géographique des dattes et les conditions du sol (Al-Laith, 2009; Al-Turki et *al.*, 2010).

### **a) Les caroténoïdes et vitamines**

Les caroténoïdes considérés comme une classe majeure de composés phytochimiques sont présents dans les fractions lipidiques des fruits des dattes. Ils sont des précurseurs de la vitamine A, qui joue un rôle central dans la vision et protège la cellule face aux effets délétères des radicaux libres en agissant comme des antioxydants (Julia et *al.*, 2015).

Al Farsi et *al.*(2005) ont analysé à leur tour les caroténoïdes totaux pour trois variétés de dattes (Fard, Khasab et Khalas) et ils ont trouvé que Khalas a la plus grande quantité de caroténoïdes. Ils ont également signalé la diminution du taux de caroténoïdes de 4 à 30% après le séchage au soleil des fruits

La datte séchée est une source modérée de caroténoïde (0,97 mg / 100 g) par rapport à d'autres fruits séchés, par exemple ;figues et abricots: 0,032 mg / 100 g et 2,20 mg / 100 g ,respectivement (Martín-Sánchez et *al.*, 2014).

En outre, les dattes séchées sont généralement une source modérée des vitamines ,elles contiennent au moins six vitamines dont une petite quantité de vitamine C et de vitamine thiamine (B1), riboflavine (B2), Niacine (B3) pantothénique (B5), pyridoxine (B6) et de folate (B9) (Chao et Krueger, 2007; Al-Harrasi et *al.*, 2014; Siddiq et *al.*, 2013;Eoin., 2016).

Boudries et *al.*(2007) ont étudié la composition en caroténoïdes de trois variétés des dattes algériennes (Deglet nour,Hamraya,Tantbouchte) à différents stade de maturation (khallal, rutab and tamr).Ils ont rapporté la présence de Lutein et  $\beta$  carotène dans les trois variétés et de provitamine A provenant de  $\beta$ -carotène de et qu'il y a eu une dégradation des deux lors de passage de stade Khallal au stade tamr.

### **B) Phytosterols et Phytoestrogène**

Les phytostérols sont d'autres composés phytochimiques majeurs trouvés dans la fraction liposoluble du fruit de la datte. Ces composés se produisent exclusivement dans les plantes et ont une structure chimique similaire à celui du cholestérol (Al-Laith.,2009).

Les phytoestrogènes sont des composés naturels qui peuvent se lier aux récepteurs des œstrogènes et exercer divers effets oestrogéniques ou anti-œstrogéniques (Al-Turki et *al.*, 2010).

Thompson et *al.*(2006) ont étudié la teneur en phytoestrogènes des dattes et ils ont identifié plusieurs phytoestrogènes, y compris le formononétine, daidzéine, génistéine, glyciteine , matairesinol, lariciresinol, pinioresinol, secoisolariciresinol et coumestrol.

### c)Acides phénoliques

Les acides phénoliques considérés comme l'un des principaux métabolites secondaires aromatiques chez les végétaux, contenant une fonction hydroxyle située sur un cycle benzénique aromatique avec un ou plusieurs groupes d'acide carboxylique.(Al-Alawi et *al.*,2017 )

Les acides phénoliques peuvent être divisés en deux classes principales : benzoïque dont les dérivés acides contiennent sept atomes de carbone et les dérivés de l'acide cinnamique contiennent neuf atomes de carbone.Ils sont considérés comme antioxydant efficace parce qu'ils agissent comme des capteurs des radicaux libres.(Al-Alawi et *al.*,2017).

Plusieurs groupes de recherche ont rapporté que les dattes sont riches en acides phénoliques (Saleh et *al.*, 2011;Benmeddour et *al.*, 2013; El Sohaimy et *al.*, 2015).

Al Farsi et *al.*(2005) ont étudié trois fruits de datte d'Oman (Fard, Khasab et Khalas) et ont trouvé les dérivés d'acide benzoïque suivants;l'acide p-hydroxybenzoïque,l'acide protocatéchique, l'acide vanillique, acide gallique et l'acide syringique, tandis que les dérivés de l'acide cinnamique étaient; l'acide o-coumarique, l'acide p-coumarique,l'acide caféique et l'acide férulique.

Récemment,Borochov-Neori et *al.*(2015) ont étudié la composition phénolique de deux variétés de dattes « Amari et Hallawi », au stade Tamr.Ils ont rapportés la présence de cinq et sept acides phénoliques dans Hallawi et Amari, respectivement. Le principal composant de la fraction phénolique était l'acide férulique et une trace d'acide coumarique pour les deux variétés a été détectée.La variété Amari contient principalement des dérivés d'acide caféique, tandis que l'acide salicylique était l'acide phénolique le plus abondant dans Hallawi.

De même ,Mrabet et *al.*(2016) ont confirmé la présence d'Acide protocatéchique, l'acide vanillique,l'acide galique , l'acide syringique et l'acide p-coumarique dans trois différentes variétés de dattes tunisiennes.

### d)Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une grande famille de métabolites secondaires.Ils sont classés en plusieurs sous-groupes,y compris les flavones, les flavonols, les flavanones, le flavanonol, les isoflavones, isoflavonone, flavan-3-ols et anthocyanidines. Les flavonoïdes se trouvent dans les fruits et légumes et présentent un intérêt appréciable pour la santé comme antioxydant et anti-inflammatoire (Moss et Ramji.,2016).

## **Chapitre 1 :Généralités sur les dattes**

Hong et *al.*(2011) ont étudié la composition de la variété Deglet Noor, récoltée au stade de maturité Khalal.Ils ont constaté qu'elle contenait 13 flavonoïdes glycosides ,d'Apigénine, Lutéoline et quercétine, dont 19 composés en formes isomères .

Chaira et *al.*(2009) ont rapporté que Korkobbi est la variété la plus riche en flavo-noïdes parmi les dix variétés tunisiens étudiées, en conséquence, il montre un pouvoir anti-radical très élevé.

De même ,Benmeddour et *al.*(2013) ont rapporté une étude comparative sur la compo-sition phénolique et la capacité antioxydante de 10 cultivars algériens. (Tableau 3,et 4). Ils ont trouvé que le cultivar Ghazi est la plus riche en flavonoïdes et phénols totaux suivie de Arechti, Sebt Mira, Halwa, degla beida, Deglet Ziane, Mech degla, Thouri ,Deglet Nour et Itima.

**Tableau 3** : Teneur en phénol totaux (TP), flavonoïdes totaux (TFA), flavonols totaux (TFO) et tanins condensés totaux (CT) de dix cultivars de dattes algériens.( Benmeddour et *al.*,2013)

<b>Cultivars</b>	<b>TP (mg AG 100 g)</b>	<b>TFA (mg QE/100 g)</b>	<b>TFA/T P</b>	<b>TFO (mg RE/100 g)</b>	<b>TFO/T FA</b>	<b>CT (mg CE/100 g)</b>	<b>CT/TP</b>
Mech Degla	277.26 ± 8.51	45.09 ± 2.45	0.16	12.95 ± 0.23	0,28	147.05 ± 5.10	0.53
Deglet Ziane	288.66 ± 8.11	33.00 ± 1.60	0.11	12.79 ± 0.13	0.39	221.88 ± 9.75	0.77
Deglet Nour	225.57 ± 9.71	15.22 ± 0.50	0.06	6.73 ± 0.26	0.44	184.34 ± 12.61	0.82
Thouri	255.82 ± 8.59	21.97 ± 0.68	0.08	14.57 ± 0.24	0.66	135.83 ± 1.27	0.53
Sebt Mira	858.71 ± 25.13	231.76 ± 7.28	0.27	16.53 ± 0.31	0.07	389.15 ± 6.24	0.45
Ghazi	954.59 ± 6.90	299.74 ± 5.87	0.31	36.64 ± 2.13	0.12	525.06 ± 12.17	0.55
Degla Beida	331.27 ± 10.11	72.77 ± 3.77	0.32	16.04 ± 0.94	0.22	175.80 ± 2.70	0.53
Arechti	947.56 ± 25.32	153.89 ± 6.84	0.16	15.49 ± 0.31	0.10	420.59 ± 8.74	0.44
Halwa	562.12 ± 12.33	133.7 ± 4.12	0.24	28.94 ± 0.94	0.22	82.81 ± 3.43	0.14
Itima	229.92 ± 6.41	19.62 ± 0.92	0.08	12.74 ± 0.13	0.65	154.99 ± 4.72	0.67

**Tableau 4:** Capacités antioxydantes de dix cultivars de dattes algériens. (Benmeddour et *al.*,2013)

Cultivars	FRP (mg GAE/100 g)	DPPH scavenging capacity (%)	H2O2 Pouvoir scavenging (%)	FIC (%)
Mech Degla	272 ± 14	60.2 ± 0.1	85.2 ± 0.5	85.2 ± 0.5
Deglet Ziane	426 ± 17	60.4 ± 1.4	74.9 ± 1.2	69.9 ± 6.9
Deglet Nour	376 ± 14	60.0 ± 1.4	50.9 ± 0.4	48.9 ± 3.7
Thouri	471 ± 17	32.4 ± 1.3	24.1 ± 1.6	47.6 ± 1.2
Sebt Mira	1137 ± 10	82.4 ± 0.8	43.3 ± 2.4	91.5 ± 1.4
Ghazi	1175 ± 16	86.0 ± 1.4	97.5 ± 0.6	95.7 ± 3.4
Degla Beida	420 ± 10	67.8 ± 3.0	85.4 ± 0.4	95.6 ± 1.0
Arechti	912 ± 7	76.6 ± 0.8	83.2 ± 3.6	93.6 ± 3.9
Halwa	664 ± 11	79.1 ± 2.0	93.5 ± 1.2	53.09 ± 2.8
Itima	336 ± 11	52.2 ± 1.8	14.9 ± 1.7	66.5 ± 2.5

Hamad et *al.*( 2015) ont étudié aussi la composition phénolique de 11 différentes variétés des dattes saoudiennes et les composés d'apigénine, la lutéoline, la quercétine, l'isoquercétrine et la rutine ont été identifiés .

Lemine et *al.*(2014) ont signalé que le contenu en flavonoïdes totaux diminue de manière significative lors de passage du stade Khalal au stade Tamer pour sept différentes variétés des dattes. Une autre étude a montré que le contenu en flavonoïdes est réduit entre les stades de maturité Khalal et Tamer pour quatre variétés de fruits de datte tunisiennes Une telle perte partielle de composition phénolique s'est accompagnée avec une diminution de l'activité antioxydante . (Amira et *al.*,2012).

L'activité antioxydante totale des dattes, mesurée via le dosage par fluorescence ORAC, était de 8,212-12,543  $\mu\text{M} / \text{g}$  et était plus élevé que les autres fruits. Les fruits des dattes se sont avérés avoir la deuxième plus haute activité antioxydante parmi 28 fruits couramment consommés en Chine ( Guo et *al.*,2003).

La quantité d'antioxydants dans les variétés des dattes d'Oman séchées au soleil étaient comprises entre 217 et 343 mg équivalents d'acide férulique par 100 g d'extrait et est aussi élevée par rapport aux autres fruits (Al-Farsi et *al.*,2005).

L'activité antioxydante totale des dattes diminue lors du stockage à la température ambiante, probablement en raison de la conversion des tanins solubles en tannins insolubles et / ou oxydation enzymatique et disparition des flavanes et de l'acide caféoyl-shikimique (Lemine et *al.*,2014).

### 2.4.3.Sources de protéines,acides aminés et enzymes

La datte renferme une petite quantité de protéines environ 1 à 7% ,bien que malgré ce faible faible taux, un apport des acides aminés essentiels nécessaires au corps humain est assuré. La teneur en protéines des dattes est plus élevé dans le stade Kimri stade (5,5-6,4%). (24,27).Pour la plupart des acides aminés, la concentration en acides aminés est aussi plus élevée au stade kimri et khallal que le stade mûr (Tamr) (Ashraf et Esfahani.,2011).

Au cours de la maturation, les protéines jouent un rôle crucial dans les réactions de brunissement non enzymatiques (Maillard) et de précipitation des tanins. Cela pourrait être la raison de la diminution de la teneur en protéines au cours de la maturation. (Ashraf et Esfahani.,2011).

Al-Shahib et Marshall.(2003) ont rapporté la présence de 23 types d'acides aminés dont certains ne sont pas présents dans les fruits les plus populaires tels que les oranges, les pommes et les bananes.Les acides aminés suivants sont présents dans certains cultivars de dattes: lysine, histidine,arginine, l'acide aspartique, la thréonine, l'acide glutamique, la sérine, la proline, la glycine, l'alanine, la cystéine, la valine, la méthionine, l'isoleucine,la leucine,la tyrosine et le phénylalanine.Une forte concentration de l'acide glutamique a été rapporté dans les trois derniers stades de maturation, alors que la concentration l'acide aspartique est plus élevée dans la seconde étape. La datte contient un certain nombre de protéines dont le poids moléculaire varie de 12000 -72 000 daltons. La plupart d'elles sont solubles dans l'albumine. (Bouaziz et *al.*,2008).

Les principales enzymes présentes dans les dattes sont l'invertase, la polygalacturonase, la pectine estérase, cellulase ,la peroxydase et la polyphénol oxydase.L'invertase est complètement actif à la fin stade de maturation rutab. (Ashraf et Esfahani.,2011).

Ces enzymes ayant une relation infinie d'une part avec les caractéristiques organoleptiques du fruit et d'autre part avec la vitesse de maturation et la consistance de la chair. A titre d'exemple,nous retrouvons les polyphénol oxydase (PPO) et la peroxydase (POD) qui sont impliquées dans le phénomène de brunissement enzymatique. (Amiour et Ham-baba.,2016 ; Benaceur et *al.*,2018)

La polyphénol oxydase est la principale enzyme impliquée dans le métabolisme des tanins dans les datte, en utilisant le catéchol comme substrat. L'activité de polyphénol oxydase est plus élevée au stade Kimri suivi par khalal et Tamr.Le fruit de datte contient des niveaux élevés de polyphénol oxydase au moment où les fruits commencent à changer de couleur du jaune ou du rouge au brun. Une relation entre l'activité polyphénol oxydase et

l'intensité de la couleur de la datte pendant leur maturité a été rapportée. Ainsi, l'activité de polyphénol oxydase pourrait être responsable de la couleur brune naturelle de fruit de datte par oxydation des composés phénoliques.(Benaceur et *al.*,2018)

#### **2.4.4.Source des sels minéraux et d'acides gras**

Il y a au moins 15 sels minéraux dans le fruit de datte sèche.Le proportion de chaque élément varie de 0,1 à 916 mg/100g.Les minéraux présents dans la chair de datte comprennent le potassium en grande quantité (la datte est considérée comme une source importante de potassium), suivie dans l'ordre décroissant par phosphore, magnésium, sodium et fer. Le bore, du calcium, du cobalt, du cuivre, du fluor, du manganèse, du sélénium et du zinc sont aussi présents (Ashraf et Esfahani.,2011).

Le fruit de datte contient peu de graisse, qui varie habituellement de 0.5% au stade Kimri à 0,1% au stade Tamr .Huit acides gras existent en très faible concentration dans la chair. Les principaux acides gras saturés ai niveau de fruit de datte sont les acides laurique, myristique et palmitique.Le principal acide gras insaturé est l'acide oléique. D'autres acides gras sont en quantité mineure y compris les acides capriques, caprylique, stéarique, margarique, arachidonique, linoléique, pelargonique et un certain nombre d'autres (Biglri.,2009).

#### **2.5Vertus thérapeutiques et pharmacologiques**

Les antioxydants ont reçu une grande attention en raison de leur action entant que piègeurs de radicaux libres impliqués dans le développement diverses maladies y compris le cancer (Gorrini et *al.*, 2013), les maladies cardiaques (Moss et Ramji, 2016), Alzheimer (Frost et *al.*, 2014) et la maladie de Parkinson (Kim et *al.*, 2015).

L'activité antioxydante des composés phénoliques est comparable aux antioxydants standards, tels que la vitamine C, de vitamine E et de  $\beta$ -carotène (Rautiainen et *al.*, 2016).

Les études in vitro et in vivo sur les dattes ont confirmé leur vertus et bienfaits pour la santé;y compris activité de stress oxydatif,capacité de piégeage des radicaux libre , prévention des maladies coronariennes, hépatoprotecteur, activités anti-inflammatoires et anti-cancéreuses.(Rautiainen et *al.*, 2016).

Une enquête antérieure a révélé que les dattes renferment une concentration forte de polyphénols totaux parmi les fruits secs en raison de la plus grande exposition au soleil et aux conditions extrêmes de température par rapport aux autres fruits .Cependant, leur composition peut varier d'un cultivar à cultivar selon les conditions du sol et pratiques agricoles. (Vinson et *al.*, 2005).

## Chapitre 1 :Généralités sur les dattes

---

Guo et *al.*(2003) ont étudié les activités antioxydantes de 28 fruits couramment consommés en Chine et ils ont constaté que les fruits des dattes possèdent la deuxième plus haute activité antioxydante après l'Aubépine .

Saafi et *al.*(2011) ont rapporté l'effet protecteur de l'extrait aqueux de la variété Deglet Noor vis-à-vis de dommage oxydatif ainsi que l'hépatotoxicité

Mansouri et *al.*(2005) ont confirmé les effets immunomodulateurs des extraits aqueux de datte mature , pruneau et figue chez les souris (Mansouri et *al.*, 2005). Ils ont trouvé que l'extrait de datte favorise plus le système cellulaire que le pruneau et l'extrait de figue.

En outre, il a été rapporté que les glycosides de type diosmétine peuvent augmenter l'excrétion d'insuline et stimulent l'enzyme glycogène synthase, assurant par conséquent l'homéostasie des taux de glucose sanguin *in vivo*. En outre, le traitement des rats mâles par ces deux composés ont montré une forte augmentation du taux sérique de testostérone accompagnée d'une diminution significative du phosphore total et prostatique (Singh et *al.*, 2012).

Al-Yahya et *al.*(2015) ont étudié l'effet cardioprotecteur d'extrait aqueux de fruit lyophilisé (variété Ajwa) *in vitro* et *in vivo* et ils ont constaté qu'il améliore la prolifération cellulaire cardiomyoblastique jusqu'à 40%, tout en empêchant la dégradation d'antioxydants endogènes et la peroxydation lipidique.

Garba et Galadima (2012) ont examiné le potentiel antimicrobien de l'extrait de fruit de la datte sur deux bactéries( *salmonella spp.* et *shigella spp*) qui causent la diarrhée. Une inhibition remarquable et activité importante comme anti-diarrhée a été mentionnée .

El Sohaimy et *al.*(2015) ont signalé aussi l'activité anti-microbienne certains dattes égyptiennes contre cinq souches bactériennes pathogènes.

Souli et *al.*(2014) ont suggéré que l'extrait aqueux de fruit de datte accélère l'activité de transit gastro-intestinal et réduit le risque de constipation.

Dans une autre étude récente, Belmir et *al.*(2016) ont signalé l'activité antifongique de l'extrait de fruit (variété Ajwa) au stade Tamr. Ils ont également décrit que l'extrait aqueux de datte empêche la cytotoxicité des globules rouges.

Enfin, la consommation des dattes peut avoir des avantages potentiels pour la santé contre de nombreux types de cancer. Al-Sayyed et *al.*(2014) ont vérifié les effets potentiels de prévention du cancer par les dattes. Ils ont remarqué que l'augmentation de la consommation des dattes sèches réduit significativement le taux d'incidence du cancer mammaire, palpable ,la multiplicité de la tumeur, la taille et le poids de la tumeur par rapport à la groupe de contrôle positif .



**Chapitre2 :**  
**La polyphénol oxydase**

## 2. La polyphénol oxydase

### 2.1 Historique

Les premiers travaux ont été faits par Lindet, qui en 1895 a reconnu la nature enzymatique du brunissement pendant son travail sur la cidre. Au même moment, Bourquelot et Bertrand (1896) poursuivaient des études sur la tyrosine oxydase des champignons. Par la suite, Onslow en 1920 a montré que le brunissement enzymatique des tissus de plante est lié à la présence des composés o-diphénoliques, tels que le catéchol, l'acide protocatéchique et l'acide caféique, ainsi que les enzymes appropriées (oxygénases).

On pensait que le produit de cette réaction était un peroxyde qui réagissait avec un «chromogène» pour former un pigment brun. Le terme «oxygénase» a été ensuite remplacé par «phénolase» ou «Polyphénol oxydase». En 1937, Kubowitz a démontré que la PPO était une enzyme contenant du cuivre.

Kertész (1952) a rapporté pour la première fois le rôle des ions métalliques de tyrosinase et polyphénoloxidasase dans le processus de mélanogenèse.

En 1955, Dawson et Magge ont publié un des premiers chapitres à l'époque sur les tyrosinases des plantes tout en signalant la présence du brunissement enzymatique dans les champignons, les pommes de terre, les pommes et de nombreux autres fruits et légumes voire végétaux.

La première purification de la polyphénol oxydase remonte au 1965, où Kertész et Zito ont pu purifier par dialyse et ont caractérisé la PPO de champignons de Paris alors qu'il fallait attendre jusqu'au 1980 pour lancer une purification sophistiquée sur la PPO de Pêche Red Haven en utilisant la chromatographie sur colonne (Phenyl Sepharose, ECOLA Cellulose, Hydroxyapatite et DEAF-Sephadex benzoylée) (Flurkey et Jen., 1980).

La première immobilisation de cette enzyme a été réalisée sur des membranes en nylon et polyéthersulfone (Boshoff et al., 1998), et la première structure cristallographique est celle de la PPO d'*Ipomoea batatas* (Klabunde et al., 1998).

Dans les deux dernières décennies, des centaines d'articles sont publiés annuellement sur cette enzyme et ceci sur plusieurs axes et approches à savoir la purification et caractérisation biochimique et cinétique, le contrôle de brunissement enzymatique d'une part par des inhibiteurs naturels ou chimiques (produits ou acides organiques) et d'autre part par des méthodes physiques impliquant soit un traitement thermique, par pression, UV ou ultrasons soit une combinaison de deux ou trois méthodes. Ainsi qu'un aspect moléculaire et génétique impliquant le séquençage et la mise en place de sa structure cristallographique.

## 2.2. Nomenclature et Activités

L'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (NC-IUBMB) avait donné aux enzymes des noms systématiques fondés sur le type de réaction qu'elles catalysent et sur la spécificité de leurs substrats.

La polyphénol oxydase (PPO) est une metalloenzyme appartenant à la famille d'oxydoréductase. Différents noms et codes enzymatiques sont attribués à cette enzyme en fonction de substrat oxydé et/ou réaction catalysée. Nous citons la tyrosinase, appelée aussi tyrosine oxydase, monophénol oxydase et crésolase (EC 1.14.18.1). Cette enzyme catalyse l'oxydation des substrats monophénoliques (tyrosine et *p*-crésol) en *o*-diphénol. (Figure.5) (Taranto et al., 2017).

La deuxième activité complémentaire implique l'*o*-hydroxylation des *o*-diphénol en *o*-quinone (Figure 5). Ces derniers se polymérisent pour donner par la suite un pigment brun voire noir appelé mélanine. L'enzyme responsable de cette activité est la catécholase ayant comme noms aussi la catéchol oxydase, *o*-diphénolase et *o*-diphénolse oxydase. (EC 1.10.3.2) (Taranto et al., 2017).

Ces deux réactions sont généralement consécutives mais pas tout le temps présentes simultanément. Par exemple pour le fruit de datte et abricot nous ne retrouvons que l'activité catécholase. (Amiour et Hambaba., 2016 ; Derardja et al., 2017)

Il est intéressant de noter qu'un autre polyphénol oxydase ; la laccase (*p*-diphénol: oxygène oxydoréductase, E.C. 1.10.3.2), est présente dans certaines plantes supérieures et se différencie clairement d'autres PPO par sa capacité unique à catalyser l'oxydation de *p*-diphénol (Jiang et al., 2016).

De plus, la polyphénol oxydase nécessite la présence de cuivre entant que cofacteur soit monovalent ou divalent tout dépend de l'espèce et aussi de l'oxygène entant que coenzyme et comme accepteur d'électron.

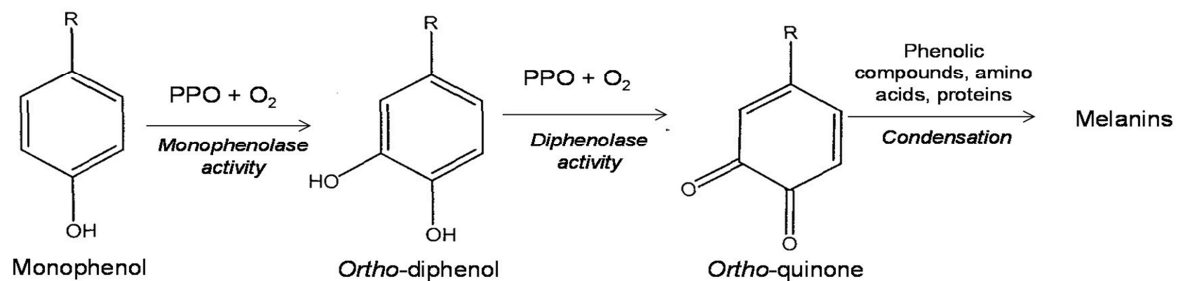


Fig 5 : Les différentes activités de PPO (Jiang et al., 2016)

## 2.3. Localisation subcellulaire et rôle physiologique

### 2.3.1. Localisation subcellulaire

La PPO est présente dans une grande variété de plantes. Dans une plante particulière, l'activité de la PPO varie d'un organe à l'autre et à l'intérieur d'un même organe en fonction du tissu considéré (Taranto et al., 2017).

Les PPOs ont été trouvées dans différentes fractions cellulaires, dans les organelles (chloroplastes et, plus précisément, dans les thylakoïdes, les vacuoles, les mitochondries, les peroxysomes) où les enzymes sont étroitement liées aux membranes et dans la fraction soluble de la cellule. Le degré de liaison aux membranes varie avec le tissu et son état ontogénique. Ainsi, l'activité globale de la PPO est plus élevée et présente principalement sous forme liée chez les jeunes fruits verts, alors qu'elle diminue généralement avec l'augmentation de la proportion solubles dans les fruits mûrs (Jiang et al., 2016).

### 2.3.2. Rôle physiologique

Le rôle physiologique des PPOs demeure en grande partie obscur et donc très controversé. Les premières études ont suggéré son implication en tant qu'oxydase terminale dans la respiration (James., 1953) ou dans la biosynthèse de la lignine (Mason et al., 1955). Il a été montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*). (Lax et Vaughn., 1991)

Plusieurs études ont rapporté une corrélation positive entre l'expression de PPO et la résistance/tolérance aux stress biotique. Par exemple, les variétés de pommes de terre ayant une activité PPO améliorée présentaient plus grande tolérance à la maladie de la pourriture molle causée par la bactérie *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis* et *Dickeya spp.* (Ngazee et al., 2012)

De même, l'expression de la PPO a été utilisée comme marqueur biochimique pour prédire l'interaction entre différents génotypes de tomates et les pathogènes de *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas axonopodis pv. Vésicatoria*) causant le flétrissement bactérien et la maladie bactérienne des taches foliaires, respectivement (Vanitha et al., 2009)

Plusieurs rapports ont également signalé le rôle défensif des PPO. Li et Steffens (2002) ont constaté que les plantes de tomates surexprimant une PPO de pomme de terre présentaient une résistance remarquable vis-à-vis *Pseudomonas syringae pv. tomate*, agent causal de la maladie bactérienne. Inversement, chez les plantes transformées avec l'ADNc antisens de la PPO, une réduction significative de l'activité des PPO a entraîné une augmentation de la susceptibilité à la maladie (Thipyapong et al., 2004).

De nombreuses questions doivent être posées sur le rôle physiologie de PPO, bien qu'il soit généralement supposé que les PPOs jouent un rôle dans les réponses de défense aux stress biotiques. Le mécanisme réel par lequel elles exercent leur fonction est débattue. En fait, elles peuvent agir par: (1) une toxicité directe des quinones; (2) réduction de la biodisponibilité et alkylation des protéines cellulaires vers l'agent pathogène; (3) Réticulation des quinones avec des protéines ou autres composés phénoliques, formant des barrières physiques; et (4) la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), connus par leur rôle important dans la signalisation de défense (Castañera et al., 1996).

Les PPOs pourraient éventuellement jouer un rôle dans la photosynthèse en tant que tampon d'oxygène ou en interaction avec la réaction de Mehler-peroxydase. Cependant, les substrats phénoliques chloroplastiques n'ont pas été identifiés (Boeck et al., 2015).

#### **2.4. Site actif et structure cristalline**

La structure cristalline de l'aurone synthase (AUS) « une catéchol oxydase » de Coreopsis à grandes fleurs (*Coreopsis grandiflora*) a été récemment publiée par Molitor et al. (2016). L'enzyme présente deux domaines : le domaine catalytique actif et le domaine C-terminal. Le motif structurel dominant du C-terminal est un repliement de Jelly roll. Des motifs similaires sont également présents dans les PPO de champignons (Mauracher et al., 2014) (C-terminal), arthropodes (N-terminal) (Masuda et al., 2014) et insectes (Li et al., 2009) (N-terminal).

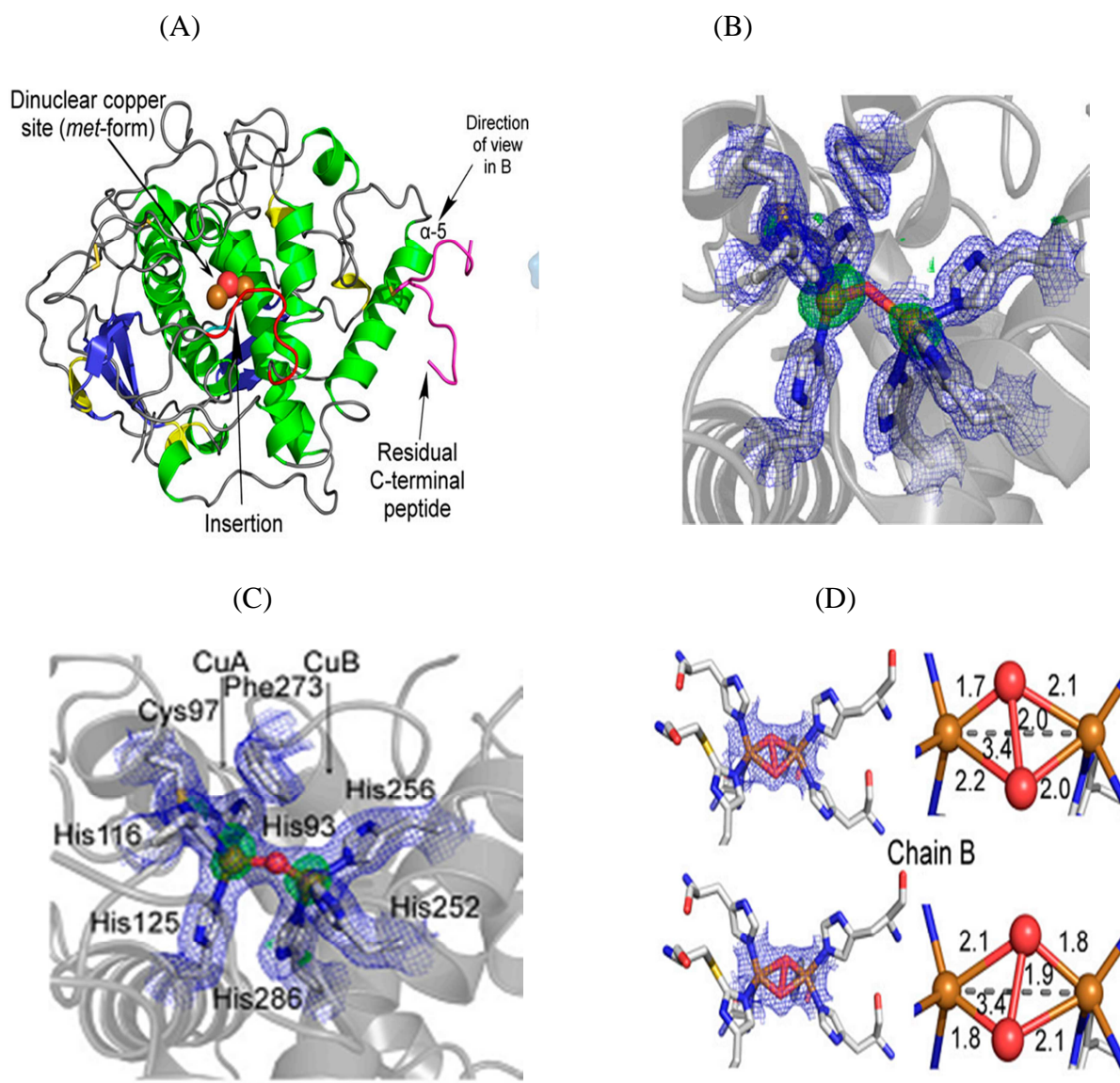
Elle possède une très grande similarité structurelle avec le catéchol oxydase d'*Ipomoea batatas* (Klabunde et al., 1998) celle de *Vitis vinifera* (Virador et al., 2010) et *Juglans regia* (Bijelic et al., 2015).

La structure secondaire est essentiellement  $\alpha$ -hélicoïdale. En raison de la liaison disulfure interdomaine du noyau principal avec le domaine C-terminal, l'activation protéolytique de l'enzyme latente doit se produire à trois différents sites pour aboutir à l'enzyme active (Figure 6,a) (Molitor et al., 2015). Cependant, la structure cristalline de l'enzyme a montré que la fonction principale de la liaison interdomaine est la rétention du peptide résiduel, impliquant un bloc de construction principal de l'interface homodimérique (Fig 6.B). Deux sites de clivage protéolytique sont exposés à la surface. En revanche, le troisième est couvert par le domaine C-terminal aussi bien que par le noyau principal mais devient accessible après le clivage protéolytique aux deux premières coupures. (Molitor et al., 2016).

Le centre catalytique est formé de deux atomes de cuivre (CuA et CuB). La paire de cuivre (CuA et CuB) (Fig 6,C) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidines. Le

CuA est coordonné par l'His 116, His 125, et l'His 286. Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 93, His 256 et l'His 252. (Molitor et al., 2016).

La forme oxy de cette enzyme présente une distorsion papillon (Figure 6,C) similaire à la distorsion trouvée dans la forme oxy de la tyrosinase de *Streptomyces castaneoglobisporus* tyrosinase (Matoba et al., 2006). Dans la forme au repos « Met », les ions de cuivre (distance CuII-CuII équivalent à 3,4 Å) (Fig 6,D) sont pontés par un ion hydroxyde ou une molécule d'eau (Molitor et al., 2016).



**Fig 6** : Diffraction aux rayons X de la PPO de *Coreopsis grandiflora*. (A) : Vue de dessus de l'aurone synthase mature. (a-hélices, vert; feuilles- $\beta$ , bleu) (B) Site de liaison du cuivre de l'AUS actif. (C) Centre site actif de l'aurone synthase (D) Distances entre les deux atomes de cuivres. (Molitor et al., 2016)

## 2.5. Mécanisme réactionnel

Le site actif de la polyphénol oxydase est nommé site cuivre type 3 en raison de la présence de trois formes différentes ; la forme *met*, la forme *oxy* et la forme *desoxy*.

Sanchez-Ferrer et *al.* (1995) et Lerch. (1995) sont les premiers décrivant le changement de la valence de cuivre entre une forme et un autre en fonction de substrat oxydé et l'activité mise en jeu en travaillant sur la PPO de champignons de paris.

Le mécanisme réactionnel le plus récent a été proposé par Molitor et *al.* (2016) suite à la mise en place de la structure cristalline de l'aurone synthase, une catéchol oxydase de *Co-reopsis à grandes fleurs* (Fig 7). Ils ont décrit la présence de deux cycles ; un cycle pour l'activité monophénolase et un autre pour l'activité diphénolase

La forme *Met* représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphénols en quinones. Le site actif passe sous forme *Désoxy* dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite. Ils deviennent alors capables de fixer l'oxygène moléculaire pour passer sous la forme *Oxy*. Cette dernière peut prendre en charge aussi bien les mono que les *o*-diphénols. (Eicken et *al.*, 1999).

Le passage d'une forme à l'autre entraîne des modifications de la géométrie spatiale des six atomes d'azote des résidus histidine et le rapprochement des deux atomes de cuivre l'un par rapport à l'autre (forme *Désoxy*). Ces phénomènes sont liés à des légères modifications de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme au cours de la catalyse (Sanchez-Ferrer et *al.*, 1995).

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

Dans l'activité crésolase, l' $O_2$  est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du *deoxy*-PPO pour donner l'*oxy*-PPO dans laquelle l' $O_2$  a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite, un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'*oxy*-PPO, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau conduisant à la formation des *O*-quinone (John et *al.*, 1995).

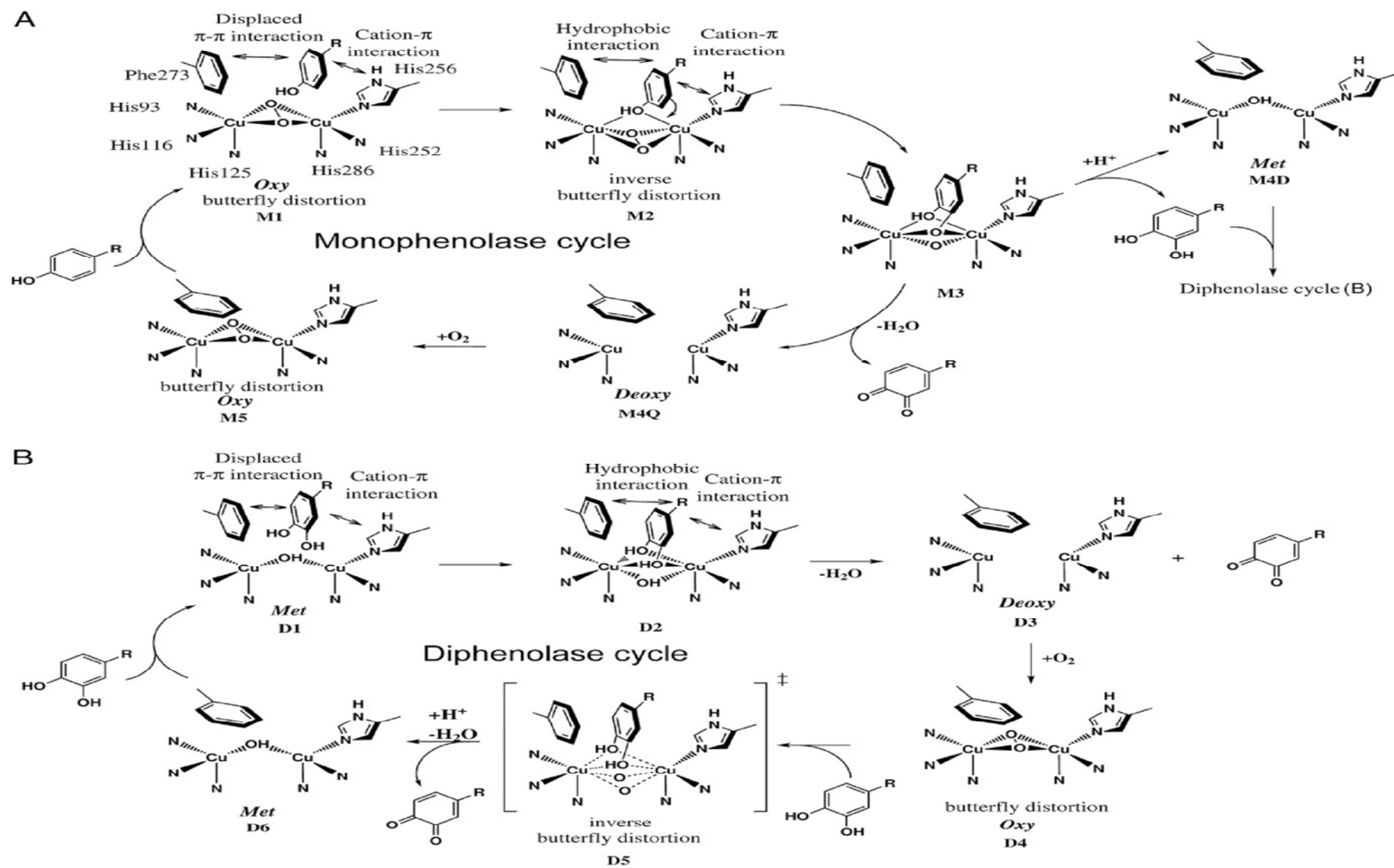


Fig 7 :Le mécanisme réactionnel de l'aurone synthase (Molitor et al.,2016)



## 2.6. Purification de PPO

La diversité dans la source ainsi que la localisation subcellulaire des PPO impliquent entre autres différentes méthodes d'extraction et de purification. Ces méthodes sont choisies en fonction de l'activité et rendement de purification de l'enzyme, la faisabilité et facilité de manipulation, la concentration en protéines, la présence de contaminants et l'application finale de l'enzyme.

Dans la plupart des études, une combinaison d'une précipitation du sel, de la séparation de phase induite par la température et une technique chromatographique impliquant une séparation en fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques (Polarité, affinité, charge ionique et poids moléculaire) est appliquée (Gong et *al.*, 2015). Tandis que, des méthodes récentes telles que la séparation en trois phases, l'extraction en deux phases aqueuses ont été aussi rapportées (Niphadkar et *al.*, 2015).

Les méthodes de base telles que les précipitations par le solvant (Guray et Sanli., 2013) et les précipitations en fonction de point isoélectrique (PI) (Cheng et *al.*, 2014) et aussi des méthodes comme l'électrophorèse de disque (Tsivinska et *al.*, 2015) qui peuvent déterminer les isoformes de l'enzyme ont été bien étudiées.

Dans la plupart des méthodes d'extraction des PPOs, la fraîcheur de la source est recommandée et le broyage se fait généralement avec des tampons tels que phosphate et acétate au gamme de pH de 5 à 7. Cet extrait fera par la suite l'objet de plusieurs expériences successives et complémentaires. Comme la présence de phénols entrave l'activité et le processus de purification de la PPO par la mise en place des liaisons irréversibles, l'addition de piègeurs de phénol tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP) ou l'acide ascorbique est souvent effectué (Sojo et *al.*, 1998 ; Batista et *al.*, 2014). De même, la solubilité des enzymes, en particulier, les enzymes liées aux membranes est assurée par l'addition d'agents tensioactifs tels que le SDS à très faible concentration. L'utilisation du SDS s'est également révélé être un bon activateur de la forme latente de PPO (Cheema et Sommerhalter., 2015).

Dans certains cas, l'addition d'inhibiteurs de sérine protéase, un agent chélateur comme l'EDTA, a été appliqué pour empêcher la dégradation de l'enzyme (Chazarra et *al.*, 1996).

### a) Précipitation par les solvants

Les solvants organiques tels que l'acétone et l'éthanol sont le plus souvent utilisés pour précipiter les protéines (Cheng et *al.*, 2014). Bien que l'addition de solvant organique dissout les enzymes liées aux membranes, elles ont tendance à provoquer des changements

conformationnels dans la structure protéique. Ces précipitations sont généralement effectuées à très basse température à environ  $-20^{\circ}\text{C}$  (Bravo et Osorio., 2016).

Le changement de pourcentage de solvant peut également être utilisé pour la séparation de différents types de protéines. Cheng et *al.*(2014) ont trouvé que l'ajout de 50% d'acétone ou de 60% d'éthanol sépare les sporamines de la PPO et amylase. Le précipité obtenu par l'acétone réfrigérée est généralement appelé la poudre d'acétone permettant sa conservation pendant une longue durée (Sknchez-ferrer et *al.*, 1990).

#### **b)Précipitation au sulfate d'ammonium:**

Toutes les protéines ont les deux surfaces hydrophile et hydrophobe. Dans une solution d'extrait aqueux, l'ajout de sel en excès augmente la tension superficielle qui améliore éventuellement l'interaction hydrophobe des protéines et les précipité. Ce phénomène est appelé effet de « Salting out ».Le sulfate d'ammonium est le sel le plus couramment utilisé pour la précipitation des protéines (Nadar et *al.*, 2017).

La quantité de sel nécessaire à la précipitation de protéines spécifiques dépend directement du poids moléculaire de la protéine. La plupart des chercheurs ont essayé de l'ammonium à 30-85% (p/v) comme une concentration convenable pour faire extraire ces enzymes (Tableau 5). Certaines chercheurs ont également utilisé le Triton-X100 ou l'extraction à base de Triton X-114 avant l'application d'une précipitation de sel afin d'une part d'éliminer les phénols de la source et d'autre part pour améliorer la durée de vie de l'enzyme. (Derardja et *al.*, 2017)

Bien que le processus de précipitation entraîne aussi des changements conformationnels dans les protéine, il ne les dénaturent pas . Par conséquent, il est généralement effectué à des températures inférieures à  $4^{\circ}\text{C}$  (Orenes-Pinero et *al.*, 2006), et l'activité d'une enzyme est d'autant meilleure en ajoutant de SDS aux protéines extraites après sa récupération par dialyse (Orenes-Pinero et *al.*, 2006).

**Tableau 5 :** Effet du pourcentage de sulfate d'ammonium sur l'extraction de PPO de différentes sources

Source	Sulfate d'Ammonium (%)	Taux de purification	Rendement d'activité (%)	Référence
Cognassier	30 – 75	16	47	Orenes- Pinero et <i>al.</i> ,2006
Salak	40-80	3.3	31.33	Zaini et <i>al.</i> , 2013
Fuji (pomme)	60-80	5.28	16.48	Liu et <i>al.</i> , 2015(a)
Pêche	40-80	2.16	61	Liu et <i>al.</i> , 2015(b)
Lactaire	30-85	5.56	31.3	Tsivinska et <i>al.</i> ,2015
Abricot	85	1	100	Derardja et <i>al.</i> ,2017
Prune	30-90	3.1	28.48	Gurgu et <i>al.</i> , 2017

### c) Séparation de phase induite par la température (TIPS)

L'ajout de tensioactifs ioniques ou non ioniques à la phase aqueuse au-delà d'une concentration critique décrit la tendance de la formation des micelles. Ces micelles ont un noyau hydrophobe qui extrait la plupart des phénols, des tanins, des lipides et des protéines non polaires (Liu et al., 2015a).

À des températures inférieures à 4°C, les tensioactifs à leur concentration micellaire critique (CMC) sont solubilisés complètement dans une solution aqueuse alors que la formation de micelles est induite avec l'augmentation de la température jusqu'à 37 ° C (Zaini et al., 2013).

Le Triton X-114 est le surfactant non ionique le plus courant utilisé par les chercheurs pour la TIPS des PPOs provenant de diverses sources. (Tableau 6)

La phase détergente (micellaire) peut être facilement séparée par centrifugation où une couche claire de surnageant avec des protéines hydrophiles peut également être séparé (Sanchez-Ferrer et al., 1993).

Onsa et al. (2000) ont utilisé des agents de surface ioniques tels que le SDS et le désoxycholate de sodium, ainsi que des agents non ioniques.

**Tableau 6 :** Effet de la séparation de phase induite par la température (TIPS) sur l'extraction de PPO de différentes sources

Source	Tensioactif Utilisé	Ordre d'étape	Taux de purification (%)	Rendement d'activité (%)	Référence
Banane	TX-114, 6%	2	1.6	93	Sojo et al., 1998
Kaki	TX-114, 4 et 6 %	2	2	95	Nunez-Delicado et al., 2003
Cognassier	TX-114, 4 et 6 %	2	3.7	72.26	Orenes-Pinero et al., 2006
Salak	TX-114, 1.5-8%	1	1.2	76.79	Zaini et al., 2013
Fuji (pomme)	TX-100, 1.5 %	1	1.33	46.98	Liu et al., 2015a

### D) Partitionnement triphasé (TPP)

Le partitionnement triphasé est une méthode bien connue, facile, économique et évolutive qui peut être appliquée simultanément aussi bien pour l'extraction que la purification de nombreuses biomolécules, y compris des protéines, des huiles, des pigments et des inhibiteurs (Panadare et Rathod., 2017).

La principe repose sur la formation de trois phases lors de l'addition de sel comme le sulfate d'ammonium et l'alcool hydrosoluble tel que le t-butanol à l'extrait aqueux. Bien que le TPP est préféré par de nombreux chercheurs pour la purification de nombreuses enzymes d'intérêt (Nadar et *al.*,2017), la fréquence de leur utilisation reste modeste (Tableau 7).

Niphadkar et *al.*(2015) ont rapporté l'extraction de PPO à partir de pelures de pommes de terre perdues par le TPP. Les auteurs ont mentionné que l'application de l'ultrason aide à augmenter la pureté et la récupération ,de même, à réduire le temps du processus de 40 min à 5 min .

La PPO de Bourrache a été extraite en utilisant le TPP en deux rotations pour améliorer l'efficacité (Alici et Arabaci, 2016). Dans les deux expériences, une accumulation de la PPO dans la phase précipitée a été observée.

Compte tenu de l'étude détaillée effectuée par ces chercheurs sur l'usage de TPP pour l'extraction de différents composés,un large champ de recherche est ouvert où plusieurs sels et solvants peuvent être explorés pour une extraction maximale de la PPO. (Panadare et Rathod, 2017).

**Tableau 7** : Effet du partitionnement triphasé (TPP) sur l'extraction de PPO de différents sources.

Source	Ratio de solvant à phase aqueuse	Concentration de sel	pH	Taux de purification	Rendement (%)	Référence
Pomme de Terre	1:1	40%	7	6.3	70%	Niphadkar et Rathod., 2015
Pomme de Terre*	1:1	40%	7	19.7	98.30%	
Borrache	1:1	15%	6.5	3.59	68.75%	Alici et Arabaci., 2016

\* La source représente l'application des ultrasons avec de cycle 40%, fréquence 25 kHz et puissance de 150 W.

### **E)Extraction à deux phases aqueuses (ATPS)**

Le processus de l'ATPS comprend une combinaison d'eau ,des polymères solubles, des sels-polymères et/ou des sels-alcools formant deux phases différentes (Vaidya et *al.*,2006).

Pareillement à la méthode de TPP, l'extraction à deux phases aqueuses est également une méthode évolutive, facile à utiliser permettant d'effectuer simultanément une extraction et de purification (Nadar et *al.*,2017).

Plusieurs articles ont rapporté une combinaison de polyéthylène glycol (PEG) ayant un poids moléculaire de 8000 ou 15000 Da et du sels phosphate comme méthode d'extraction et purification des PPO de différentes sources (Tableau 8).

Le PEG offre autant d'avantages par rapport aux acides organiques en tenant en compte l'inflammabilité, la volatilité, la toxicité et le coût (Niphadkar et al., 2015).

En fonction des propriétés physico-chimiques différentielles des biomolécules, le pourcentage de polymère et de sel, poids moléculaire du polymère, pH et prétraitement, les biomolécules migrent différemment dans ces phases formées simultanément (Nadar et al., 2017).

L'extraction maximale de PPO a été observée en appliquant du PEG et de sel de phosphate avec des concentrations de 5 à 18% et de 14 à 28,5%, respectivement (Bravo et Osorio, 2016).

L'extraction de PPO était optimale à pH neutre, à l'exception de la PPO de baie d'or dont l'optimum était à pH 5,5 (Oxidasa et al., 2011).

Niphadkar et al. (2015) ont purifié le PPO de pommes de terre par filtration sur gel de chromatographie utilisant Sephadex G-100 après extraction à deux phases aqueuses et ont observé une augmentation de taux pureté de 4,5 % à 12,4% .

**Tableau 8** : Effet du système à deux phases aqueuses (ATPS) sur l'extraction de PPO de différentes sources.

Source	Polymère	Sel	pH	Taux de purification (%)	Rendement (%)	Référence
Tubercule de Pomme de terre	5% PEG 8000	28.5% Phosphate	7	15.7	97	Vaidya et al., 2006
Ananas	18% PEG 1500	14% phosphate	7	2.7	90	Babu et al., 2008
Coqueret du Pérou	5% PEG 8000	14% phosphate	5.5	4.65	74.29	Oxidasa et al., 2011
Pomme de terre	17.62% PEG 1500	15.11% Phosphate	7	4.5	77.89	Niphadkar et al., 2015
Groseillier à maquereau	5% PEG 8000	14% phosphate	6	169.4	13.9	Bravo et Osorio., 2016

## F) Techniques chromatographiques

Les méthodes chromatographiques assurent un haut degré de purification mais sont généralement très coûteuses et compliquées. La sélection de la méthode appropriée parmi la variété des méthodes chromatographiques dépend de type d'enzyme, la nature des impuretés, la charge, la taille de la molécule et pureté de l'extrait. Plusieurs techniques ont été rapporté lors de la purification de la PPO dont nous citons la chromatographie à interactions hydrophobes (CIH), chromatographie par échange d'ions (CEI), chromatographie d'exclusion moléculaire (CEM) et la chromatographie par filtration sur gel (CFG) (Tableau 9).

Pour améliorer le taux de purification, nous faisons d'habitude un recours à plus d'une méthode de chromatographie (Guray et Sanlı-Mohamed.,2013 ;Liu et *al.*,2015,b;Derardja et *al.*,2017).

Selon les travaux de Liu et *al.*(2015,b),l'utilisation d'une combinaison de méthodes « CIH, CEM ainsi que CFG » pour la purification de la PPO de pêche augmente le taux de purification de 1,42 à 12,4.Alors que la PPO de *Lonicera japonica a* été purifiée jusqu'à 30,7 fois en utilisant une seule méthode « par chromatographie échangeuse d'ions ».

L'efficacité d'usage de cette méthode a été obtenue en n'utilisant pas directement d'extrait brut. De même, les chercheurs recommandent généralement l'utilisation des méthodes d'extraction telles que la précipitation au sulfate d'ammonium, l'ATPS ou TIPS avant d'appliquer la chromatographie (Lin et *al.*,2016).En outre,certains chercheurs ont procédé à des opérations unitaires telles que l'ultrafiltration pour minimiser le volume de chargement (Derardja et *al.*, 2017).

L'application de la chromatographie est observée être très efficace pour obtenir une haute pureté d'une enzyme. Les chercheurs ont également employé de la chromatographie liquide de protéine rapide (FPLC).Cette dernière offre plus d'efficacité de séparation et un taux de purification appréciable mais elle a finalement ajouté au coût de l'enzyme (Zaini et *al.*, 2013 ;Derardja et *al.*,2017)

Enfin, des modèles mathématiques sont souvent impliqués en association avec les techniques chromatographiques afin d'améliorer de plus en plus l'opération de purification de PPO. (Panadare et Rathod.,2017).

**Tableau 9** : Un aperçu sur les différentes méthodes chromatographiques appliquées à la purification de la PPO

Source	Résine	Type de chromatographie	Mélange d'éluion	Taux de purification (%)	Référence
Chèvrefeuille du Japon	DEAE Cellulose	Echangeuse d'ion	Gradient Tris-HCl (pH 7,5)	30.76	Liu et al., 2013
Salake	HiTrap Phenyl Sepharose	FPLC	Tampon phosphate potassium (pH 6.8)	10.5	Zaini et al., 2013
	Superdex 200 HR 10/30			14.1	
	Phenyl-Sepharose CL-4B			2.83	
Pêche	DEAE Sepharose débit rapide	Echangeuse d'ion	Tampon Tris-HCl (pH 7,5)	6.58	Liu et al., 2015(b)
	Sephaoryl HR S-200			12.4	
	Sephadex G 100			12.4	
Pomme de terre	Sephadex G 100	Gel filtration	Tampon phosphate potassium (pH 6.8)	12.4	Niphadkar et al., 2015)
Lactaire	DEAE- toyo-pearl	Echangeuse d'ion	Tampon carbonate (2mM)( pH 8.4)	7.24	Tsivinska et al., 2015
Châtaigne	DEAE-52	Echangeuse d'anion	Tampon phosphate sodium (pH 7)	4.6	Gong et al., 2015
Persil	Sephadex G 100	Gel filtration	Tampon phosphate potassium (pH 6.8)	6.5	Lin et al., 2016
Abricot	QSepharose FF	Echangeuse d'anion	Gradient linière de sodium chloride	6.3	Derardja et al., 2017
Poire	DEAE-FF	Echangeuse d'ion	Gradient linière de sodium chloride	17.07	Zhou et al., 2018
	Sephadex G-75	Gel filtration		32.93	

## 2.7. Caractéristiques de la polyphénol oxydase

Les études expérimentales d'extraction de la PPO restent incomplètes sans la mise en place d'une caractérisation proprement dite en terme de poids moléculaire, Optimum pH, et température, spécificité du substrat et/ou paramètres cinétiques et affinité.

Les conditions optimales de mesures doivent être bien définies lors de la caractérisation de l'enzyme. Une comparaison en termes d'origine et propriétés cinétiques et catalytique est souvent souhaitable pour pouvoir prédire les facteurs influençant la variabilité de l'activité enzymatique.

### 2.7.1. Poids moléculaire

Le poids moléculaire est généralement déterminé par électrophorèse SDS-PAGE en utilisant un marqueur de taille.

Contrairement à la plupart des enzymes, l'activité de la PPO n'est pas entravé par le SDS. Par conséquent, le dosage bio-autographique ou la coloration de l'activité du PPO peuvent être réalisés via une SDS-PAGE en utilisant des substrats tels que le catéchol ou la L-Dopa et permettent par la suite en cas de pureté parfaite, l'obtention d'une seule bande de couleur distincte sur le gel (Guray et Sanli-Mohamed., 2013).

En général, le poids moléculaire des PPO des différentes sources variait de 27 kDa à 144 kDa selon sa source, la méthode d'extraction ainsi que la procédure de purification (Tableau 10)

Dans certaines cas, la visualisation de plusieurs bandes indique la présence de différentes isoformes de la PPO dans la même source (Batista et *al.*, 2014).

Une exception a été observée dans le cas de PPO de Lactaire où son isoforme présentant une mobilité différente en milieu alcalin étant donné qu'elle possède le même poids moléculaire avec son homologue (Tzivinska et *al.*, 2015)

### 2.7.2. pH Optimum et stabilité

Les valeurs expérimentales de pH est un facteur important et clé pour la bonne maîtrise de la mesure d'activité enzymatique. Un changement quelconque se traduit par une perturbation voire une diminution de l'efficacité catalytique de l'enzyme.

Le changement du pH a tendance de modifier la charge de l'enzyme, plus précisément l'état d'ionisation des acides aminés au niveau de site actif impliquant à la fois le site de fixation de substrat et le site catalytique. Ça affecte aussi la solubilité, la force de liaison et/ou l'affinité ainsi que sa conformation (Ionita et *al.*, 2017).



Généralement, les valeurs de pH des PPOs d'origines végétales varient entre 4 et 7 (Tableau 10). Nous soulignons que la valeur de pH optimum dépend de type de substrat utilisé, de méthode d'extraction et purification adoptés, et de source d'enzyme.

Pour une même source de PPO, les valeurs de pH optimum diffèrent en fonction de type de substrat utilisé (monophénol, o-diphénol ou triphénol). Prenant l'exemple de la PPO de Bouracche, les valeurs de pH optimum sont pH 7,5, pH 7,5, pH 5,5 et pH 5 en utilisant le catéchol, pyrogallol, acide cafféique et le 4-méthylcatéchol, respectivement. (Alici et Arabaci., 2016)

De même, les valeurs de pH optimum diffèrent en fonction de source d'enzyme pour le même substrat dont en utilisant par exemple le catéchol comme substrat, des valeurs de pH optimum équivalent à 4,5, 5,5 et 7 ont été obtenus pour la PPO d'Abricot (Derardja et al., 2017), la PPO de poire (Zhou et al., 2018) et la PPO de Buriti (Carvalho et Orlanda, 2017), respectivement (Tableau 10).

La présence des isoformes implique la présence de plusieurs enzymes présentant une certaine homologie structurale dans une seule source qui oxydent diversement un substrat similaire. Gouzi et al. (2013) et Cheema et Sommerhalter (2015) ont signalé cette observation pour la PPO de truffe du désert et mangue, respectivement dont ils ont rapporté que la présence de plusieurs isoformes se traduit par des valeurs de pH optimum différentes pour la même source d'enzyme vis-à-vis de même substrat. (Tableau 10)

Zhou et al. (2018) ont rapporté que l'activité de la PPO augmentait progressivement de pH 3,0 à 5,5 et diminuait nettement au-dessus pH 6,0, dont 3% de son activité initiale est perdue à pH 8,0. La PPO de poire présentait une activité sur une gamme de pH étroite (5,5-6,0) avec une activité optimale observée à pH 5,5. Ces résultats sont similaires avec ceux décrivant qu'environ 3% de l'activité maximale de la PPO était détectée à un pH de 8,0 (Teng et al., 2017).

La stabilité du pH de la PPO extraite des prunes a été évaluée pendant 3 jours en incubant l'enzyme à des valeurs de pH allant de 4,0 à 8,0. La valeur d'activité enzymatique relative la plus élevée a été obtenue à pH 6,0. À des valeurs de pH de 4,0, 4,5 et 5,0, la PPO a maintenu, respectivement 70 %, 68 % et 62 % de son activité initiale après 48 h. À pH 5,5, 6,0 et 6,5, la PPO a conservé 66 %, 72 % et 58 % de son activité initiale, respectivement, après 48 h. Dans l'intervalle de pH alcalin (7,0, 7,5 et 8,0), la PPO a maintenu 51 %, 39% et 37% de son activité enzymatique initiale, respectivement pendant deux jours (Ionita et al., 2017).

Des résultats pareils ont été aussi obtenus pour la PPO de Salak (Zaini et *al.*,2013) dont ils ont incubé l'enzyme à différentes conditions de pH à 4 ° C pendant 24 h. La PPO fruit du serpent (Salak) a conservé plus de 80% de son activité initiale à pH 6,0 et 6,5, alors qu'à des valeurs de pH inférieures à 5,0 ou supérieures à 7,5 l'enzyme a perdu environ 50%.

La stabilité de la PPO extraite du persil a été aussi étudiée entre pH 4,0 et 7,5 pour une période de 4 jours. Il a été observé que l'activité de la PPO présentait la valeur la plus élevée à pH 6,5 et diminuait considérablement à d'autres valeurs de pH.( Doğru et Erat.,2012).

Cheng et *al.*(2014) ont étudié la stabilité du pH de la PPO extraite de la mandarine à pH 6,0 et 6,5 et ont constaté que la PPO retient 80% de l'activité enzymatique initiale sous ces conditions. En maintenant l'enzyme à des valeurs de pH inférieures à 5,0 ou supérieur à 7,5, l'activité enzymatique relative a été réduite également de plus de 50%.

### **2.7.3.Temperature optimale et stabilité**

L'influence de la température et la stabilité d'enzyme à une température précise durant une période bien déterminée a fait l'objet de plusieurs recherches dans le but de proposer des méthodes de blanchiments à haute température ou de stockage à basse température.

D'après la littérature,la PPO est une enzyme thermostable dont des protocoles d'inactivation thermique sont souvent réalisés dans des gammes de températures élevées (60°C-90°C) ,de même ,plusieurs rapports ont indiqué la présence d'une activité enzymatique minimale à 90°C pour certaines variétés .( Palma-Orozco et *al.*,2011 ;Carvalho et Orlanda.,2017 ;Ionita et *al.*,2017,Tao et *al.*,2018).

L'étude de stabilité thermique fournit des informations complémentaires permettant de comprendre la cinétique enzymatique avec l'augmentation de la température .Les valeurs de températures optimales de PPO d'origines végétales varient entre 10 et 60°C.(Tableau 10).

Le traitement thermique entraîne généralement une augmentation de l'activité de PPO, suivie d'une diminution. Zhou et *al.* (2018) ont remarqué que l'activité de la PPO de poire a été fortement augmentée dans l'intervalle de températures compris entre 20 à 35 °C, tandis qu'à 35-85°C, l'activité est diminuée. Ces résultats concordent aussi avec ceux de Siddiq et *al.* (2017), qui ont signalé que l'augmentation de la température a réduit l'indice de brunissement de la myrtille dont a 65°C, l'activité du PPO en utilisant le catéchol comme substrat a perdu 57,33% de son activité initiale alors que l'enzyme retient seulement 20% de son activité à 85 ° C.

Carvalho et Orlanda.(2017) ont rapporté que la PPO du Buriti avait une température optimale à 35 ° C et était relativement stable à 77 ° C avec une perte d'activité équivalente à 59,93%.

De même, Ionita et *al.* (2017) ont constaté que la PPO de prunes présentait une stabilité plus élevée dans la gamme de température comprise entre 25 et 65 ° C et que plus de 50% de la stabilité était perdue à 70 ° C après une durée de chauffage de 10 minutes jusqu'à une perte de 100% de l'activité au-delà de la valeur 85°C.

Gao et *al.* (2011) ont étudié la stabilité thermique de PPO à partir de *Cleome gynandrain* dans l'intervalle de température de 10-85°C. L'activité enzymatique augmente progressivement avec la température de 10°C à 45°C, suivie d'une diminution rapide à 60°C. Au-dessus de cette valeur, l'activité enzymatique diminue progressivement. Par conséquent, la température optimale pour cette enzyme était de 60°C, bien que l'enzyme ait montré une activité considérable dans la gamme de 55 à 75°C.

Palma-Orozco et *al.* (2011) ont étudié la stabilité thermique de la PPO extraite du fruit des sapote (*Pouteria sapota*) dans la gamme de température de 20 à 80°C. Entre 35 et 45°C, l'activité résiduelle présentait des valeurs similaires. A des températures plus élevées (50-60°C), une diminution a été rapportée jusqu'à ce que l'enzyme soit complètement inactivée dans l'intervalle de température de 65 à 70 °C.

Kumar et *al.*(2008) ont indiqué que le PPO de cerises était stable à 45°C, mais elle est devenue instable à des températures supérieures à 75°C.

D'autres rapports ont décrits que la température optimale de PPO varie en fonction de substrat utilisé dont les valeurs de températures optimales de mûrier pour le catéchol, le 4-méthylcatéchol et le pyrogallol étaient comprises entre 20 et 45 ° C (Arslan et *al.*, 2004).

Nous concluons que ces deux paramètres ont une influence flagrante sur l'activité enzymatique de PPO et la perte d'activité est d'autant élevée que les conditions de mesure sont extrêmes. Plusieurs facteurs exercent une influence directe ou indirecte sur conditions optimales y compris le substrat utilisé, la méthode d'extraction et purification suivies, la source d'enzyme et la présence ou non d'iso-formes.

**Tableau 10 :** Caractéristiques des PPOs d'origine végétale en terme de poids moléculaire, pH et de température pour différents substrats.

Source	Poids moléculaire kDa	Substrat	pH	Temp (°C)	Référence
Salake	38	Catéchol	6.5	30	Zaini et al., 2013
Truffes noires	-	Catéchol	3,6-7	30	Gouzi et al., 2013
		Tyrosine	5-6	30	
Lobéira	47	Catéchol	6	28	Batista et al., 2014
	68		6.5	30	
Châtaigne	32.5	Catéchol	7	40	Gong et al., 2015
Pêche	81	Catéchol	6.5-7	40	Liu et al., 2015(b)
Alphanso	53, 112, 144	Catéchol	5.4		Cheema et Sommerhalter., 2015
			6.4		
Lactaire	64	Catéchol	6	10	Tsivinska et al., 2015
Pomme (Fuji)	67.3	Catéchol	6.8	35	Liu et al., 201a)
Groseillier à maquereau	31	Catéchol	5.5	40	Bravo et Osorio., 2016
		4-methycatéchol	4	25	
		Acide Chlorogénique	5	20	
Bourache	80.6	Catéchol	7.5	10	Alici and Arabaci, 2016
		Pyrogallol	7.5	30	
		Acide caféique	5.5	20	
		4-methycatéchol	5	5	
Prune	65	Catéchol	6	25	Ionita et al., 2017
Abricot	63	Catéchol	4.5	45	Derrarja et al., 2017
Feuilles de thé	42	Catéchol	6	38	Teng et al., 2017
	85		5.5	33	
Prune	65	Catéchol	5-7	25-65	Carvalho et Orlanda., 2017
Myrtille		Catéchol	6.1 - 6.3	35	Siddiq and Dolan, 2017
Poire	44	Catéchol	5.5	35	Zhou et al., 2018

#### 2.7.4. Spécificité de substrat

L'étude de la spécificité du substrat est une étape cruciale lors de caractérisation des propriétés cinétiques de l'enzyme. Le résultat d'une telle expérience offre des informations solides sur le pouvoir catalytique de PPO. Ça permet d'une part une orientation et un choix adéquat de substrat susceptible d'être oxydé avec une grande affinité et efficacité et d'autre part de comprendre le comportement cinétique de la PPO et ses préférences vis-à-vis d'une grande liste des composés phénoliques.

Différents types de substrats phénoliques sont utilisés pour une telle finalité (Figure 8). Nous distinguons des substrats dits monophénols dont les plus utilisés (L-tyrosine, phénol, Tyamine, p-Crésol ..etc), des substrats o-diphénols (Catéchol, 4-méthylcatéchol, acide caféique, L-dopamine, catéchine, épicatechine, acide ferrulique ...etc), des substrats triphénoliques (Pyrogallol, acide gallique, acide chlorogénique ....etc). (Mesquita et Quiroz, 2012).

Généralement, la polyphénol oxydase est capable d'oxyder cette liste mais avec des affinités et efficacités différentes. Batista et al. (2014) ont rapporté que la PPO de Lobéira oxyde mieux le 4-méthylcatéchol par rapport au catéchol alors qu'une faible oxydation du pyrogallol a été observée avec de même absence d'activité monophénolase. Ils ont expliqué cette différence par rapport à la conformation tridimensionnelle des sites catalytiques enzymatiques. Les structures chimiques du catéchol et du 4-méthylcatéchol sont similaires, composées de benzène substitué aux positions Ortho et Méta. Cependant, la présence d'un groupe méthyle dans la structure 4-méthylcatéchol remplaçant l'hydroxyle présenté en catéchol, peut être un facteur perturbant. En ce qui concerne le phénol, l'absence de l'activité crésolase empêche la poursuite de l'oxydation de ce composé. Sinon, la présence d'un groupe hydroxyle supplémentaire dans la structure de pyrogallol interfère probablement dans l'interaction entre enzyme-substrat. (Alici et Abbasci, 2016).

Goynech et al. (2013) ont étudié aussi la spécificité de substrat de la PPO de radis vis-à-vis de plusieurs substrats. La PPO de radis a montré une activité monophénolique avec L-tyrosine, o-diphénolique (acide caféique, pyrocatechol) et triphénolique (acide chlorogénique, acide gallique, Pyrogallol) tandis qu'aucune oxydation n'a eu lieu en présence de l'acide p-cumarique (monophénol), acide 3,4-dihydroxybenzoïque (diphénol) et phloroglucinol (triphénol). Ils ont signalé que probablement avec ces derniers substrats l'orientation spatiale des groupes hydroxyles empêche l'approximation de l'enzyme de son substrat.

De plus, Liu et al. (2015, b) rapporté que la PPO de pêche oxyde mieux la catéchine et l'épicatéchine que le catéchol.

Une telle différence d'oxydation est lié le plus souvent à plusieurs facteurs y compris la source de l'enzyme, le type de substrat utilisé, le protocole d'extraction appliqué, le degré de purification et bien évidemment le type de substrat utilisé. (Jiang et al., 2016).

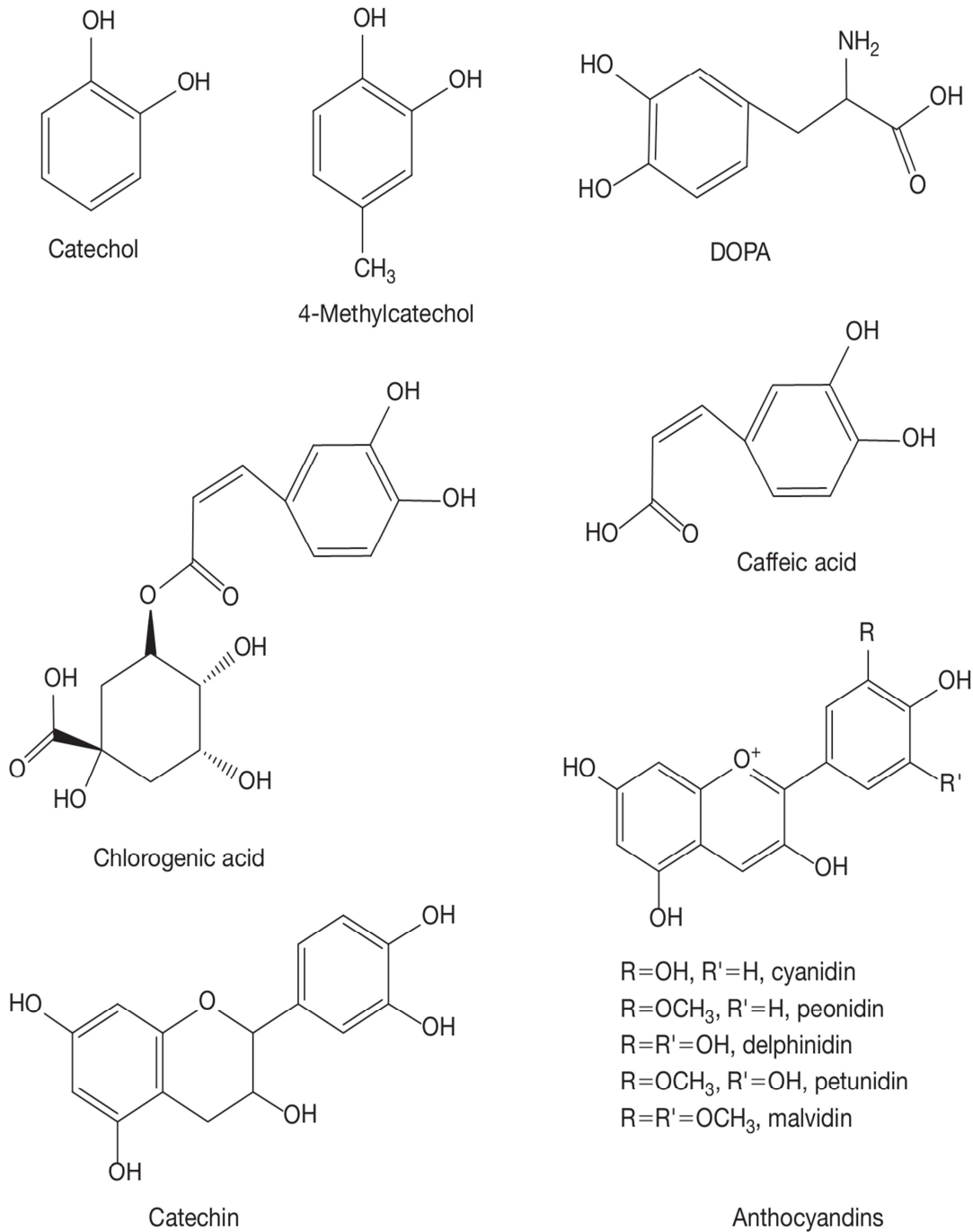


Fig 8 : Structure de certains substrats phénoliques (Jiang et al., 2016)

### 2.7.5. Paramètres cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ )

L'affinité de l'enzyme ( $K_m$ ) est estimée par la constante de Michaelis–Menten. Elle définit la force de liaison et la stabilité du complexe enzyme-substrat. Une proportionnalité inverse relie la valeur de  $K_m$  et l'affinité dont l'affinité est d'autant plus élevée que la valeur de  $K_m$  est petite et vice versa.

La vitesse de l'activité enzymatique est calculée de la pente de la courbe absorbance en fonction du temps en seconde ou minute. Généralement, nous utilisons la représentation de Michaelis–Menten ou de préférence la représentation de double inverse de Lineweaver – Burk pour le calcul. La valeur de  $V_{max}$  correspond au point d'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées ( $1/V$ ) tandis que le point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses du côté gauche présente la valeur de  $(-1/K_m)$ .

Pour avoir une bonne idée sur l'efficacité catalytique de l'enzyme, il est recommandé de calculer le rapport  $V_{max}/K_m$ . Une valeur élevée de cet ration indique que l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat est très grande impliquant plus d'accélération lors de son oxydation. De plus, une corrélation positive existe entre l'affinité et spécificité dont l'activité enzymatique s'améliore généralement et se diffère d'un substrat à un autre.

Goyneche et *al* (2013) ont étudié les paramètres cinétiques de la PPO de radis en utilisant différents substrats. Ils ont indiqué une valeur de  $K_m$  6,3 mM en utilisant du pyrogallol, une valeur de 28,3 mM pour le pyrocatechol et une valeur de 77 mM pour l'acide caféique.

Alici et Abbasci (2016) ont rapporté la meilleure affinité pour la PPO de bourrache en utilisant l'acide caféique ( $K_m$  0,51 mM) comparé au pyrogallol ( $K_m$ : 2,36 mM) et 4-méthylcatéchol ( $K_m$  4,55 mM).

Mishra et *al.* (2012) à leur tour ont rapporté une affinité plus élevée pour les PPO d'aubergine en présence de 4- méthylcatéchol ( $K_m$ : 0,34 mM) comme substrat suivi par l'acide caféique (0,48 mM) et le pyrocatechol (0,54 mM). De même, les valeurs de ratio  $V_{max} / K_m$  étaient comme suit: 45153,61 (EU /mM.mL) pour le pyrocatechol, une valeur de 11801,82 et 15062,69 6 pour le 4-méthylcatéchol et l'acide caféique, respectivement , alors qu'une valeur de 8317,57 en présence de pyrogallol comme substrat a été obtenue.

D'après le tableau 11, nous remarquons que l'affinité change d'un substrat à l'autre pour la même enzyme et d'une source à l'autre pour le même substrat. Outre les effets de la source et le substrat, d'autres facteurs expérimentaux peuvent également affecter les valeurs des paramètres cinétiques.

Cheema et Sommerhalter.(2015) ont rapporté une proportionnalité inverse entre les valeurs des paramètres cinétiques et l'augmentation du pH du milieu pour la PPO de mangue d'Ataulfo.

**Tableau 11** :Paramètres cinétiques de différentes PPO

Source	Substrat	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (EU/mL)	$V_{max}/K_m$ (EU/mM.mL)	Refernces
Salake	Catechol	5.46	0.98	0.179	Zaini et al., 2013
Truffes de desert	Catéchol	0,14	50	357,143	Gouzi et al.,2013
	Tyrosine	2,5	87	34,800	
Lobéira	Catéchol	6.47	3.42	0,529	Batista et al.,2014
	4-Methylcatechol	0.15	3.01	20,067	
	Pyrogallol	20.11	3.90	0,194	
Radis	Catéchol	28,3	1587	56,078	Goynech et al.,2013
	Pyrogallol	6,3	4328	686,984	
	Chlorogéni acid	7,2	302	41,944	
	Gallic cid	4,2	233	55,476	
	L-tyrosine	9,3	495	53,226	
Châtaigne	Catéchol	92	1,5	0,016	Gong et al., 2015
	4-Methylcatechol	94	1,3	0,014	
	Gallic Acid	100	99	0,990	
Pêche	Catéchol	3,68	94	25,54	Liu et al., 2015,b
	Epicatechin	0,12	347	2891,67	
	Catechin	0,14	219	1564,29	
Groseillier à maque- reau	Acide Chlorogénique	0.56	53.15	94.91	Bravo and Osorio,, 2016
Myrtille	Catéchol	15	2.57	0.171	Siddiq and Do- lan,2017

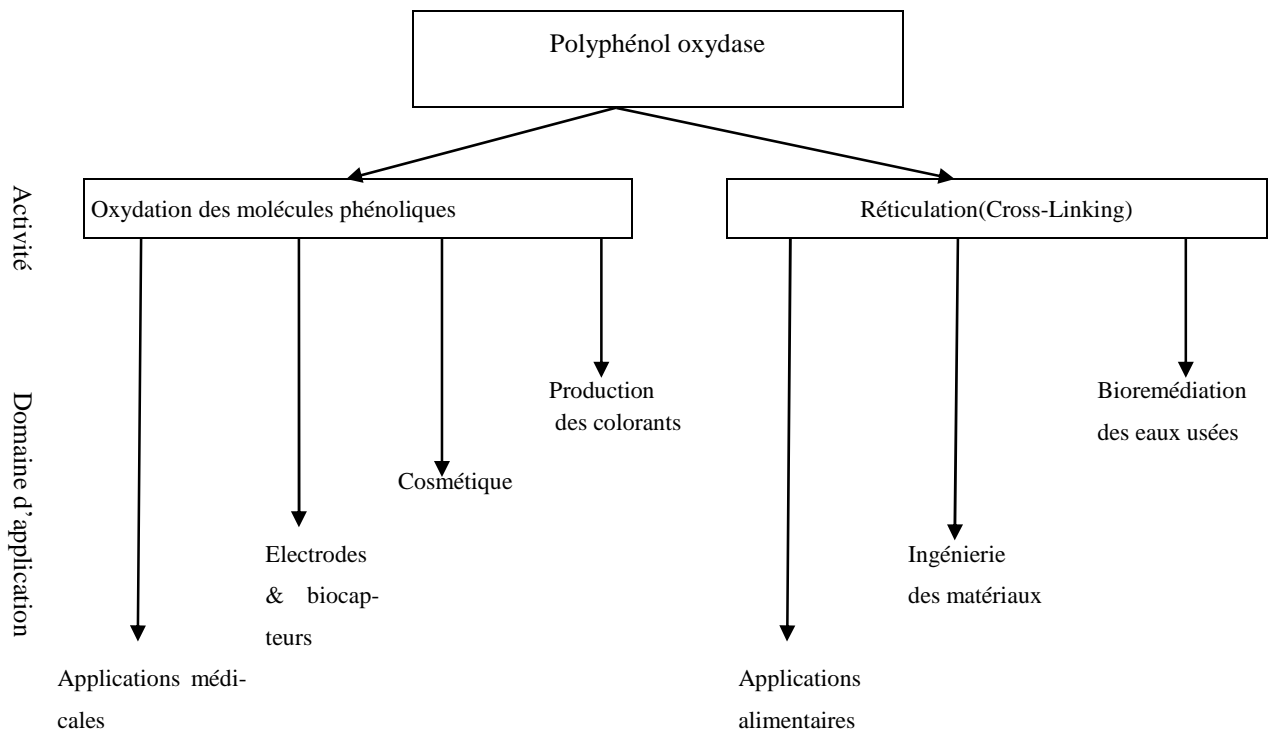
### 2.8.Applications potentielles des PPO

L'exploitation de l'activité enzymatique des polyphénols d'une part entant qu'oxydases de substrats phénoliques et d'autres part comme inducteur de phénomène de crossing-Linking et/ou réticulation a permet la mise en place de différentes applications intéressantes dans plusieurs secteurs. L'utilisation de la PPO est plus avantageuse par rapport aux autres systèmes enzymatiques ,dont elle assure l'enlèvement de l'oxygène moléculaire au



lieu de peroxyde de l'hydrogène qui est l'oxydant, réduisant ainsi théoriquement le coût potentiel de l'application de la technologie (Mukherjee et al.,2013).

Un aperçu récapitulatif sur les applications potentielles de la PPO est donné dans la figure ci-dessous.



**Figure 9:** Domaines d'application potentielle de la Polyphénol oxydase.( Zaidi et al.,2014)

Compte tenu du rôle physiologique de la PPO dans la synthèse de la mélanine à partir de la tyrosine, l'enzyme a été également utilisée pour la synthèse de solutions de teinture et de coloration. (Jadhav et al.,2010)

De même ,la production de L-DOPA par la PPO en utilisant comme substrat de la L-tyrosine et le L-ascorbate comme agent réducteur a été également rapportée (Sanz et al., 2005). Au cours des dernières décennies, la production enzymatique de L-DOPA utilisant *Erwinia herbicola* a été mise en place à l'échelle industrielle (Koyanagi et al., 2005).

De plus, différents biocapteurs ont été développés en utilisant les enzymes aussi bien fongiques que bactériennes pour détecter même des faibles quantités de l'ordre de pictogramme des composés phénoliques dans un échantillon (Marino et al., 2011).

La réaction de bêta-galactosidase couplée à la PPO a été exploitée pour développer un biocapteur visant à quantifier la quantité de glycosides cyanogènes et toxiques dans les aliments tels que les noyaux d'abricot, de pêche et de cerise (Jadhav et al., 2010).

La PPO de champignon a été également utilisée pour la quantification des phénols dans le jus de fruits, thé, et confitures (Saratale et al., 2011). Seule ou parfois associée à d'autres enzymes telle que la laccase (Montereali et al., 2010), elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques (Garcia et al., 2016).

Les polyphénol oxydase ont été exploitées dans la bioremédiation des eaux usées via l'élimination des composés phénoliques et décoloration. La PPO de *Streptomyces antibioticus*, par exemple, avait une activité sur les polluants industriels tels que les 3- et 4-chlorophénol (Liu et al., 2000) et 3- et 4-fluorophénols (Li et al., 2006)

La PPO fongique a été également utilisée pour l'oxydation des composés phénoliques des eaux usées, tels que le catéchol, le p-crésol, le p-chlorophénol, le phénol et le p-méthoxyphénol (Busch et al., 2006).

Des effets similaires ont été observés après l'immobilisation de la PPO des champignons sur des billes de chitosane, permettant ainsi l'élimination des chlorophénols et certains substitués des phénols (Streffer et al., 2001).

Compte tenu la toxicité des composés phénoliques, une attention considérable a été accordée à leur quantification fiable dans les matrices environnementales complexes. Les composés phénoliques sont présents dans les eaux usées et en industrie de charbon, résine et plastiques, les raffineries de pétrole, les textiles, les teintures, le fer et l'acier, de la pâte et du papier (Brasquet et al., 1999).

Les phénols sont des polluants toxiques dans les déchets industriels imposant plusieurs risques sur la santé humaine et certains sont soupçonnés d'être cancérogènes. En outre, le phénol provoque une coloration des eaux réceptrices. Plusieurs chercheurs ont étudiés l'utilisation de cette PPO dans le traitement des eaux usées. L'application d'une polyphénol oxydase, pour l'élimination du phénol et ses dérivés est devenue une méthode très importante et efficace (Garcia et al., 2016).

Un détail sur les applications potentielles et mode d'action des PPO dans les différents domaines est donné dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Applications potentielles et mode d'action de la PPO dans les différents domaines.

<b>Domaine</b>	<b>Mode d'action</b>	<b>Références</b>
Productions des colorants	-L'oxydation d'un composé phénolique aromatique par la tyrosinase et production de composés colorés	Warner et Stoler.,2011
Applications cosmétiques	-Agent autobronzant	Herlihy.,2002
Biocapteurs	-Sous forme isolée -Sous forme associée pour des fins analytiques, ex. Détection des hormones, salicylate.	Moon et Kim.,2009
Biosynthèse et applications médicales	-Production de L-DOPA -Production d'additive alimentaire -Production des composés oestrogéniques -Production de mélanine pour un usage thérapeutique	Xu et al.,2012 Espinet al.,2011 Schweitzer et al.,2010 Berliner et al.1997
Bioremédiation des eaux usées	-Elimination des contaminants phénoliques -Réduction de la Demande chimique en oxygène(DCO). -Décoloration(Dégradation des colorants)	Marino et al.,2011 Asai .,1995 Pajot et al.,2011
Matériaux	-Production des polymères phénoliques -Modification des matériaux -Production des adhésives - Production des films -Traitement des textiles	Della -Cioppa et al.,1996 Jus et al.,2009 Benedict et Piccino.,1987) Ellis et Cornell.,2003) Yamadaet al.,2008) ; Jus et al. ,2009
Applications alimentaires	-Production de thé -Production des produits laitiers Réticulation des protéines des viandes	Autio et al.,2007 Erali et al.,2010 Lantto et al.,2007
Autres	-En tant que indicateur pour le comptage des micro-organismes -Identification des bactéries produisant la L-tyrosine	Stephanopoulos et Santos.2011

A l'échelle industrielle, Chen et *al.*, 2002 ont rapporté une application de la polyphénol oxydase en la conjuguant *in vitro* avec la protéine de la gélatine au polysaccharide chitosane. L'hydroxytyrosol, un antioxydant puissant abondant dans les olives, a été également synthétisé avec la tyrosinase de tyrosol.

Anghileri et *al.* (2007) ont utilisé la PPO bactérienne pour produire des conjugués à partir de séricine, un peptide trouvé dans les eaux usées des industries de textiles de soie.

En outre, l'industrie alimentaire développe continuellement des nouveaux biopolymères avec des propriétés spéciales, non seulement pour leur utilisation comme agents émulsifiants et épaississants mais aussi pour la production des aliments à faible teneur en graisses et calories. Différentes enzymes sont utilisées pour hydrolyser les biopolymères alimentaires afin d'améliorer les caractéristiques de produit (Rastall, 2007).

Les biopolymères réticulés modifient les propriétés structurales de la matrice alimentaire (Ercili et *al.*, 2010). De même, la réticulation et le greffage des substances spécifiques peuvent être utilisés dans l'industrie de textile et pour la génération de nouveaux biomatériaux (Pajot et *al.*, 2011).

De plus, la PPO peut être utilisée pour réticuler les protéines de matrice alimentaire, elle peut être utilisée dans la production des produits laitiers et/ou de viande de faible teneur en calories et/ou à faible teneur en matière grasse. (Xu et *al.*, 2012)

Dans les produits laitiers, la réticulation peut être également exploitée pour la prévention de synérèse ou pour faire une douce ferme. La réticulation enzymatique joue ainsi un rôle essentiel dans l'adaptation des propriétés de gélification de viande, améliorant d'autant leur texture et leur couleur. (Liu et *al.*, 2018).

**Chapitre 3 :**  
**Le brunissement**  
**enzymatique et son contrôle**

### 3.Méthodes de contrôle de brunissement enzymatique

#### 3.1.Méthodes chimiques

Plusieurs mécanismes ou approches impliquant l'usage des inhibiteurs ont été développés pour contrôler le brunissement indésirable. Les inhibiteurs de l'activité de la PPO peuvent être classés selon leur mode d'action, par exemple, l'exclusion des réactifs tels que l'oxygène, dénaturation de la protéine enzymatique, interaction avec le groupe prosthétique du cuivre et interaction avec le substrat phénolique ou quinones.(Mesquita et Quiroz.,2013)

Ozoglu et Bayındırli .(2002) et McEvily et *al.* (1992) ont proposé une classification valable jusqu'à l'heure actuelle dont ils ont suggéré de diviser les types d'inhibiteurs en six classes :

1. Agents réducteurs (acide ascorbique et analogues, sulfites)
2. Agents chélatants (éthylènediaminetétra acétate, diéthylthiocarbamate de sodium,et l'azide de sodium ...etc).
3. Agent complexant ( cyclodextrines, chitosane).
4. Acidulants ( acide ascorbique, acide citrique, acide malique, acide phosphorique..etc).
- 5.Inhibiteurs d'enzyme – analogues de substrat, les halogénures.
- 6.Enzyme de traitements ( protéases, et o-methyltransferase).

Plusieurs composés possèdent des structures chimiques étroitement liées aux o-diphénols mais ne fonctionnent pas comme des substrats de PPO. Celles-ci comprennent des dérivés à substitution méthyle tels que le gaïacol et l'acide férulique (Nirmal et Benjakul.,2009), et les m-diphénols tels que le résorcinol et le phloroglucinol, qui se sont révélés un effet inhibiteur sur l'activité de la PPO, soit de manière compétitive avec un mécanisme d'inhibition à liaison lente en fonction du substrat (Montero et *al.*, 2001; Waliszewski et *al.*, 2009).

Comme la PPO est une métalloprotéine dans laquelle se trouve le cuivre est le groupe prosthétique, elle est inhibée par une variété d'agents chélateurs ,y compris le diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA), l'azide de sodium, l'éthylxanthate de potassium et l'éthylènediaminetétraacétate (EDTA). (Gawlik-Dziki et *al.*, 2007)

Bien que l'azide de sodium et l'EDTA inhibent la PPO, ils semblent être des chélateurs moins spécifiques que DIECA ou l'éthylxanthate de potassium (Pinto et *al.*, 2008; Gao et *al.*,2009).

Les agents chimiques anti-brunissement éliminent ou ciblent différents composants nécessaires à la réaction de PPO, comme les substrats phénoliques et les produits intermé-

diaires y compris les quinones, oxygène, enzyme ou atomes de cuivre (Mesquita et Queiroz.,2013).

Bien que les PPOs puissent avoir une réaction identique contre les inhibiteurs, l'efficacité des inhibiteurs contre ces différents PPOs peuvent varier considérablement, nécessitant un contrôle de mécanisme spécifique (Jukanti et al.,2017).

Les agents réducteurs tels que les sulfites et l'acide ascorbique sont les composés les plus couramment utilisés dans le contrôle du brunissement. Ils contrôlent le brunissement soit en empêchant l'accumulation d'o-quinones, soit en formant des produits incolores stables. Parmi les réducteurs, le dioxyde de soufre et les sulfites (sulfite de sodium, bisulfite de sodium, ou métabisulfite de sodium) sont les inhibiteurs les plus puissants de la réaction de brunissement (Liang et al.,2012 ;Holzwarth, et al.,2013 ;Ali et al.,2015 ; Zhan et al.,2017 ; Sikora et Świeca.,2018).

Les sulfites ont été utilisés dans les légumes et l'industrie fruitière en raison de leur efficacité et de leur faible prix. On suppose que les sulfites inhibent directement les PPO et interagissent avec les quinones les empêchant de polymérisation (Ashie et al.,1996 ;Ali et al.,2015). Mais en raison des effets nocifs des sulfites sur la santé, l'organisation mondiale de la santé a recommandé une utilisation limitée ou non des sulfites dans le traitement des fruits et légumes frais (Queiroz et al.,2008).

La cystéine est un autre composé efficace contenant du soufre, utilisé comme agent anti-brunissement. La cystéine réagit avec des o-quinones pour produire des composés stables et incolores (Ali et al.,2015).

Plusieurs rapports ont mentionné son efficacité sur la PPO d'avocat, de banane, de champignon, de l'artichaut, du jus de pomme, de la mangue, de purée, du raisin et de la laitue et poire (Iyidogan et Bayındırlı., 2004; Rapeanu et al., 2006; Altunkaya et Gokmen, 2009 ;Zhou et al.,2018).

Bien que la cystéine prévienne efficacement le brunissement à très basse température et à faible concentrations de 1 à 4 mM, son utilisation dans la transformation des aliments est limitée car elle produit des odeurs indésirables même à des niveaux bas (Saeidian.,2013;Zhou et al.,2018)

L'acide ascorbique (vitamine C) est la meilleure alternative disponible aux sulfites et souvent utilisé comme agent anti-brunissement dans les fruits tranchés, les fruits et légumes en conserve, les purées et jus de fruits (Yoruk et Marshall.,2003 ;Jukanti et al.,2017).

L'acide ascorbique réduit la quinone avant qu'elles subissent des réactions secondaires qui sont responsables du brunissement et aussi diminue le pH (Guerrero-Beltrán et al.,2005 ; Singh et Wadhwa .,2017).

Le pH optimum pour les réactions des PPO sont généralement dans la gamme de 5-7,5, par conséquent, l'abaissement du pH inhibe l'activité de l'enzyme. L'effet inhibiteur de l'acide ascorbique est temporaire car il est oxydé irréversiblement en réagissant avec les intermédiaires comme les o-quinones endogènes des enzymes, des métaux (le cuivre) et des pigments (Queiroz et al.,2008;Mesquita et Queiroz.,2013).

Souignons une combinaison d'acide ascorbique et d'acide citrique s'est avérée plus efficace que l'acide ascorbique seul (Sapers.,1993).

L'environnement acide couplé à la stabilité de l'acide ascorbique dans un environnement acide pourrait être responsable de l'augmentation d'efficacité de l'acide ascorbique. La PPO est inhibée par l'acide citrique par son action de chélation et par l'acide ascorbique via la spécificité dirigée vers les résidus d'histidine de la PPO (Ali et al.,2015).

Les acides les plus courants (ascorbique, citrique, malique,citrique et phosphorique) ont été utilisés dans la transformation des aliments pour contrôler le brunissement. Ces acides diminuent le pH à 3 ou moins réduisant drastiquement l'activité enzymatique (Zhou er al.,2016).

L'effet inhibiteur de la L-cystéine, de l'azide de sodium, du métabisulfite de sodium et de l'acide ascorbique avec de même l'influence d'une variété d'acides aminés tels que l'acide L-Glutamique, l'acide L-Aspartique, la Glycine, la L-Arginine, la L-Lysine, la L-Proline, la L-Thréonine et la L-Phénylalanine ont été testés sur la PPO de bourrache en utilisant deux substrats différents, le 4-méthylcatéchol et le pyrogallol (Alici et Arabacıa.,2016).

Pour la liste des acides aminés ,l'acide aspartique et l'acide glutamique étaient les plus puissants avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> équivalent à 3.38 et 4.15, respectivement.

En revanche, les acides aminés basiques inhibent efficacement l'activité PPO du romarin suivies par les acides neutres et les acides aminés acides (Aydemir.,2010).Parmi tous les inhibiteurs utilisés,l'acide ascorbique était l'inhibiteur le plus efficace pour la PPO de bourrache et l'azide de sodium le plus faible.

Ils ont signalé aussi que le type d'inhibition dépend à la fois de structure des inhibiteurs et des substrats utilisés pour la PPO de bourrache. (Alici et Arabacıa.,2016). Il a été rapporté aussi que l'azide de sodium inhibe fortement l'enzyme d'*Agaricus bisporus* (Gouzi et



*al.*,2010).De même, l'acide ascorbique est un inhibiteur efficace pour la PPO du haricot (Paul et Godwa.,2000).

L'inhibition compétitive a été trouvée pour la PPO de bourrache avec de L-cystéine en utilisant le 4-méthylcatéchol comme substrat. (Alici et Arabacia.,2016). De même, un type compétitif a été obtenu avec ce même inhibiteur en utilisant le 4-méthylcatéchol comme substrat pour la PPO d'artichaut (Doğan et *al.*,2005).

En revanche, le métabisulfite de sodium conduit à une inhibition de type non compétitif de PPO de la bourrache (Alici et Arabacia.,2016) mais un type inhibition compétitive a été rapporté pour la PPO d'artichaut (Aydemir.,2010)

Bravo et Osorio (2016) ont rapporté l'effet de l'acide ascorbique, butyl hydroxytoluène (BHT), chlorure de calcium, acide citrique, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), l'hydroquinone, la L-cystéine, le chlorure de sodium, le sulfite de sodium, l'acide tannique, l'acide tartrique, analogues phénoliques et quercétine sur la PPO de Groseillier à maquereau.

Les inhibiteurs les plus puissants étaient l'acide ascorbique, la L-cystéine et la quercétine et sulfite de sodium. La quercétine était un inhibiteur puissant même à de faibles concentrations, alors que les analogues phénoliques, tels que le fukugiside, présentaient une inhibition modérée. (Bravo et Osorio.,2016)

Parmi les sulfites et halogénures testés, le sulfite de sodium présentait clairement des effets inhibiteurs plus importants que le chlorure de calcium et de sodium. Ainsi, en utilisant le 4-méthylcatéchol, seule la quercétine joue le rôle d'un inhibiteur compétitif tandis que l'acide chlorogénique, l'acide ascorbique, la L-cystéine et le sulfite de sodium ont montré une inhibition compétitive. Ils ont de même attribué ces propriétés distinctes pour le même inhibiteur vis à vis de différents substrats à la présence de plusieurs mécanismes d'action possibles. (Bravo et osorio.,2016) .

L'acide kojique se trouve dans les aliments fermentés en tant que produit naturel et a montré un effet anti-brunissement L'acide kojique inhibe la PPO et rend également la mélanine incolore. L'utilisation limitée de l'acide kojique dans l'industrie alimentaire est due à des difficultés de production à grande échelle et à des coûts plus élevés.(Saghaie et *al.*,2013).

Les acides carboxyliques aromatiques comme les acides benzoïques et cinnamiques inhibent l'activité de PPO en raison de leurs similarités structurelles avec des substrats phénoliques et en formant un complexe avec le cuivre (Gacche et *al.*,2004 ;Siddiq et Dolan.,2017).

Cheema et Sommerhalter (2015) ont étudié l'inhibition de la PPO de mangue en présence de plusieurs inhibiteurs y compris le métabisulfite de sodium, l'azide de sodium, le chlorure de sodium, le glutathione, l'acide kojic, l'acide citrique, EDTA et l'acide benzoïque. Ils ont rapporté qu'à une concentration de 0,2mM, l'acide citrique est le plus puissant avec une inhibition totale suivie de l'acide benzoïque et acide kojique.

En outre, l'effet de huit inhibiteurs sur la PPO de prune a été récemment rapporté. Les inhibiteurs utilisés à trois concentrations de 0,5, 5 et 50 mM et étaient l'acide oxalique, glycine, l'acide ascorbique, le métabisulfite de sodium, l'acide citrique, l'EDTA et L-cystéine et chlorure de sodium. Ils ont observé que l'acide ascorbique était l'inhibiteur le plus efficace, avec une inhibition de 100% à des concentrations supérieures à 5 mM, et de la L-cystéine, avec inhibition à 99% à une concentration de 50 mM. (Ionita et al., 2017)

L'effet inhibiteur le plus faible a été observé pour la Glycine et le chlorure de sodium, avec un degré d'inhibition inférieur à 18% . (Ionita et al., 2017). Le plus puissant inhibiteur signalé pour la PPO de sapotille était l'acide ascorbique, avec une inhibition de 98% alors que le miel était l'inhibiteur le plus faible, avec une inhibition de 56% (Cortez et al., 2013).

Siddiq et al. (2017) ont étudié les différents inhibiteurs possibles de PPO à partir de prunes de Stanley et ont rapporté que la L-cystéine, l'acide ascorbique et le métabisulfite de sodium sont les inhibiteurs les plus efficaces avec un taux d'inhibition de 100%, 98% et 97% ,respectivement) à une concentration de 20 mM. De plus, l'effet d'inhibition le plus faible a été observé pour l'acide p-coumarique et l'acide benzoïque, avec un taux de 0% et 26%, respectivement, à la même concentration (20 mM).

Zaini et al. (2013) ont enquêté sur l'inhibition de PPO à partir de fruits de serpent. Parmi tous les inhibiteurs étudiés, la L-cystéine a révélé le effet le plus élevé, suivi par l'acide ascorbique, du glutathion, l'EDTA et de l'acide citrique.

Bien que des études antérieures aient rapporté l'efficacité de l'utilisation de différents produits chimiques de qualité alimentaire pour limiter les effets dégradants de l'activité spécifique des PPO, seules des informations limitées sur les mécanismes responsables de ce processus sont disponibles. (Ionita et al., 2017)

Les  $\beta$ -cyclodextrines inhibent l'activité enzymatique en formant probablement une inclusion complexes avec des substrats de PPOs en se lient au noyau hydrophobe du substrat. L'inhibition de l'activité enzymatique dépend du substrat et type de cyclodextrine utilisé (López-Nicolás et al., 2007 ; Singh et al., 2015).

Par conséquent, pour une inhibition efficace de la PPO, une cyclodextrine appropriée doit être utilisée en tenant compte le type de phénols dominants présents dans le produit alimentaire.(Jukanti et *al.*,2017).

En ce qui concerne les inhibiteurs naturels,le choix et leur utilisation dans l'industrie alimentaire sont aussi conditionnés et limités en raison de plusieurs critères : l'inhibition efficace, conséquences sur l'odeur / et de flaveur, de la sécurité alimentaire ,les préoccupations et la faisabilité économique (Taranto et *al.*,2017).

Le miel (Chen et *al.*,2000), procyanidines (Le Bourvellec et *al.*,2004), les produits de réaction Maillard (Lee et Park 2005), jus d'ananas (Lozano-De-Gonzalez et *al.*, 1993), jus de rhubarbe (Son et *al.* 2000), des préparations de pectine (Tong et *al.*,1995), les acides aminés et les sucres (Tan et Harris.,1995) font partie des produits naturels qui ont montré un certain effet inhibiteur sur l'activité de la PPO.

Le miel obtenu à partir de différentes sources ont diminué l'activité de PPO de ~ 2 à 45% dans les fruits et produits végétaux, et une inhibition accrue a été observée en combinaison avec l'acide ascorbique (Chen et *al.*, 2000).

Lim et Wong (2018) ont rapporté l'effet inhibiteur des agents anti-brunissement chimiques et naturels sur la polyphénol oxydase du gingembre (*Zingiber officinale Roscoe*). Les inhibiteurs chimiques utilisés étaient la L-cystéine, le chlorure de sodium et métabisulfite de sodium. Les activités de PPO ont été testées avec trois concentrations différentes d'inhibiteur (1.,3 et 5 mM) en utilisant le 4-méthylcatéchol et le pyrocatechol comme substrats.De même, comme inhibiteurs naturels le miel, extrait d'oignon rouge, extrait de piment rouge et le jus d'ananas ont été utilisés.

Les mêmes auteurs ont soulignés que le pourcentage de l'inhibition augmente avec l'augmentation de concentration d'inhibiteur de 1 à 5 mM.Le métabisulfite de sodium possède le plus grand pouvoir inhibiteur de PPO de gingembre avec une inhibition équivalente à 46,36% à 1,0 mM. De plus, métabisulfite de sodium a la plus petite valeur IC<sub>50</sub> et Ki en comparaison au chlorure de sodium et à la L-cystéine impliquant plus forte affinité de liaison aux enzymes (Mishra et *al.*,2012).

La L-cystéine et le chlorure de sodium n'étaient pas des bons inhibiteurs pour la PPO de gingembre en raison de faible pourcentage d'inhibition obtenu (6,63 et 28,18%). Le miel présentait un plus faible pourcentage d'inhibition pour le 4-méthylcatechol (1,4%) qu'en présence de pyrocatechol (42,57%). (Lim et Wong .,2018).

Le mécanisme d'inhibition de la PPO par le miel varie selon la variété de miel utilisée, source de PPO et substrats utilisés (Lozano.,2006).

Haard et Simpson (2000) ont suggéré que le miel agit comme agent chélateur pour inhiber la PPO. Un petit peptide de poids moléculaire de 600 kDa trouvé dans le miel peut chélater le cuivre du site actif de PPO, inactivant ainsi l'enzyme.

De plus, une grande quantité de composants tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les vitamines se trouvent dans le miel ce qui explique ses propriétés antioxydantes (Chua *et al.*, 2013).

Pour l'effet des extraits d'oignon, de piment et d'ananas sur l'activité PPO du gingembre, Lim et Wong (2018) ont trouvé que l'extrait de piment rouge a le plus fort pourcentage d'inhibition (22,90-47,97%) sur le gingembre en utilisant le 4-méthylcatéchol et le pyrocatechol par rapport aux extraits d'oignon et d'ananas.

Ce qui est en accord avec les résultats rapportés par Mercimek *et al.* (2015) dans lequel une inhibition de 44% de la PPO de pomme de terre a été obtenue avec l'extrait de piment rouge. L'extrait de piment était un inhibiteur non compétitif et mixte pour le gingembre en utilisant respectivement le 4-méthylcatéchol et le pyrocatechol. (Lim et Wong, 2018)

La présence d'une grande quantité de composés phénoliques et flavonoïdes ainsi qu'une teneur élevée en acide ascorbique traduisent de propriétés antioxydantes dans le piment, inhibant entre autres la formation de pigment brun indésirable (Shaimaa *et al.*, 2016).

Lim et Wong (2018) ont constaté aussi que l'extrait d'oignon chauffé et non chauffé ont présenté un type d'inhibition similaire, qui était une inhibition de type mixte. Cependant, un type d'inhibition compétitif de l'igname PPO a été récemment rapporté (Yapi *et al.*, 2015) et non compétitif sur la PPO les feuilles de manioc (Gagné et Lee 2014) en présence de l'extrait d'oignon.

L'oignon possède un groupe de sulfhydrylthiol (-SH) capable de se lier au cuivre sur le site actif de la PPO, ce qui interfère avec l'activité catalytique de la PPO. Les composés flavonoïdes et les groupes thiol trouvés dans l'oignon, ce qui amplifie sa capacité antioxydante, et peut également aider à contrôler la réaction de brunissement (Akhtar, 2015).

De plus une inhibition non compétitive du jus d'ananas sur le gingembre PPO a été obtenue pour les deux substrats utilisés (pyrocatechol et 4-méthylcatéchol).

Ce jus contient de l'acide ascorbique, et les propriétés antioxydantes de l'ananas pouvant aussi contrôler l'activité de la PPO (Antonioli *et al.*, 2012).

La cystéine et d'autres composés sulfhydryles présents dans l'extrait de l'ananas contribuent également à l'inhibition de la PPO (Lim et Wong.,2018).

Les procyanidines natives, polymères naturels de Lavanol se produisant dans les plantes, inhibaient probablement l'activité de la PPO en formant un complexe enzyme-polyphenol-substrat (Le Bourvellec et *al.*,2004).

L'effet inhibiteur des produits de réaction de Maillard produits à partir d'acides aminés et de divers sucres dépendaient de type d'acide aminé (arginine> cystéine> histidine> lysine) et type de sucre (monosaccharides> disaccharides) (Lee et Park.,2005).

Les protéines, les acides aminés et les peptides peuvent réagir avec les o-quinones en chélatant le cuivre de site actif de la PPO, affectant ainsi les niveaux d'activité de la PPO (Queiroz et *al.*,2008).

En outre,Girelli et *al.*(2004) ont observé que certains dipeptides glycyliques tels que l'acide glycylasspartique, la glycylyphénylalanine, la glycyglycine, la glycyllisine, la glycylytyrosine et la glycyclhistidine avaient affecté la formation de quinones à des concentrations allant de 1 à 50 mM.

L'acide cinnamique et ses dérivés ont également présenté différents types d'inhibition ; l'acide cinnamique (non compétitif),l'acide 4-hydroxycinnamique (compétitif),l'acide 4 méthoxycinnamique (non compétitif) (Shi et *al.*,2005).

L'acide cinnamique et ses dérivés s'attachent à une région non active du site, modifiant ainsi la conformation de l'enzyme en entravant la liaison du substrat à l'enzyme via un obstacle et/ou encombrement stérique (Jukanti et *al.*,2017).

Parmi les acides *p*-alcoxybenzoïques ,l'acide *p*-méthoxybenzoïque étant l'inhibiteur le plus puissant (Chen et *al.*, 2005).Le jus de rhubarbe et la pectine contiennent de l'acide oxalique, un inhibiteur naturel de la PPO qui inhibe l'activité de la PPO par chélation du cuivre (Yoruk et Marshall.,2003).

Bien que plusieurs inhibiteurs naturels de la PPO aient été identifiés, ils ne sont pas encore commercialement utilisés dans l'industrie agroalimentaire.

Ces différences dans les mécanismes permettent d'utiliser des combinaisons d'agents visant l'amélioration de l'inhibition.Une combinaison d'acide ascorbique, de cystéine et d'acide cinnamique a montré un effet synergique par rapport aux composés individuels dans le jus de pomme nuageux (Ozoglu et Bayındirli.,2002).

Iyidogan et Bayındirli (2004) ont obtenu 89% d'inhibition enzymatique dans le jus de pomme d'Amasya traité avec 3,96 mM de L-cystéine, 2,78 mM, acide kojique et 2,34 mM de 4-hexylrésorcinol (4-HR).

Dans le jus de pomme également, un effet synergique a été observé entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le 4-HR, qui n'a pas été observée pour l'association de la  $\beta$ -cyclodextrine et du méthyljasmonate. Dans la première combinaison, le  $\beta$ -cyclodextrine réduit la concentration de substrat libre qui pourrait être oxydé, tandis que 4-HR interagit directement avec l'enzyme par un mécanisme compétitif. (Iyidogan et Bayındirli.,2004)

Dans le second cas, la  $\beta$ -cyclodextrine complexée avec le substrat et le Jasmonate de méthyle, augmentant la quantité de substrat libre et diminuant la concentration de méthyle de Jasmonate qui pourrait inhiber l'activité de la PPO (Alvarez-Parrilla et *al.*, 2007).

L'inhibition par des composés chimiques et naturels sont des méthodes efficaces de contrôle de brunissement enzymatique, plusieurs composés peuvent être utilisés comme par exemple les sulfites,les sels ,les acides aminés ,et les acides organiques ..etc.

L'efficacité de l'inhibiteur est estimée par le calcul des valeurs d' $IC_{50}$  et  $K_i$ .La valeur d' $IC_{50}$  définit la valeur de l'inhibiteur qui inhibe 50% de l'activité enzymatique .Elle est estimée graphiquement en faisant une simple extrapolation sur la courbe décroissante obtenue par le traçage de l'activité enzymatique relative en fonction des concentrations croissantes d'inhibiteur tandis que la valeur de la constante d'inhibition  $K_i$  représente la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés.Elle est calculée par un logiciel sophistiqué en utilisant la courbe de double inverse de Linweaver-Burk en présence de trois droites et/ou au moins deux concentrations d'inhibiteur. L'efficacité, le mécanisme, les constantes d'inhibitions diffèrent d'une source à une autre pour un même inhibiteur et au sein de même source pour différents inhibiteurs ou différents substrats. Un aperçu récapitulatif sur l'efficacité de quelques inhibiteurs sur certaines PPOs est montré dans le tableau 12.

**Tableau 12 :** L'effet de certains inhibiteurs et leur mécanisme sur de l'activité de PPO

Source	Substrat	Inhibiteur	Ic50 (mM)	Ki (mM)	Mécanisme	Référence
Mélisse	Catéchol	Acide ascorbique	2	5.9	Noncompétitif	Dogan et al.,2013
		Glutathion	1.2	0.029	Compétitif	
		Azide de sodium	7.9	1.7	Compétitif	
		Acide benzoïque	1.4	2.2	Compétitif	
	4-méthyl Catéchol	Acide ascorbique	0.15	0.04	Mixed	
		Glutathion	0.075	0.011	Compétitif	
		Azide de sodium	0.0079	0.6	Compétitif	
		Acide benzoïque	0.096	0.09	Noncompétitif	
	Pyrogallol	Acide ascorbique	0.003	0.006	Compétitif	
		Glutathion	0.053	0.002	Noncompétitif	
		Azide de sodium	12	19	Compétitif	
	Lobéira	Catéchol	Acide ascorbique	<30	3.98	
Acide citrique			>20	1.24	Uncompétitif	
L-cystéine			<10	3.25	Compétitif	
Métabisulfite de sodium			<10	1.62	Uncompétitif	
Bourache	Pyrogallol	Acide ascorbique	0.28	0.18	Uncompétitif	Alici et Arabacia.,2016
		L-cystéine	0.07	0.09	Compétitif	
		Azide de sodium	25	5.10	Pseudo	
	4-methyl catechol	Métabisulfite de sodium	0.18	0.20	Compétitif	
		Acide ascorbique	0.11	0.02	Compétitif	
		L-cystéine	0.15	0.27	Mixed	
		Azide de sodium	75.7	44.03	Nonompétitif	
Gingembre	Catéchol	Chlorure de sodium	10.68	7.70	Uncompétitif	Lim et Wong.,2018
		Métabisulfite de sodium	10.28	4.78	Noncompétitif	
		L-cystéine	10.44	11.80	Uncompétitif	
	4-méthyl Catéchol	Chlorure de sodium	8.74	6.84	Uncompétitif	
		Métabisulfite de sodium	3.62	1.14	Noncompétitif	
		L-cystéine	8.82	7.37	Mixed	

### **3.2. Contrôle physique**

Les polyphénols sont des composants importants dans notre régime alimentaire avec de bonnes propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Les industries ont commencé à mettre en œuvre des techniques particulières de transformation des aliments, essentielles pour obtenir des produits alimentaires tout en assurant une grande quantité de composants, générant des bons effets sur la santé avec une durée de conservation appropriée. La stratégie convenable exige de l'oxydation de ces composés phénoliques par plusieurs facteurs y compris l'action enzymatique de la polyphénol oxydase.

Aujourd'hui, des technologies émergentes telles que la haute pression hydrostatique, le champ électrique pulsé, les ultrasons, les micro-ondes, le chauffage ohmique et l'irradiation sont appliquées comme alternatives au conventionnel et ont apporté de plus avec leurs résultats prometteurs. L'efficacité énergétique, la conservation de l'environnement, le temps de traitement, la réduction et la rétention des propriétés nutritionnelles sont des avantages clés pour l'utilisation de ces technologies innovantes dans le traitement des aliments. (Khan *et al.*, 2017).

#### **3.2.1. Technologies de traitement non thermiques**

Ces techniques comprennent la technique de haute pression hydrostatique (HHP), le champ électrique pulsé (PEF), les ultrasons (US) et traitement au dioxyde de carbone à haute pression (HPCD). Ces techniques ont la capacité d'inactiver la polyphénol oxydase à température ambiante avec l'utilisation de moins d'énergie par rapport aux méthodes conventionnelles (Pereira et Vicente., 2010). Pour optimiser la qualité du produit, le temps de traitement et l'inactivation des enzymes, ces techniques peuvent être utilisées seules ou en combinaison. (Khan *et al.*, 2017).

##### **a) Traitement par champ électrique pulsé (PEF)**

La technique de champ électrique pulsé en tant que nouvelle technologie a fait l'objet d'études approfondies en raison de ses vastes applications dans l'industrie alimentaire. L'effet du PEF sur différents fruits et légumes a été testé, y compris la pomme (Praporscic *et al.*, 2006; Schilling *et al.*, 2007; Schilling *et al.*, 2008), pomme de terre (Lebovka *et al.*, 2003), betterave à sucre (Eshtiaghi et Knorr., 2002) et la carotte (Grimi *et al.*, 2007).

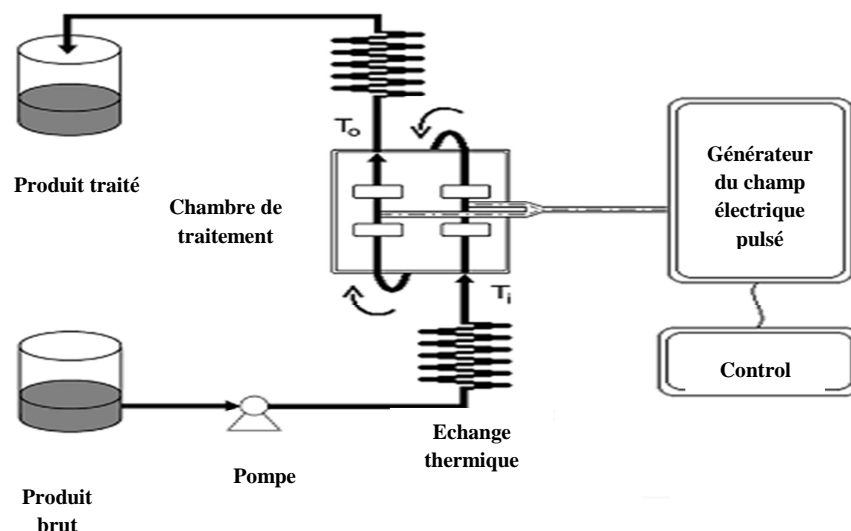
Les principaux avantages du PEF étaient sa capacité de conservation de la valeur nutritionnelle et sensorielle de l'aliment sans affecter la qualité des produits alimentaires. Principalement, les paramètres du PEF étudiés étaient ses effets sur l'acidité, le pH, les solides solubles et le PPO (Polyphénol oxydase), le rendement en polyphénols et couleur du jus de



pomme (Aguilar-Rosas et al., 2007; Charles- Rodríguez et al., 2007 ;Schilling et al., 2007; Noci et al.,2008 ; Riener et al., 2008;Walkling-Ribeiro et al.,2008;Ertugay et al.,2013).

De même, plusieurs investigations ont étudié en détail l'effet du PEF sur le processus d'inactivation de PPO.Giner et al. (2001) ont rapporté l'inactivation de PPO extrait de pommes par PEF.Ils ont observé que l'activité résiduelle de la PPO de la pomme a diminué de 3,15% à 24,6 kVcm<sup>-1</sup> pour un temps de traitement de 6 ms, alors que l'inactivation maximale obtenue pour la PPO de poire était 38,0% à 22,3 kV cm<sup>-1</sup> pour le même temps de traitement. Riener et al.(2008) ont observé le plus haut niveau de diminution d'activité (71%) pour les PPO dans le jus de pomme en utilisant un combinaison de préchauffage à 50 °C et un traitement PEF temps de 100 µs à 40 kV cm<sup>-1</sup>.Sanchez-Vega et al.(2009) ont obtenu une réduction de 70% de l'activité résiduelle de PPO dans le jus de pomme en utilisant un traitement par PEF à 38,5 kV cm<sup>-1</sup> et 300 impulsions par seconde après un préchauffage à 50°C.Schilling et al. (2008) ont atteint une inactivation une maximale de 48% de la PPO lorsque le jus de pomme a été préchauffés à 40°C et traité au PEF à 30 kV.cm<sup>-1</sup>.

Ertugay et al.(2013) ont signalé que l'activité de PPO des jus de pomme a diminué avec l'augmentation de l'intensité du champ électrique et le nombre des impulsions.La PPO de pomme n'était pas complètement inactivé à 30 kV cm<sup>-1</sup>,cependant, l'activité a diminué jusqu'à 32,1%, 7,0%, 2,9% et 1,6% à 50, 100, 150 et 200 impulsions,respectivement. Une inactivation de 6,2% et 100% a été obtenue avec un traitement de 50 impulsions à 40 kV cm<sup>-1</sup> et à 100 impulsions 40 kV cm<sup>-1</sup>,respectivement.



**Fig 10** : Schéma du système de champ électrique pulsé. Ti =température avant d'entrer dans la chambre d'entrée, To = température après la sortie la chambre (Ertugay et al.,2013)

### **b) Traitement à haute pression hydrostatique (HHP)**

Les applications de HHP dans les industries alimentaires visent la réduction de la détérioration des aliments, l'amélioration de la sécurité des aliments, la conservation de la fraîcheur des produits alimentaires et l'amélioration de la durée de conservation des produits alimentaires sans / ou avec une utilisation minimale de conservateurs (Considine.,2008). La cinétique d'inactivation des PPO à haute pression a été étudié dans plusieurs fruits et légumes, y compris les fraise (Cano et *al.*, 1997), l'avocat (Weemaes et *al.*, 1998),la prune (Wemaes et *al.*, 1998), la banane (MacDonald et Schaschke, 2000),la framboise rouge (Garcia-Palazon et *al.*,2004), le raisin (Rapeanu et *al.*,2006),la pomme (Bayindirli et *al.*,2006) et les champignons (Yi et *al.*,2013).

Il a été rapporté que la PPO dans les pommes, prunes, framboises rouges, raisins et champignons ne peuvent pas être inactivé complètement par un traitement à une pression de 700 MPa / 60°C (Buckow et *al.*,2009), 900MPa/25°C (Weemaes et *al.*,1998),800MPa / 18-22°C (Garcia-Palazon et *al.*, 2004), 80 0 MPa / 35°C (Rapeanu et *al.*,2006) et 800 MPa / 60° C (Gomes et Ledward.,1996), respectivement.

Yi et *al.*(2014) ont rapporté l'inactivation de PPO de champignon par cette technique.Ils ont mentionné que la PPO de champignon est très stable à la pression, comme le traitement à > 800 MPa est requis pour la réduction de l'activité .L'inactivation maximale de la PPO du champignon (99,2%) était atteint après un traitement HHP à 160 MPa pendant 1 min .Les résultats de native-PAGE ont montré que les bandes PPO sont devenues plus légères avec l'augmentation de la pression de traitement, voire la disparition après un traitement à la HHP à 160 MPa.ce qui confirme l'inactivation des PPO traitées à des niveaux extrêmement élevés de pression.

Un mécanisme possible de l'inactivation de PPO de champignons par la HHP est montré dans la Fig. 11. (Yi et *al.*,2013).La structure primaire des PPO extrêmement traités avec le HHP n'a pas changé, alors que l'inactivation du PPO par HHP a été attribuée à l'agrégation de molécules d'enzymes, entraînant la perturbation de son environnement catalytique. Les premiers traitements sous pression à peu d'influence sur la structure primaire de la protéine. Les résultats de isofocalisation électrique a montré qu'il n'y a pas eu de changement significatif dans les valeurs de pI de PPO après le traitement à la HHP à des pressions allant de 800 MPa à 1600 MPa après 1 min. Les modifications de la microstructure moléculaire ont confirmées que le traitement par la HHP induit une agrégation moléculaire, entraînant l'inactivation PPO soutenue par la variation du  $\zeta$ -potentiel. (Yi et *al.*,2013).

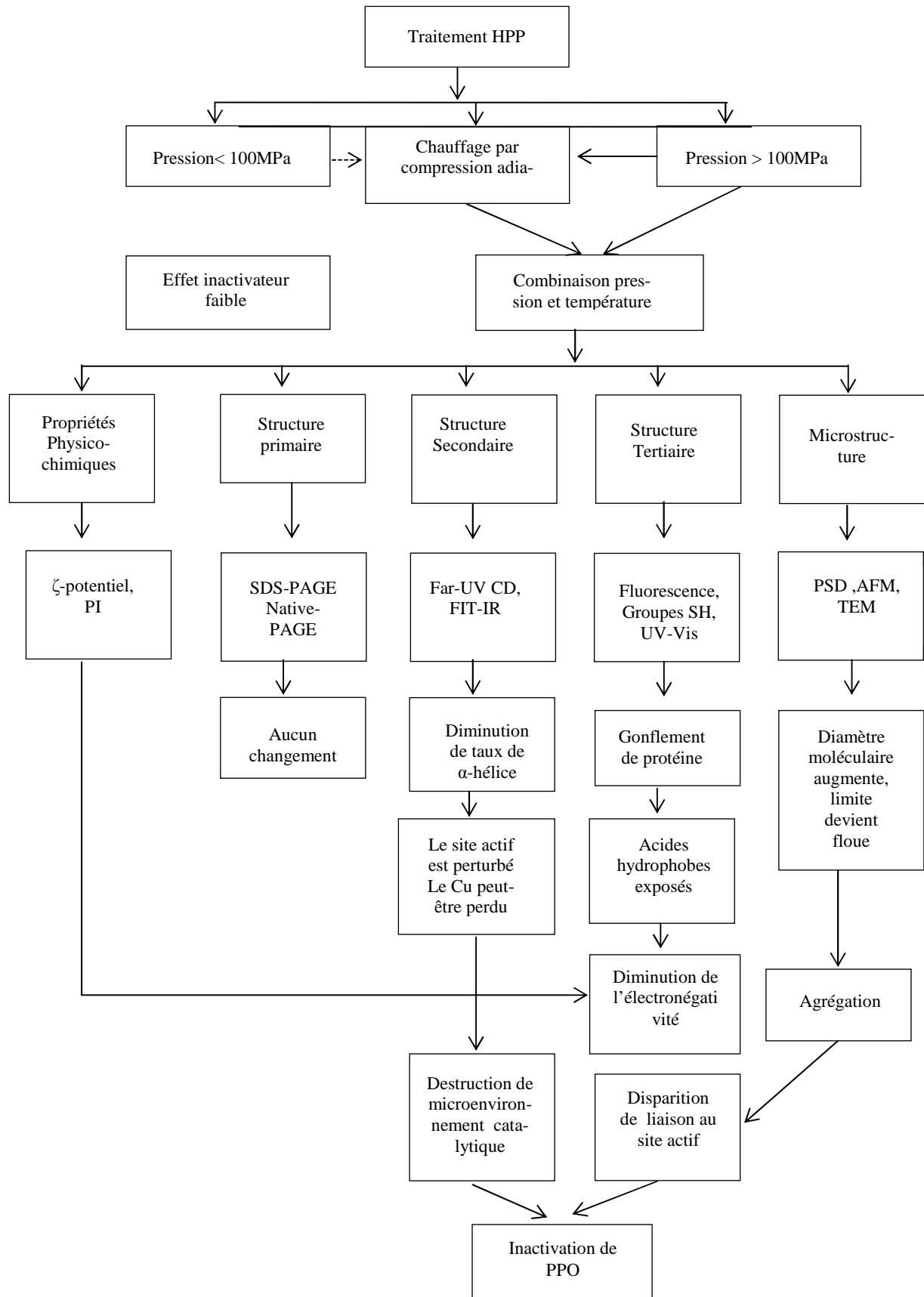


Fig 11 : Mécanisme possible de l'inactivation du PPO de champignon induite par le HHP (Yi et al.,2013).

### c) Traitement par les ondes ultrasons

Le traitement par les ondes ultrasons est une technologie prometteuse de conservation des aliments qui soumet les aliments à une intensité élevée de basse fréquence (20 - 100 kHz) avec une puissance de 10-1000 W /cm<sup>2</sup> (Soria et Villamiel., 2010; Delgado-Povedano et Luque De Castro. 2015).

Ces dernières années, la recherche sur l'effet des ultrasons dans l'inactivation des enzymes de fruits a été de plus en plus explorée, comme pour la PPO pomme fraîche (Jang et al., 2011), de jus de melon cantaloup (Fonteles et al., 2012), jus d'ananas (Costa et al., 2013), purée de poire, pomme et fraise (Sulaiman et al., 2015), champignons (Islam et al., 2014), purée d'avocat (Bi et al., 2015), jus de mûre (Cervantes-Elizarrarás al., 2017) , et de Yangmei (Cao et al., 2018).

D'autres enzymes endogènes de fruits ont été également inactivées par une combinaison d'ultrasons et de température incluant la pectine éthylestérase (PME) et la pectinestérase (PE) dans l'extrait de tomate et de citron (Raviyan et al., 2005 ; Terefe et al., 2009) et polygalacturonase (PG) dans le jus de tomate (Vercet et al., 2002; Terefe et al., 2009).

Le taux d'inactivation des enzymes dépend des fruits / cultivars, des conditions de traitement par les ultrasons telles que la fréquence, l'intensité, l'amplitude, la température et le temps de traitement. L'inactivation par ultrasons et par thermosonication de PPO, POD et PME dans différents fruits a été bien décrite par une cinétique de premier ordre (Terefe et al., 2009; Ercan et Soysal., 2011; Cheng et al., 2013 ; Sulaiman et al., 2015), tandis que le modèle de conversion fractionnaire était approprié pour PE dans le jus d'orange (Tiwari et al., 2009) et un modèle biphasique de premier ordre a été utilisé pour l'inactivation du PG dans le jus de tomate (Terefe et al., 2009).

L'inactivation enzymatique est principalement attribuée aux caractères physiques (cavitation, effets mécaniques, chocs micromécaniques) et / ou chimiques (formation de radicaux libres dus à la réaction sonochimique) (Piyasena et al., 2003 ; Raviyan et al., 2005 ; Ercan et al., 2011; Sulaiman et al., 2015).

La cavitation causée par la formation, la croissance et l'implosion de bulles minuscules de gaz ou des cavités libèrent d'énormes quantités d'énergie et entraînent une augmentation de la température (jusqu'à 1000 K) et de la pression (500 MPa) à l'échelle microscopique, ce qui fait disparaître l'activité enzymatique (Raviyan et al., 2005 ; Sulaiman et al., 2015).

De plus, la sonication favorise également les réactions chimiques impliquant les radicaux libres H<sup>+</sup> et OH<sup>-</sup>, formés par la décomposition de l'eau à l'intérieur des bulles oscillantes (Ercan et Soysal., 2011).

Les radicaux libres réagiront avec les acides aminés de la structure enzymatique, affectant par la suite l'activité enzymatique et sa fonction catalytique (Sulaiman et *al.*, 2015).

Cependant, avec l'augmentation de la température pendant le traitement par les ultrasons, les composés thermosensibles présents dans les aliments ont été partiellement détruits. Ainsi, plusieurs applications d'ultrasons sur les fruits et légumes ont utilisé un bain de glace ou un système d'eau de refroidissement à recirculation pour contrôler la température inférieure à 60°C tout en retenant les propriétés nutritionnelles et qualitatives (Tiwari et *al.*, 2009 ;Bi et *al.*, 2015; Saeeduddin et *al.*, 2015).

Malheureusement, le taux d'inactivation des enzymes peut diminuer lorsque la température est contrôlée. Il est nécessaire d'étudier les conditions de traitement par ultrasons telles que la température, l'intensité et la durée pour équilibrer l'inactivation enzymatique avec la conservation de la qualité (Cao et *al.*,2018).

#### **d)L'irradiation Gamma**

L'irradiation est aussi l'une des technologies innovantes de traitement des aliments connues par ses applications impliquant une action microbicide ,insecticide et inactivation des enzymes (Khan et *al.*,2017)

Dans le but de préserver les aliments, des traitements d'irradiation sont appliqués soient sur des produits alimentaires crus ou transformés en utilisant des rayonnements ionisants ou non ionisants. L'irradiation est un traitement physique impliquant une exposition directe à des électrons ou à des rayons électromagnétiques pour la conservation des aliments.. Pour ces raisons, elle peut être utilisée pour prolonger la durée de conservation des fruits et des légumes. La radiation inactive les microorganismes, garantit entre autres la désinfection et retarde le processus de maturation et sénescence (Lacroix et Ouattara., 2000).

Compte tenu de l'activité enzymatique, la plupart des études ont rapporté une diminution de l'activité des polyphénols oxydases (PPO) dans les échantillons irradiés de différentes espèces de champignons (Duan et *al.*, 2010).

Beaulieu et *al.* (2002) ont indiqué que la durée de conservation d'*A. Bisporus* a été prolongée de 4 jours avec la plus faible dose d'irradiation (4,5 kGy /h), et seulement 2 jours avec une dose plus élevée, 32 kGy /h. Les auteurs ont attribué une telle amélioration de la durée de conservation à 4,5 kGy / h à la diminution de l'activité de la PPO ,ce qui a conduit à une augmentation de la concentration en phénol ,et par conséquent, à un taux plus faible de formation de mélanine.De même,un brunissement plus important a été observé à 32 kGy / h et a été expliqué par les modifications de la perméabilité membrane (entrée

d'oxygène moléculaire dans le cytoplasme cellulaire) qui favorise à la fois l'oxydation enzymatique et celle des phénols. (Beaulieu et *al.*,2002)

En utilisant l'irradiation par faisceau d'électrons, Duan et *al.*(2010) on rapporté qu', après 10 jours de stockage, une activité de PPO nettement inférieure dans des échantillons irradiés avec des doses de 1-4 kGy a été obtenue comparée à celle des échantillons de contrôle. Aucun effet significatif sur l'activité de la PPO n'a été trouvé dans les échantillons d'*Agaricus bisporus* soumis également à une irradiation par faisceau d'électrons (Koorapati et *al.*, 2004).

Néanmoins, il y a un une étude rapportant une augmentation de l'activité de la PPO jusqu'au 7ème, 9ème et 12ème jours pour les échantillons d'*A. bisporus* traités à 0,5, 1 et 2 kGY.(Fernandes et *al.*,2012)

Lu et *al.*(2005) ont montré une diminution de l'activité de PPO de céleri frais coupé de 73% avec 1,0 kGy (0,5 kGy /heure) après 3 jours sous réfrigération (4°C). En 9 jours, l'enzyme a montré une activité d'environ 25% inférieure à celle de l'échantillon témoin.

D'autre part, l'utilisation de l'irradiation en combinaison avec d'autres méthodes,ou des inhibiteurs chimiques, permet une meilleure conservation de qualité (Fan et Sokorai ,2005).

#### **e) Traitement par la lumière ultraviolette**

Dans le spectre de rayonnement optique, l'ultraviolet à large spectre (UV) est le plus fort et le plus dommageable pour les microorganismes vivants et les enzymes..La lumière UV (longueur d'onde de 200 à 400 nm) est une technologie commerciale non thermique utilisée pour la décontamination de l'eau ,l'air et les surfaces, et peuvent être utilisés aussi pour le traitement des aliments et des boissons.Selon la longueur d'onde utilisée nous avons UV-A (315 à 400 nm),UV-B (280 à 315 nm), UV-C (200 à 280 nm) et et UV du vide (100 à 200 nm) (NTP,2018).Les UV-C ont démontré leur efficacité lors de l'élimination des contaminants d'origine microbienne à la surface des viandes, des volailles et des poissons, et aussi en prolongeant la durée de conservation des boissons tels que le cidre de pomme et les jus de fruits (Choi et Nielsen.,2005; Guerrero-Beltrán et Barbosa Canovas.,2006).

Contrairement à la désinfection de l'eau, la lumière UV a un effet de pénétration très faible au liquides trouble et colorés. Malgré l'efficacité de la désinfection microbienne, l'inactivation enzymatique par les UV-C est encore en cours d'étude. L'un des mécanismes proposés pour l'inactivation des PPO est que la photo-oxydation par les UV peut affecter la structure native de protéine, entraînant ainsi une perte de fonctionnalité enzymatique (Akgün et Ünlütürk.,2017).

Une activité résiduelle de 19% dans le nectar de mangue a été rapporté après un traitement UV de 30 min avec une intensité lumineuse de 25 mW / cm<sup>2</sup> (Guerrero-Beltrán et Barbosa-Cánovas, 2006).

L'irradiation de jus de pomme par rayons UV-C et UV-A combinés à une LED UV pendant 40 min provoque la perte de 67% de activité résiduelle de PPO (Akgün et Ünlütürk, 2017).

#### **f)Plasma basse température (froid)**

Le plasma froid, ou le plasma non thermique est le gaz partiellement ou totalement ionisé composé essentiellement de photons, d'ions et des électrons libres ainsi que des atomes dans leur états fondamentaux ou excités, grâce à une charge neutre nette (Misra et *al.*, 2011).Le plasma froid est généré par le non-équilibre de la température entre les électrons et les ions. (Silva et Sulaiman.,2018).

L'application du plasma froid sur la désinfection des aliments a été examinée par Misra et *al.* (2011) et Niemira (2012). Étant une technologie récente, peu ont étudié l'effet du plasma froid sur l'inactivation des enzymes. La peroxydase a été inactivée par le plasma froid dans un modèle de système alimentaire et extrait brut de tomate (Pankaj et *al.*, 2013; Surowsky et *al.*,2013). Surowsky et *al.* (2013) postulaient que le plasma froid provoque des modifications induites affectant la structure secondaire de l'enzyme comme mécanisme d'inactivation possible.

#### **G)Dioxyde de carbone à haute pression (HPCD)**

L'HPCD, également connu sous le nom de traitement au dioxyde de carbone en phase dense (DPCD), implique l'utilisation de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en phase sous-critique ou supercritique, pour traiter un produit alimentaire en ayant du CO<sub>2</sub> en contact avec l'aliment. (Silva et Sulaiman.,2018).

Le Gaz de CO<sub>2</sub> supercritique est obtenu en traitant l'échantillon à la température critique de CO<sub>2</sub> (31°C) et à la pression (4,7 MPa). La qualité sensorielle et nutritionnelle composant l'aliment n'est pas affecté par ce traitement (Damar et Balaban., 2006).

Le jus de pomme de Fuji traité avec du dioxyde de carbone supercritique à 30 MPa et 55°C pendant 60 min a entraîné une activité de PPO résiduelle (AR) de 38,5% (Gui et *al.*, 2006).

Zhang et *al.*(2010) ont étudié aussi l'effet de cette technique sur l'activité de PPO dans le jus de carotte et de pêche .L'activité résiduelle de PPO était 12% pour le jus de carotte traité avec HPCD à 8 MPa pendant 3 min à température ambiante, tandis que le PPO de

pêche a révélé plus de résistance avec une activité résiduelle de 33% après une HPCD de 8 MPa à température ambiante pendant 60 minutes.

L'inactivation de l'enzyme sous HPCD peut être due à la diminution du pH du milieu et/ou à l'altération de l'équilibre ionique (Ortuño et *al.*, 2013;Silva et Sulaiman.,2018).

### **3.2.2.Technologies de traitement thermiques**

Le traitement thermique inactive efficacement les enzymes.La durée de conservation des fruits est augmentée en les traitant thermiquement.Parmi leur variantes à la technique conventionnelle,nous citons ;le chauffage ohmique, diélectrique , chauffage par micro-ondes,chauffage par radiofréquence qui peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres méthodes de traitement (Rawson et *al.*,2011 ;Khan et *al.*,2017).

Le mode de transfert de chaleur est le mécanisme de base de ces nouvelles technologies de traitement. Par exemple, le chauffage ohmique également appelé chauffage par résistance électrique utilise la résistance présentée par la matière alimentaire ciblée dans le flux de courant électrique qui conduit à la génération de chaleur. Il a été suggéré d'être plus uniforme que les autres techniques d'électro-chauffage car c'est une méthode de chauffage rapide (Morrissey et Almonacid.,2005). Par contre, pour les micro-ondes la technologie de chauffage utilise des ondes électromagnétiques qui traversent les aliments ciblés en créant des oscillations dans ses molécules, générant ainsi de la chaleur.

#### **a)Traitement thermique ohmique (OH)**

Le chauffage conventionnel (CH) est une méthode largement utilisée pour inhiber les activités microbiennes et enzymatiques pour prolonger la durée de conservation des jus de fruits. Cependant, le traitement thermique (en utilisant plus de 80°C) peut causer une détérioration de caractéristiques du jus de fruit (C-à-d. altérations de la couleur, altération de la saveur, vitamines et autres pertes nutritionnelles) (Mena et *al.*,2013).

L'industrie alimentaire recherche donc des alternatives des technologies thermiques ou non thermiques capables d'inactiver les activités microbiennes et enzymatiques indésirables avec un effet minimum sur les caractéristiques qualitatives des jus de fruits (Chemat et Khan.,2011).

Le chauffage ohmique (OH) est un traitement thermique des aliments en passant sur un courant électrique alternatif à travers les composants alimentaires (Knirsch et *al.*,2010). La nourriture sert de résistance électrique pour chauffer très rapidement.Le dispositif de chauffage ohmique est composé de deux électrodes dans le contact direct avec la nourriture où le courant alternatif est directement passé à travers la nourriture. Le parcours de transfert de chaleur dans le chauffage conventionnel se produit d'une surface chauffée à la inté-



rieur du produit par convection et conduction, alors que dans le chauffage ohmique, il se produit de manière volumétrique (dedans et dehors d'un modèle de transfert de chaleur) et a le potentiel de réduire traitement excessif (Lima.,2007).

Le principe de chauffage ohmique est similaire au traitement à haute température à court terme (HTST) et fonctionnent comme procédé de chauffage conventionnel de jus avec comme avantages ;un chauffage rapide et uniforme. (Abdelmaksoud et al.,2018).

Ce chauffage rapide et uniforme entraînant l'inactivation de la charge microbienne et l'activité des enzymes dans un temps plus court avec une perte moindre d'acide ascorbique et moins d'odeur étrange par rapport au chauffage conventionnel (Demirdoven et Baysal.,2014).

Le chauffage ohmique a montré des résultats prometteurs dans l'inactivation des polyphénol oxydases, peroxydase et pectine méthylestérase de jus d'ananas, de papaye et d'orange (Demirdoven et Baysal.,2014).

L'activité enzymatique a un impact négatif sur la qualité du jus et elle devrait être contrôlée à chaque étape de la transformation des aliments (Demirdoven et Baysal.,2009)

Makroo et al. (2017) ont étudié l'effet de chauffage ohmique (à  $24 \text{ V /cm}^{-1}$ ) et eau chaude (à  $90^\circ\text{C}$ ) pour 15, 30, 45 et 60 s sur du jus de pastèque frais. Ils ont trouvé que l'activité de PPO a été réduite à 36,15 et 8,87% en 60 s, respectivement.

Icier et al. (2008) ont rapporté des courbes d'inactivation de la PPO sur le jus de raisin à différent temps en gardant le débit à  $30 \text{ V / cm}$ . Ils ont trouvé que l'activité PPO a diminué avec le temps d'inubation et l'augmentation de température (dans la gamme de 60 à  $90^\circ\text{C}$ ).

Abdelmaksoud et al.(2018) ont étudié l'inactivation de PPO de jus de pomme par chauffage ohmique .Ils ont rapporté qu'une tension à un gradient de  $40 \text{ V / cm}$  conduit à des changements de couleur défavorables dans le jus de pomme et un résultat similaire a été rapporté pour le jus d'orange par Demirdoven et Baysal (2014).

En revanche, les valeurs de températures au-delà de  $80^\circ \text{C}$  à  $40 \text{ V / c}$  provoque l'apparition des bulles entraînant la perte du jus pendant le chauffage et également une détérioration supplémentaire de la couleur et d'autres caractéristiques de qualité (Abdelmaksoud et al.,2018).

Le temps des traitements au chauffage ohmique fixé à 60 s avec un temps de traitement long entraîne une détérioration supplémentaire des caractéristiques de qualité, en particulier de la couleur et de l'acide ascorbique (Demirdoven et Baysal 2014).

La diminution de l'activité de PPO était due à l'effet du chauffage à la fois par le chauffage ohmique et le chauffage conventionnel en plus de la présence d'un gradient de tension, ce qui pouvait influencer les réactions biochimiques en modifiant l'espacement moléculaire et en amplifiant l'influence de chauffage (Castro et al., 2004).

Chutintrasri et Noomhorm (2006) ont constaté que l'inhibition de l'activité de la PPO par une activité de traitement thermique classique dans un ananas s'amplifie rapidement au-dessus de 75 ° C à cause de phénomène dénaturation (Structure du PPO), et ont trouvé que l'inhibition de la PPO était de 93 et 98,8% pendant 5 min à 85 et 90 ° C, respectivement.

### **B) Micro-ondes**

La technique de microondes est une autre technologie largement utilisée. Il est appelé les ondes électromagnétiques dans la gamme de fréquence de 300 à 300000 MHz. Après absorption de l'énergie de micro-onde par les aliments, elle provoquerait la rotation et la collision des ions et des molécules polaires présents dans le système alimentaire en fonction de l'alternance d'un champ électromagnétique générant ultérieurement de la chaleur pour la cuisson (Khan et al., 2017)

L'utilisation des fours à micro-ondes est la plus pratique manière de cuisiner, de réchauffer et de décongeler les aliments (Venkatesh et Raghavan., 2004). En séchage de fruits et légumes, les micro-ondes ont été largement utilisées pour obtenir des produits de haute qualité et aussi pour éviter les changements indésirables dus à la dégradation des produits finis (Zhang et al., 2006).

Une autre technique basée sur les micro-ondes appelée micro-ondes avec hydrodiffusion et gravité (MHG), en raison de sa structure unique, suscite plus d'attention. C'est une technique unique à micro-ondes inversé qui combine la gravité de la terre avec le chauffage par micro-ondes à la pression atmosphérique (Vian et al., 2008).

L'énergie des micro-ondes induisent des effets thermiques sur les micro-organismes et enzymes, similaires à ceux des mécanismes de chauffage conventionnels. Cependant, un problème qui a souvent été rencontré est l'occurrence des profils de température dans un produit. La mesure des profils de température pendant le chauffage par micro-ondes est effectué en utilisant des sondes à fibres optiques qui pourraient être facilement incorporé dans le processus sans le perturber (Gerard et Roberts., 2004)

La pasteurisation impliquant l'inactivation enzymatique par des micro-ondes n'a pas été couramment étudiée et il y a peu de rapports sur les données cinétiques pour l'inactivation de la POD et de la PPO. (Tajchakavit et Ramaswmy, 1997 ; Soysal et Soylemez, 2005).

Matsui et *al.*(2007) ont étudié l'effet des microondes sur la PPO de noix de coco verte. Ils ont remarqué une diminution de l'activité enzymatique en fonction du temps de chauffage pour de températures proches de 80°C. Les valeurs de z pour les solutions PPO / eau et PPO / sucre étaient similaires  $D_{93C}= 16,5$  s ( $z =35,51^{\circ}C$ )et  $D_{91C}=18$  s( $z =331$  C), respectivement.

Mendonca et Guerra (2003) ont observé qu'en présence de sels, une diminution significative de la thermostabilité enzymatique a eu lieu en raison de changements conformationnel de la structure enzymatique induits par le sel et éventuellement la dissociation des molécules thermostable agrégés. Après l'incidence des micro-ondes de solution avec des sels à  $T_{ref}= 99,21$  C et de la solution avec des sels / sucres à  $T_{ref} = 98,71$ , l'activité résiduelle des PPO n'a pas été détectée .

### **C)Inactivation thermique classique**

Le traitement thermique est une technique classique très répandue en raison de son efficacité et avantage en assurant une inactivation des enzymes et élimination des microorganismes permettant par conséquent le prolongement de la durée de conservation des produits alimentaires.(Silva et Sulaiman.,2018).

Cependant,ce processus influence également la teneur en nutriments,en particulier les antioxydants.Généralement, les nutriments peuvent être considérablement réduits car la plupart d'entre eux sont instables en présence de températures élevées. Fait intéressant, certains rapports ont montré que les activités biologiques de certains fruits et légumes augmentaient après le traitement thermique, probablement en raison de la formation de nouveaux composés (Tao et *al.*, 2018).

Un aperçu sur les travaux récents portant sur l'effet du traitement thermique des fruits et légumes et ses effets sur l'activité résiduelle de PPO endogène a été réalisée et est présentée dans le tableau 13.

Les résultats varient d'activité résiduelle de l'ordre 45% pour la PPO de chou rouge traité à 100° C pendant 10 min (Bernstein et Noreña.,2016) à <5% d'activité résiduelle dans le jus de pomme exposé pendant 1 min à 70°C (Buckow et *al.*, 2009) et 0,3% d'activité résiduelle dans la purée de fraises Camarosa exposée pendant 5 min à 70°C (Sulaiman et Silva,2013).

La variabilité dans le même fruit est également très élevée, en fonction du cultivar ou de la variété de fruit. Par exemple ,la PPO de purée de poire de Taylor d'or traité pendant 10 min à 85°C révèle une AR équivalente à 0,3% (Sulaiman et *al.*, 2015), alors que la PPO de purée de poire de Packam a maintenu 53% se son activité après 100°C (Zhou et *al.*, 2018).

En ce qui concerne la PPO de purée de fraises, un traitement à 90°C pendant 15 min n'a aucun effet sur l'enzyme et a provoqué un effet mineur sur la PPO dans la purée de fraise Aroma (Terefe et *al.*, 2010), contre 0,3% d'activité résiduelle pour la PPO dans la purée de Camarosa après 5 min à 70°C.

D'autres PPOs semblent être plus résistantes comprennent la citrouille, les champignons, la mangue et l'ananas. (Silva et Sulaiman.,2018).

L'inactivation thermique est généralement décrite par un modèle de réaction de premier ordre dont c'est le cas par exemple de la PPO de champignon (Cheng et *al.*,2013) ,deprune (Ionita et *al.*,2017) , et de Yangmei (Cao et *al.*,2017) alors qu'elle pourra être parfois décrite par un modèle biphasique comme le cas de PPO de l'ail (Fante et Norena.,2012) and Yam blanc (Eze et *al.*,2010).

Quelques paramètres et constantes sont souvent calculés pour avoir une idée sur la cinétique d'inactivation thermique, sur le comportement de l'enzyme et sa stabilité vis-à-vis de l'augmentation de la température. Nous avons comme paramètres la constante d'inactivation ( $k$ ), le temps de réduction décimale ( $D$ ), le temps de demi vie  $t_{1/2}$ , le paramètre de sensibilité ( $Z$ ) et l'énergie d'activation ( $E_a$ ).

La constante de vitesse d'inactivation ( $K \text{ min}^{-1}$ ) est calculée à partir de la pente de la droite décroissante obtenue en traçant le logarithme népérien de rapport activité résiduelle sur l'activité initiale en fonction de la température. De  $K$ , les valeurs de réduction décimale ( $\text{min}$ ), les valeurs de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) pourraient être estimées en utilisant les ratios ( $\ln 10 / K$ ) et ( $\ln 2 / K$ ), respectivement. De plus, le paramètre de sensibilité à la température ( $Z$ ) et l'énergie d'activation ( $E_a$ ) sont généralement estimées à partir de la pente de  $\ln k$  en fonction de l'inverse de température (en Kelvin) et de  $\log D$  en fonction de la température (en Celsius), respectivement. En outre, une étude thermodynamique complémentaire est souvent présente lors de l'étude de l'inactivation thermique des enzymes en rapportant les valeurs des paramètres thermodynamiques. Les paramètres thermodynamiques sont  $\Delta G$ ; le changement d'énergie libre de Gibbs considéré comme la barrière énergétique pour l'inactivation enzymatique,  $\Delta H$ ; le changement d'enthalpie, une mesure du nombre de liaisons covalentes cassées et  $\Delta S$ ; le changement d'entropie de l'enzyme nette et du trouble dissolvant (Gouzi et *al.*,2012 ;Cao et *al.*,2017).

**Tableau 13 :** Activité résiduelle de la polyphénol oxydase dans certains fruits et légumes après un traitement thermique

Source	Cultivar	Milieu	Traitement thermique	Acticité Résiduelle (%)	Référence
Ananas	-	Purée	90 °C – 5 min	1.2	Chutintrasri et Noomhorm.,2006
			85 °C – 5 min	7	
			80° C – 5 min	31	
	Queen	Purée	95 °C – 12 min	3	Chakraborty et al.,2015
Pomme	Boskoop	Jus froid	70 °C – 1 min	<5	Buckow et al.,2009
	Royal Gala	Purée	85 °C – 3 min	2	Sulaiman et al.,2015
			75 ° C – 10 min	24	
	Starking Delicious	Jus froid	70 ° C – 2 min	22	Akgün et Ünlütürk .,2017
Fraise	Festival	Purée	90°C – 15 min	100	Terefe et al.,2010
	Aroma		90°C – 15 min	82	
	Camarosa	Purée	70°C – 5 min	0.3	Sulaiman et Silva.,2013
			60°C – 5 min	44	
	Ruby Gem	Purée	88° C – 2 min	0	Terefe et al.,2013
Poire	Nashi	Purée	85°C – 15 min	15	Yoo et Silva .,2011
	Taylor d'or	Purée	85°C – 10min	0.3	Sulaiman et al.,2015
			80°C – 10min	15	
			75°C – 10min	90	
	Packham	Purée	100°C – 0 min	53	Zhou et al.,2018
Prune	Pyrus bretschneider	Jus	95 °C – 2 min	0	Saeduddin et al.,2015
			65 °C – 10 min	59	
Orange, Fraise et banane	-	Jus	80 C – 7 min	0.4	Escobedo-Avellaneda et al.,2016
Feuilles de coriandre	-	Pâte	90 C – 2 min	0	Nath et al.,2016
Yangmei	-	Jus	75° C – 10 min	<2	Cao et al.,2018
Citrouille	-	Purée	90°C – 10 min	55	García-Parra et al.,2018,

La cause la plus commune de l'inactivation par la chaleur des enzymes est la perte de la conformation native (dépliage de la structure tertiaire de la protéine active à un désordre polypeptidique), un processus identifié comme une thermodénaturation, qui a lieu à la suite de la mobilité moléculaire accrue à des températures élevées. De même, ces paramètres thermodynamiques d'inactivation sont des indicateurs utiles de toute stabilisation ou déstabilisation secondaire (Gouzi et al.,2012 ;Cao et al.,2017).

Une récapitulation des valeurs de paramètres cinétiques et thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO de certaines sources végétales est donné dans le tableau 14.

**Tableau 14** : Les valeurs des paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'inactivation thermique des polyphénol oxydases obtenues à partir de quelques sources végétales

Source	Substrat	pH	T (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	D (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	Z (°C)	Ea (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (J/mol)	Référence
Truffes noires	Catéchol	7	45	0.0115	200	60	9.5	190	188	100.69	274	Gouzi et al.(2013)
			50	0.07	32	9.9			188	97.45	280	
			55	0.132	17.5	5.3			188	97.28	276	
			60	0.444	5.18	1.56			188	95.44	278	
			65	0.938	2.45	0.739			188	94.81	275	
	Tyrosine	5	45	0.002	924	278	10.8	219	215	104.72	384	
			50	0.0066	345	104			215	103.8	379	
			55	0.018	124	37			215	102.6	378	
			60	0.072	32	9.7			215	100.5	386	
			65	0.338	6.8	2.05			215	97.69	381	
Lobéira	Catéchol	6.5	30	0.0021	1038.6	162.6	49	39.9	37.39	104.47	-221.40	Batista et al.(2014)
			40	0.0043	526.8	121.8			37.31	106.24	-220.24	
			50	0.0055	424.8	109.2			37.22	109.14	-222.66	
			60	0.0073	313.2	90.6			37.14	111.76	-224.08	
			65	0.0148	154.2	48			37.10	111.49	-220.10	
Igname comestible	Dopamine	6	60	0.012	191.92	57.76	38.46	52.93	50.16	90.08	-11.99	Yapi et al.,(2014)
			65	0.015	153.53	46.20			50.11	90.68	-12.01	
			70	0.026	88.53	26.65			50.07	91.28	-12.02	
			75	0.046	50.06	15.06			50.03	91.88	-12.04	
			80	0.15	15.35	4.62			49.99	9.49	-12.06	
Igname de pied d'éléphant p	Catéchol	6	65	0.005	418.65	126.00	34.01	64.22	61.49	105.94	-135.52	Singh et Wadhwa .(2017)
			70	0.011	227.98	68.61			61.41	107.55	-136.51	
			75	0.022	108.10	32.54			61.32	108.68	-136.09	
Jacquier	Catéchol	5.5	60	0.00003	55.6	16.7	22.51	103.3	100.53	115.72	-0.046	Tao et al.(2018)
			70	0.00011	15.2	4.6			100.45	115.57	-0.044	
			80	0.00025	4.8	1.4			100.36	115.62	-0.043	
			90	0.00062	2.7	0.8			100.28	117.26	-0.046	

### **III. Partie expérimentale**

# **Chapitre 4 :**

## **Matériel et méthodes**



#### 4.1.Matériel végétal

Les variétés des dattes algérienne; Deglet Nour,Ghars,Tadela et Tantbouchet ont été achetées à pleine maturité (Stade Tamr) en Octobre 2016 du marché local de la wilaya de Laghouat.(Figure 12).

L'identification des variétés a été faite par un botaniste (MCA) au département d'agronomie à l'université de Laghouat tout en prenant aussi l'avis des certains agriculteurs expérimentés.

Les variétés ont été par la suite lavées avec de l'eau de robinet puis conservé à  $-10^{\circ}\text{C}$  dans des pots fermés pendant un mois avant utilisation.

Le catéchol, le pyrogallol et la polyvinyl (poly) pyrrolidone (PVPP) ont été achetés chez Sigma Aldrich. Le 4-méthylcatéchol et l'acétate de sodium anhydre,les différents inhibiteurs ont été obtenus auprès de Fluka.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (12\text{H}_2\text{O})$  et l'acide acétique provenaient de Normapur. Les réactifs restants étaient de qualité analytique et que l'eau distillée a été utilisée dans toutes les expériences.



**Fig12** :Les variétés des dattes utilisées

## 4.2.Méthodes

### 4.2.1Extraction et purification des PPO des dattes

300g de chair des dattes préalablement refroidies à 4°C ont été découpées et homogénéisées dans 500 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de sodium 0,05M à pH 7.0 et de 3% polyvinyl(poly)pyrrolidone (PVPP) pendant 1 min à l'aide d'un mixeur. Le PVPP a été utilisé comme chélateur des composés phénoliques (Galeazzi et al.,1981).

Le broyat obtenu est ensuite filtré par un pressage manuel en utilisant quatre couches de gaze, le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10min à 4000trs/min.

Le surnageant représentant l'extrait brut a été porté à une saturation de 80% avec du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solide. Une centrifugation est par la suite réalisée à 20000xg pendant 15 minutes à 10 °C. Le surnageant a été rejeté et que le précipité a été récupéré en le solubilisant avec un petit volume de tampon phosphate de sodium (0,05 M, pH 7,0).

La solution d'enzyme concentrée a été dialysée à 4 °C contre un tampon phosphate de sodium (0,05 M, pH 7,0) avec deux changements du tampon pendant la dialyse au sulfate d'ammonium. Le PEG-6000 (polyethylene glycol) a été appliqué sur les sacs de dialyse pour les concentrer au max (Naci et al.,2001).

Pour une purification supplémentaire du PPO, la solution dialysée a été appliquée sur la colonne d'une chromatographie échangeuse de cation ;mono Q-Sepharose Big Beats (1,5 x 18 cm) préalablement équilibrée avec un tampon phosphate de sodium (0,05 M,pH7).Un lavage de la colonne avant utilisation a été réalisé jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit inférieure à 0,03 afin d'éliminer toute trace d'une expérience précédente.

L'élution a été assurée avec un gradient croissant et linéaire d'NaCl de 0 à 0,5 M contre le tampon phosphate de sodium 0,01 M (pH 7,0) en utilisant une pompe péristaltique ajustant un débit à 0,5 ml / min.

Les fractions (3 ml chacune) ont été recueillies et contrôlées à 280 nm et leurs activités enzymatiques ont été mesurées. Les fractions ayant des activités enzymatiques plus élevées ont été sélectionnées et regroupées pour une autre étape de purification complémentaire.80% de l'activité de la PPO a été récupérée à une concentration en chlorure de sodium équivalente à 0,25 M. L'extrait purifié ainsi obtenu a été concentré par la suite en utilisant l'unité de de filtration centrifuge Amicon™ Ultra-15 (>10kDa permettant d'éliminer les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa .La centrifugation a été réalisée par 2800xg, à 4°C pendant 5min.

La dernière étape consiste à une séparation en fonction du poids moléculaire. L'HPLC (Agilent 1260 Infinity) de gel filtration avec une colonne C18 Zorbax (3-300kDa) a été appliqué pour l'extrait purifié de la variété de Tanbouchet, Tadela et Ghars tandis que la PPO de deglet Nour a été purifié via la colonne de séphadex S200 (2.6 cm X 92 cm). Les protéines ont été aussi éluées à un débit de 0.5ml/mn.

La colonne a été aussi pré-équilibré avec du tampon phosphate (0.01 mM and pH7). Une deuxième concentration a été de même faite avant de passer à l'électrophorèse en utilisant l'unité de filtration centrifuge Amicon™ Ultra-15 (>10kDa).

Notons que toutes les procédures de purification ont été réalisées au niveau de au laboratoire de biotechnologie moléculaire des Euacaryotes au centre de biotechnologie de Sfax.

#### **4.2.2. Mesure d'activité et dosage des protéines durant la purification**

Pour la mesure d'activité enzymatique des fractions obtenues après chaque étape de purification, le catéchol a été utilisé tout en respectant les conditions optimales de chaque variété [catéchol à 40mM avec un tampon acétate (pH 5.5) pour la variété de deglet nour, et catéchol à 80mM avec un tampon acétate (pH 5) pour la variété Tadela, avec un tampon acétate (pH 4.5) pour Ghars et catéchol à 120mM comme substrat avec tampon phosphate de sodium (pH 6) pour la variété Tantbouchet]. Le choix de pH a été fait en se basant sur les résultats de l'étude de pH optimum et la concentration du substrat de l'extrait brut.

Un volume de 1 ml de solution de substrat a été utilisé dans l'échantillon à blanc. Une unité d'activité de PPO a été définie comme la quantité d'enzyme qui provoque une augmentation de l'absorbance de 0,001 / min pour 1 mL d'enzyme.

Pour le dosage des protéines et aussi pour le calcul de l'activité spécifique la méthode de Bradford a été appliquée avec le SAB (albumine de sérum bovin) comme étalon.

#### **4.2.3. Zymogramme, SDS-PAGE et poids moléculaire**

Afin de visualiser l'activité enzymatique de la PPO purifiée de chaque variété, une électrophorèse en condition native a été appliquée. Le zymogramme a été réalisé selon la méthode décrite par Davis (1964) en immergeant le gel contenant l'enzyme ayant subi une migration sous l'effet d'un champ électrique (40V) dans une solution de 100mL de pyrocatechol à une concentration double par rapport à celle utilisée pour le suivi de l'activité.

De même, pour déterminer le poids moléculaire des différentes PPOs, une SDS-PAGE a été utilisée selon cette fois-ci selon la méthode décrite par Laemmli (1970). Les conditions dénaturantes ont été assurées par l'ajout de  $\beta$ -mércaptoéthanol et via un chauffage des solutions à 100°C pendant 5 min dans un thermomixeur (Thermomixer comfort)

Les solutions traitées ont été appliquées par la suite au gel de polyacrylamide de 12% de résolution et 5% d'empilement.

La détermination du poids moléculaire a été faite par comparaison avec les bandes d'un marqueur de poids moléculaire (MW). Le marqueur utilisé était le "PlusOne™ silver staining kit protein (17-1150-02 MW: 14–97 kDa) pour le cas des PPOs de Ghars, Tadela et Tantbouchet tandis que pour la PPO de Deglet Nour le marqueur SM0671, fermentas, MW: 12–150 kDa a été utilisé.

#### **4.4. Effet de stockage**

Afin d'avoir une idée sur le taux de perte de l'activité enzymatique des PPOs des dattes pendant le stockage à longue durée à 4 °C, un suivi périodique de l'activité enzymatique pendant 8 semaines a été réalisé. Le substrat utilisé était le catéchol.

L'activité enzymatique relative a été exprimée en pourcentage par rapport à l'activité enzymatique de l'enzyme au jour 0 (sans stockage).

#### **4.5. Caractérisation des PPOs des dattes**

##### **4.5.1. pH optimum et stabilité de pH**

Cette étude a été réalisée dans l'intervalle de pH compris entre 2 et 10. Trois systèmes de tampons ont été utilisés ; acétate, (50 mM, pH 2-5,5), phosphate (50 mM, pH 6-8) et Tris-HCl (50 mM, pH 8-10). Pour étudier la stabilité du pH, l'enzyme a été incubée dans du tampon McIlvaine. La même intervalle de pH (2-10) a été utilisée et la stabilité de mélange a été vérifiée à 4°C pendant deux jours et ceci pour chaque valeur de pH.

Le catéchol, le pyrogallol et le 4-méthylcatéchol ont été utilisés comme substrats durant cette analyse. La concentration et le pH utilisé pour le suivi de l'activité enzymatique en présence de chaque substrat sont déjà décrits lors de mesure de l'activité.

L'activité enzymatique a été exprimée en pourcentage par rapport à la valeur optimale.

##### **4.5.2. Température optimale et stabilité thermique**

L'effet de température sur l'activité enzymatique des PPOs des dattes a été étudié dans une gamme de température comprise entre 10 et 90°C. Le catéchol, le 4-méthylcatéchol et le pyrogallol ont été utilisés comme substrats en respectant les mêmes conditions de mesure d'activité. En outre, la stabilité thermique de l'enzyme définit comme étant la valeur de température à laquelle l'enzyme pourra garder son activité pendant une durée plus ou moins longue. Elle a été étudiée à différentes températures réglées par un bain mari 30 à 90°C en utilisant les trois mêmes substrats. L'enzyme a été incubée pendant 10 min à chaque température.

L'activité enzymatique relative (%) a été calculée par rapport à l'activité optimale.

#### 4.5.3. Effet de substrat

La spécificité des PPOs vis-à-vis de certains substrats a été étudiée. Huit substrats, différents par leur groupes fonctionnels, avec leur longueurs d'ondes spécifiques aux produits formés en occurrence dont trois substrats o-diphénols [dopamine(475nm), pyrocatechol (410nm) et 4-méthylcatéchol(400)], trois substrats monophénoliques [phénol(390nm), L-tyrosine(475nm) et crésol(485nm)] et trois autres triphénols [acide chlorogénique (481nm), pyrogallol(475nm) et acide gallique(420nm)] ont été utilisés à une concentration de 10mM .

Un tel choix des substrats est fait dans le but de détecter la présence ou non des activités monophénolase, o-diphénolase et/ou triphénolase.

L'activité enzymatique en présence de chaque substrat a été exprimée en pourcentage par rapport à l'oxydation du pyrocatechol.

#### 4.5.4 Paramètres cinétiques (K<sub>m</sub> et V<sub>max</sub>)

En se basant sur les résultats de la spécificité du substrat et le taux d'oxydation par rapport à celui de catéchol. Seulement trois substrats révélant un taux élevé ont été choisis.

Les paramètres cinétiques (K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>) des PPOs des dattes ont été estimés à différentes concentrations de pyrocatechol (20 mM à 200 mM), de pyrogallol (10 à 150 mM), et de 4-méthylcatéchol (10-100).

Pour déterminer l'efficacité catalytique ou le pouvoir catalytique de l'enzyme, le rapport V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> a été calculé à partir des données obtenues via les graphiques de Lineweaver-Burk.

Pour initier la réaction enzymatique, 15 µl d'enzyme a été ajouté à chaque substrat à une concentration déterminée .

#### 4.5.5 Effet de la concentration d'enzyme

L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse d'oxydation du pyrocatechol pour les PPOs de quatre variétés a été étudié par la mesure de la vitesse initiale pour des volumes croissants de l'extrait pure de la PPO compris entre 5 et 30 µl.

L'activité enzymatique a été mesurée selon les mêmes conditions décrites précédemment pour la mesure d'activité.

La constante catalytique K<sub>cat</sub> a été calculé pour les PPOs des dattes en présence de catéchol, pyrogallol et 4-méthylcatéchol comme substrats selon l'équation suivante :

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_0} \quad (1)$$

Avec :

V<sub>max</sub>: Vitesse maximale ou activité catalytique.

K<sub>cat</sub>: Constante catalytique (temps<sup>-1</sup>).

[E]<sub>0</sub>: Concentration initiale en enzyme.

#### **4.6. Contrôle de brunissement enzymatique**

##### **4.6.1 Effet des détergents et agents chaotropiques**

L'effet des détergents ioniques (dodécylsulfate de sodium, sarkosyle, cholate de sodium et dodécylcholate de sodium), détergents non ioniques (Triton X-100, Tween 20, Tween 80 et NP-40), et des agents chaotropiques (urée et chlorhydrate de guanidine) sur l'activité des PPOs des dattes a été étudié à trois concentrations différentes (0,1 mM, 2 Mm et 5 mM) .Le catéchol et le pyrogallol ont été utilisés pour comparer la sensibilité de l'activité o-diphénolase avec celle de l'activité triphénolase, respectivement.

Pour la mesure de l'activité ,les conditions étaient comme suites : catéchol à 80mM comme substrat avec un tampon acétate (pH 5.5) pour deglet nour , (pH 5) pour Tadela (pH 5.75) pour Ghars et à 120mM comme substrat avec phosphate de sodium (pH 6) pour la variété Tantbouchet tandisque pour le pyrogallol à 100mM avec acétate (pH 4) pour deglet nour ,(pH 4.5) pour Tadela (pH 4.5) pour Ghars et à 80 mM comme substrat avec phosphate de sodium (pH 5) pour la variété Tantbouchet. Le résultat a été exprimé en pourcentage par rapport à l'extrait non traité.

##### **4.6.2 Effets des ions métalliques**

L'effet des ions métalliques (CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, KCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub> et ZnSO<sub>4</sub>) sur l'activité des PPOs des dattes a été étudiée en utilisant cinq concentrations différentes (0,1 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM et 10 mM) et deux substrats différents (catéchol et pyrogallol).

L'activité enzymatique de l'enzyme non traitée a été considérée comme 100% ,et le taux d'inhibition de chaque métal monovalent ou divalent a été exprimé en pourcentage de perte.

##### **4.6.3 Effet des inhibiteurs**

Pour contrôler le brunissement enzymatique des dattes, plusieurs inhibiteurs différents par leur structure et leur effet ont été utilisés. Les effets des sulfites (métabisulfite de sodium, métabisulfite de potassium et dioxyde de soufre) des fluorures (acide fluorosilicique, fluorosilicate de sodium et fluorure de sodium) des acides aminés (L-cystéine, arginine, acide glutamique, glycine) et les acides organiques (acide salicylique, acide ascorbique et l'acide benzoïque,) ont été étudiés à trois concentrations différentes (0,1 Mm, 2 mM et 5 mM) pour

chaque réactif en utilisant le catéchol et le pyrogallol comme substrat. Le résultat a été exprimé en pourcentage par rapport à l'extrait non traité.

#### 4.6.4 Calcul des valeurs d'IC<sub>50</sub> et analyse de type d'inhibition

Pour déterminer la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique à 50 % (IC<sub>50</sub>), l'activité catécholase et triphénolase en présence de catéchol et pyrogallol, respectivement ont été mesurées selon les conditions décrites précédemment. Seulement l'inhibiteur le plus puissant de chaque famille a été choisi. (Métabisulfite de sodium, L-Cystéine, Fluorure de sodium et acide ascorbique)

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ont été déterminées en suivant les activités enzymatiques résiduelles des PPOs en fonction des concentrations croissantes d'inhibiteur. L'acide ascorbique, L-cystéine, métabisulfite de sodium et le fluorure de sodium ont été utilisés comme inhibiteurs.

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

L'activité catécholase et l'activité triphénolase ont été mesurées dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations constantes de chaque inhibiteur contre de cinq différentes concentrations de substrat (catéchol et pyrogallol)

Les mécanismes correspondants ainsi que les valeur de K<sub>I</sub> pour chaque inhibiteur ont été déterminés.

#### 4.7 Inactivation thermique

La cinétique d'inactivation thermique des PPOs des dattes a été étudiée par incubation des tubes à hémolyse de 1cm d'épaisseur, contenant 1 ml d'extrait enzymatique dans un bain marie réglé à différentes températures : 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C. Des prélèvements de 20 µl d'extrait enzymatique ont été effectués à différents intervalles fixes de temps, refroidis et leurs activités enzymatiques résiduelles ont été mesurées. Le pourcentage de l'activité résiduelle de la PPO est calculé par rapport à l'activité initiale de l'enzyme non traité thermiquement.

##### 4.7.1 Analyse cinétique

L'inactivation thermique des PPOs de Ghars, de Tadela et de Tantbouchet a été décrite par une réaction de premier ordre :

$$\ln \frac{A}{A_0} = -Kt \quad (2)$$

où

$A_0$  : est l'activité initiale.

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

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

L'inactivation thermique a été décrite par un modèle de réaction de premier ordre pour la PPO de champignon (Cheng et al., 2013), prune (Ionita et al., 2017), et de Yangmei (Cao et al., 2017) alors que parfois le modèle biphasique est adopté comme le cas de PPO de l'ail (Fante et Noreña, 2012) et Yam blanc (Eze et al., 2010).

Pour la PPO de *Deglet nour*, la simulation a été faite par le modèle biphasique. Il est principalement attribué à l'existence de plusieurs isoenzymes de stabilité différente. (Lago and Noreña 2014):

$$A = A_S \exp(-k_S t) + A_L \exp(-k_L t) \quad (3)$$

où les activités et les constantes de vitesse d'inactivation des fractions stable (s) et labile (L) sont respectivement,  $A_S$ ;  $A_L$  and  $k_S$ ;  $k_L$ .

Les constantes de vitesse d'inactivation de la fraction thermolabile et stable ont été estimées à l'aide du modèle d'Arrhenius (Eqs. 4, 5) :

$$\ln(k_L) = \ln(k_0) + \left[ \frac{-E_{aL}}{R} \left( \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (4)$$

$$\ln(k_S) = \ln(k_0) + \left[ \frac{-E_{aS}}{R} \left( \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (5)$$

où  $T$  et  $T_0$  désignent la température expérimentale et de référence ( $^{\circ} \text{K}$ ),  $E_{aL}$  et  $E_{aS}$  sont les valeurs d'énergie d'activation des fractions thermolabiles et stables ( $\text{kJ} / \text{mol}$ ),  $R$  est la constante de gaz universelle ( $8,314 \text{ J} / \text{mol.K}$ ) et  $k$  et  $k_0$  sont les constantes de vitesse d'inactivation ( $\text{s}^{-1}$ ) à  $T$  et à  $T_0$ , respectivement.

Les paramètres cinétiques de l'inactivation thermique ( $D$ ,  $k$ ,  $t_{1/2}$  et  $Z$ ) ont été calculés en utilisant ces équations

$$D = \frac{2,303}{k} \quad (6)$$



$$\log\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = \left(-\frac{1}{D}\right) \cdot T \quad (7)$$

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln } 2}{k} \quad (8)$$

$$\text{Log}\left(\frac{D_1}{D_2}\right) = \left(\frac{T_2 - T_1}{Z_T}\right) \quad (9)$$

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

$$\ln k = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (10)$$

où A est la constante d'Arrhenius.

k est le taux d'inactivation constante à la température étudiée.

Ea est l'énergie d'activation (kJ mol<sup>-1</sup>).

R est la constante des gaz parfaits (8,314 J / mole K).

T est la température absolue (K).

#### 4.7.2 Analyse thermodynamique

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

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \frac{K \cdot h_p}{K_B \cdot T} \quad (11)$$

$$\Delta H = E_a - nRT \quad (12)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (13)$$

où  $K_B$  est la constante de Boltzmann (1.3806 .10<sup>-23</sup> m<sup>2</sup> Kg /K.s).

$H_P$  est la constante de Planck (6,6262 .10<sup>-34</sup> J s).

k est la constante de d'inactivation à la température étudiée (s<sup>-1</sup>).

#### **4.8Analyse des données cinétiques**

L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des programmes suivants : Excel® (Microsoft Excel 2014), SigmaPlot 2012 (Systat Software, Inc., Windows Version 12.0,12.0) . Toutes les analyses réalisées dans ce travail ont été effectuées en triple et les moyennes des données ont été prises en compte. L'écart-type (SD) est utilisé pour la description des barres d'erreur. Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour évaluer les différences significatives ( $P < 0,005$ ) entre les échantillons.

# **Chapitre 5.**

## **Résultats et discussion**

### 5.1. Purification des PPOs de dattes

La méthode d'extraction utilisée était maîtrisable et facile à mettre en œuvre. Pendant l'extraction des PPOs, le brunissement de l'extrait brut a été contourné avec succès en ajoutant chélateur de phénols « la polyvinyl (poly) pyrrolidone (PVPP) », au tampon d'extraction dont il est bien connu que l'oxydation des composés phénoliques par les PPO produit des quinones qui se polymérisent pour donner un pigment coloré (Sakiroglu et *al.*, 2008).

Les extraits bruts de quatre variétés des dattes (Deglet Nour, Ghars, Tadela et Tantbouchet) ont subi par la suite une purification proprement dite. Une opération séquentielle impliquant trois étapes consécutives et complémentaires. Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans les tableaux (13,14,15 et 16) pour la PPO de deglet Nour ,Ghars ,Tadela et Tantbouchet, respectivement.

Comme première étape ,une précipitation par le sulfate d'ammonium a été appliquée afin de faire précipiter les protéines et/ou les enzyme d'intérêt. Le sel est éliminé par la suite par une double dialyse à froid en tirant profit de phénomène d'osmose et ceci durant 24h avec deux changements de tampon pour assurer un bon échange. Une telle étape a conduit à un taux de purification et un rendement à la fois appréciable et était variable entre les PPOs de quatre variétés.

La précipitation au sulfate d'ammonium s'est révélée pratique et efficace pour éliminer de grandes quantités de protéines, sucres et pigments bruns non ciblés. Le taux de purification est calculé par rapport à l'activité spécifique de l'extrait brut tandis que le rendement est estimé par comparaison avec l'activité enzymatique volumique.

Pour le cas de la PPO de Deglet Nour ,un rendement de 55.38% et un taux de purification équivalent à 1.1 ont été obtenu tandis que pour le cas de PPO de Ghars ,on a eu un taux de purification équivalent à 1.48 avec un rendement de 50.25 . De même, un taux de purification équivalent à 1.26 et 1.67 avec un rendement de 55.1% et 69.5% ont été trouvés pour la PPO de Tadela et Tanbouchet, respectivement. Par la suite ,les sacs de dialyse ont subi une concentration avec l'application de PEG-6000 (polyéthylène glycol) (Naci et *al.*, 2001).

La deuxième étape de processus de purification consiste à faire passer les extraits des enzymes de quatre variétés sur une colonne d'une chromatographie échangeuse d'anion (Q-Sepharose) afin de récupérer les protéines et/ou les enzymes chargés positivement.

L'activité enzymatique a été mesurée en utilisant le catéchol comme substrat, tandis que pour le dosage des protéines et le calcul de l'activité enzymatique spécifique a été fait selon la méthode de Bradford(1976) avec de sérum albumine bovine (SAB) comme étalon. Les fractions ainsi collectées étaient comprises entre fractions (35-45), (33- 43),( 20 to 30) et (32-41), pour les PPOs de Deglet nour,de Ghars,de Tadela et de Tantbouchet ,respectivement.

Les profils d'élution de la fraction protéique ainsi que la fraction enzymatique suite à l'utilisation de la chromatographie échangeuse d'ion sont représentés dans les figures 13(a),14(a),15(a) et 16(a) pour la PPO de deglet nour,Ghars ,Tadela et Tantbouchet,respectivement.

La chromatographie échangeuse d'anion a permet de purifier la PPO de deglet nour 0,5 fois,celle de Ghars 10.08 fois,celle de Tadela 4.35 fois et celle de Tantbouchet 5.94 fois (Tableaux 15,16,17 et 18).

**Tableau 15** : Détail du Procédé de purification de PPO à partir de variété Deglet-Noor

Étapes de Purification	volume Total (ml)	Activité Totale (EU)	Protéines (mg)	Activité Spécifique (EU/mg)	Rendement (%)	Taux de Purification
Extrait brut	200	70764.13±2791.65	195.02±24.84	362.85±18.93	100±0.00*	1±0.00
Précipitation par le sulfate d'Ammonium (80%)	48	39110.40±2606.678	98.67±23.85	396.37±35.14	55.38±5.86	1.1±0.15
Q-Sepharose Big beads	4.5	3269.02±174.69	17.32±0.61	187.74±11.17	4.63±0.43	0.5±0.07
Sephacryl S-200	6	660.72±3.74	0.23±0.52	2873.12±39.56	14.72±0.66	7.92±0.67

\*Les valeurs sont exprimées en moyennes (± SD) de trois expériences parallèles

**Tableau 16** : Détail du Procédé de purification de PPO à partir de variété Ghars

Étapes de Purification	volume Total (ml)	Activité Totale (EU)	Protéines (mg)	Activité Spécifique (EU/mg)	Rendement (%)	Taux de Purification
Extrait brut	175	21644.78.±93.92	282.43±63.56	76.63±2.08	100±0.00*	1±0.00
Précipitation par le sulfate d'Ammonium (80%)	30	10864.47.±206.60	95.31±6.78	114.00±1.68	50.25±2.85	1.48±0.07
Q-Sepharose Big beads	4	1107.22.±8.72	2.12±0.34	522.27±4.06	5.11±0.93	6.81±0.31
HPLC zorbax	6	2201.81.±50.11	0.61±0.01	3574.87±117.05	10.17±0.36	46.65±4.98

\*Les valeurs sont exprimées en moyennes (± SD) de trois expériences parallèles

**Tableau 17** : Détail du Procédé de purification de PPO à partir de la variété Tadelà

Étapes de Purification	volume Total (ml)	Activité Totale (EU)	Protéines (mg)	Activité Spécifique (EU/mg)	Rendement (%)	Taux de Purification
Extrait brut	175	27778.35±1684.65	273.2±37.8	101,67±2.08	100±0.00*	1±0.00
Précipitation par le sulfate d'Ammonium (80%)	30	15310.17±848.52	119.389±5.68	128,23±1.68	55.1±5,3	1.26±0.17
Q-Sepharose "Big beads"	8	2488.78±195.16	5.62±0.17	442,84±48,21	8.95±0,05	4,35±0,32
HPLC zorbax	20	5601.50±268.02	0.69±0.02	8118.11±65.6	20.01±1,8	79,9±7,53

\*Les valeurs sont exprimées en moyennes (± SD) de trois expériences parallèles

**Tableau 18** : Détail du Procédé de purification de PPO à partir de la variété Tantbouche

Étapes de Purification	volume Total (ml)	Activité Totale (EU)	Protéines (mg)	Activité Spécifique (EU/mg)	Rendement (%)	Taux de Purification
Extrait brut	200	29781.17±268.46	316.79 ±27.53	94.01±3.80	100±0.00*	1±0.00
Précipitation par le sulfate d'Ammonium (80%)	45	20698.17±169.7	131.61±21.78	157.27±2.47	69.5±9.45	1.67±0.02
Q-Sepharose "Big beads"	10	3028.78±59.3	5.86±0.20	516.85±7.91	10.17±4.85	5.94±0.18
HPLC Zorbax	15	5781.50±43.82	1.72±0.05	3361.33±47.56	19.41±0.71	35.75±3.21

Les profils d'éluions de protéines et des PPSO ainsi obtenus sont représentés dans les figures 13(b), 14(b), 15(b) et 16(b) pour la PPO de deglet nour, Ghars, Tadela et Tantbouchet, respectivement.

Après cette dernière étape, les PPOs de Deglet nour, de Ghars, Tadela et Tantbouchet ont été purifiées à 7.92., 46.6., 79.9 et 35.75 fois, respectivement avec un rendement équivalent à 14.72%, 10.17%, 20.01% et 19.41% en gardant le même ordre.

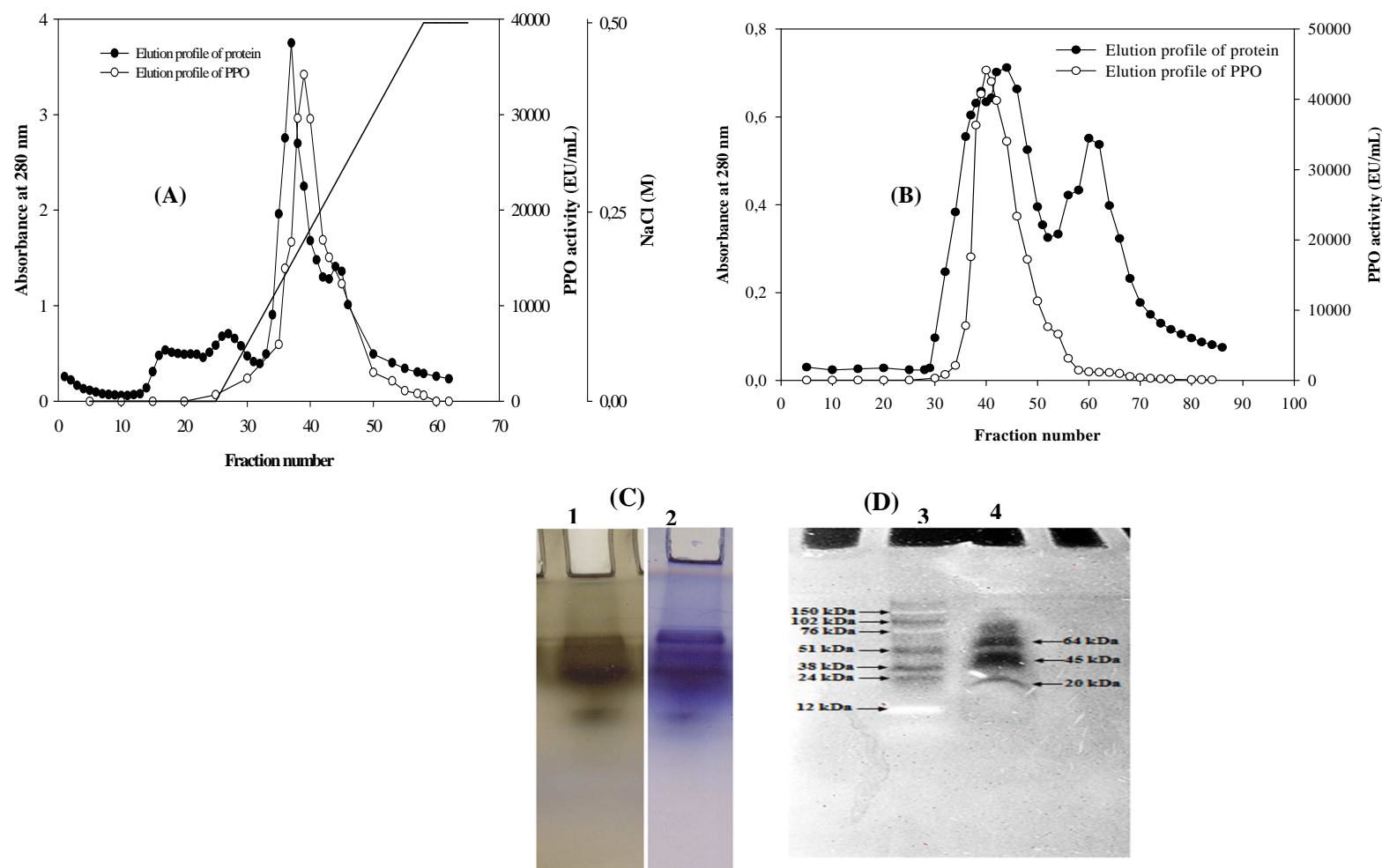
En analysant les résultats de l'électrophorèse en condition native, nous avons obtenus des bandes très fines et claires correspondantes à l'activité de l'enzyme pure. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 13(c), 14(c), 15(c) et 16(c).

De même, un poids moléculaire équivalent de 30,67 et 90kDa ont été estimés pour la PPO de Ghars, Tantbouchet et Tadela, respectivement avec une bande caractéristique et unique pour chacune. (figures 13(d), 14(d), 15(d) et 16(d)).

Dans le cas de la PPO de Deglet nour, trois bandes ont été observés, de poids moléculaire 20, 45 et 64 kDa confirmant l'existence de trois formes PPO résultant entre autres de la protéolyse ou de l'existence d'isoenzymes. La présence des isoenzymes a été aussi signalé par Batista et al. (2014) pour la PPO de Lobéira dont ils ont rapporté deux valeurs de poids moléculaires (47kDa et 68kDa) et par Teng et al. (2017) pour la PPO des feuilles de thé dont ils ont remarqué la présence de deux isoformes avec des poids moléculaires équivalents à 42 et 85kDa. Cheema et Sommerhalter. (2015) à leur tour ont rapporté aussi l'existence de trois isoforms pour la PPO de mangue (53, 112 et 144kDa).

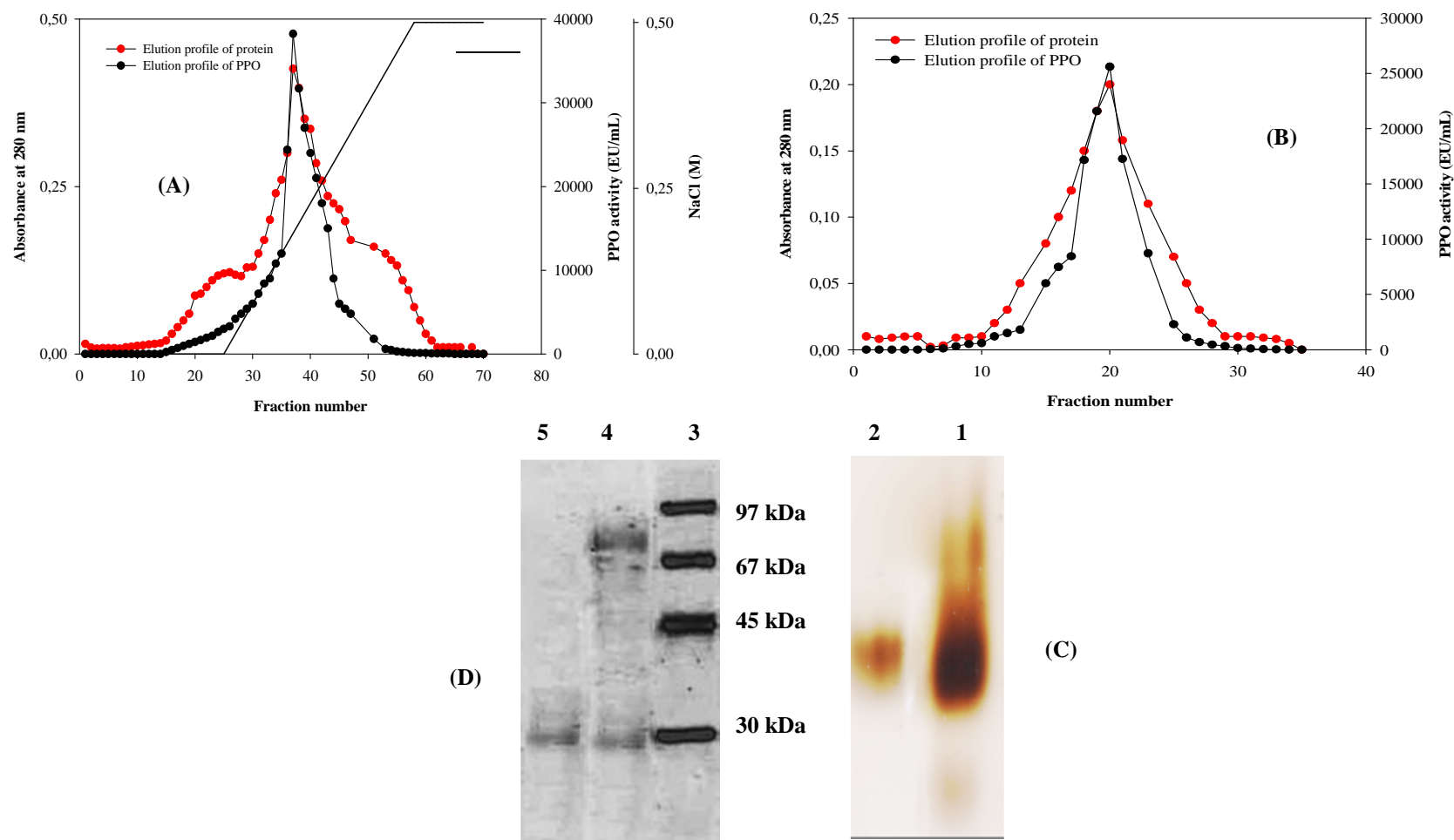
Ces données renforcent les conclusions d'autres équipes indiquant que le poids moléculaire de la PPO varie de 30 à 144 kDa.

Une valeur de 44 kDa pour la PPO de poire (Zhou et al., 2018), 63kDa pour la PPO Abricot (Derardja et al. 2017), 64 kDa pour la PPO de lactaire (Tsivinska et al., 2015), 65kDa pour la PPO de prunes (Ioniță, et al., 2017; Carvalho et Orlanda., 2017), 67.3kDa pour la PPO de pomme Fuji (Liu et al., 2015a), une valeur de 80,6kDa pour la PPO de Bourrache (Alici et Arabaci., 2016) 44 kDa pour la PPO de poire (Zhou et al., 2018), 31, 32.5 et 38 kDa pour les PPO de Groseillier à maquereau (Bravo et Osorio., 2016), châtaigne (Gong et al., 2015) et salake (Zaini et al., 2013), respectivement. 80,6 et 81kDa pour les PPO de Bourrache (Alici and Arabaci, 2016; Liu et al., 2015). La plus grande valeur de poids moléculaire a été rapporté pour l'une des trois isoformes de la PPO de mangue Attaulfo (144kDa) (Cheema et Sommerhalter., 2015).

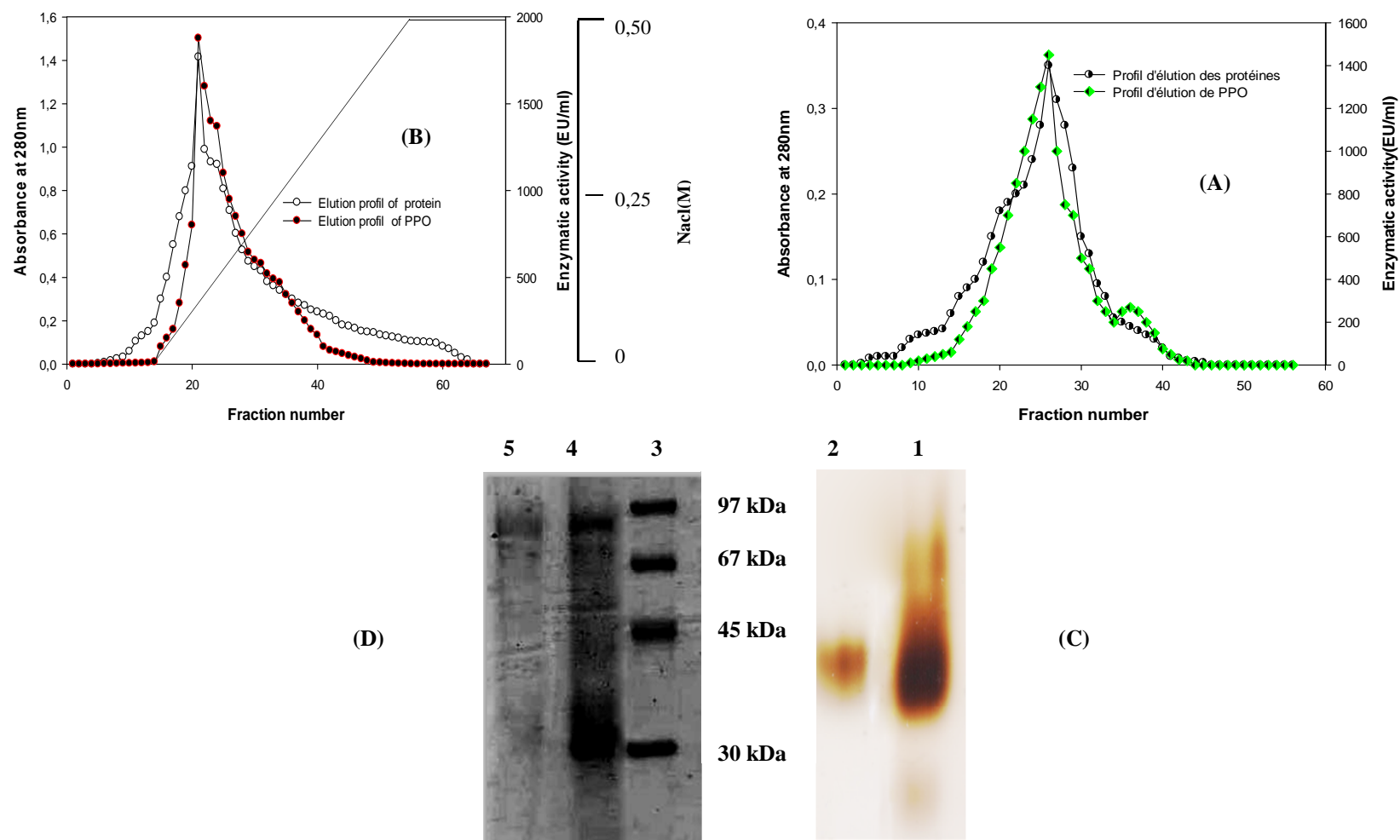


**Fig 13** :Résultats de purification de Ghars PPO (A) Séparation sur chromatographie d'échange d'anions Q-Sepharose Big beads. (B) Chromatographie par filtration sur gel S-200. (C) pistes 1 et 2 :PAGE-native au bleu de coomassie et avec pyrcatéchol de l'enzyme Pure ; (D) SDS-PAGE :piste 3- marqueur de poids moléculaire de la protéine ,piste 4 :Les trois isoformes de PPO de Deglet noir.

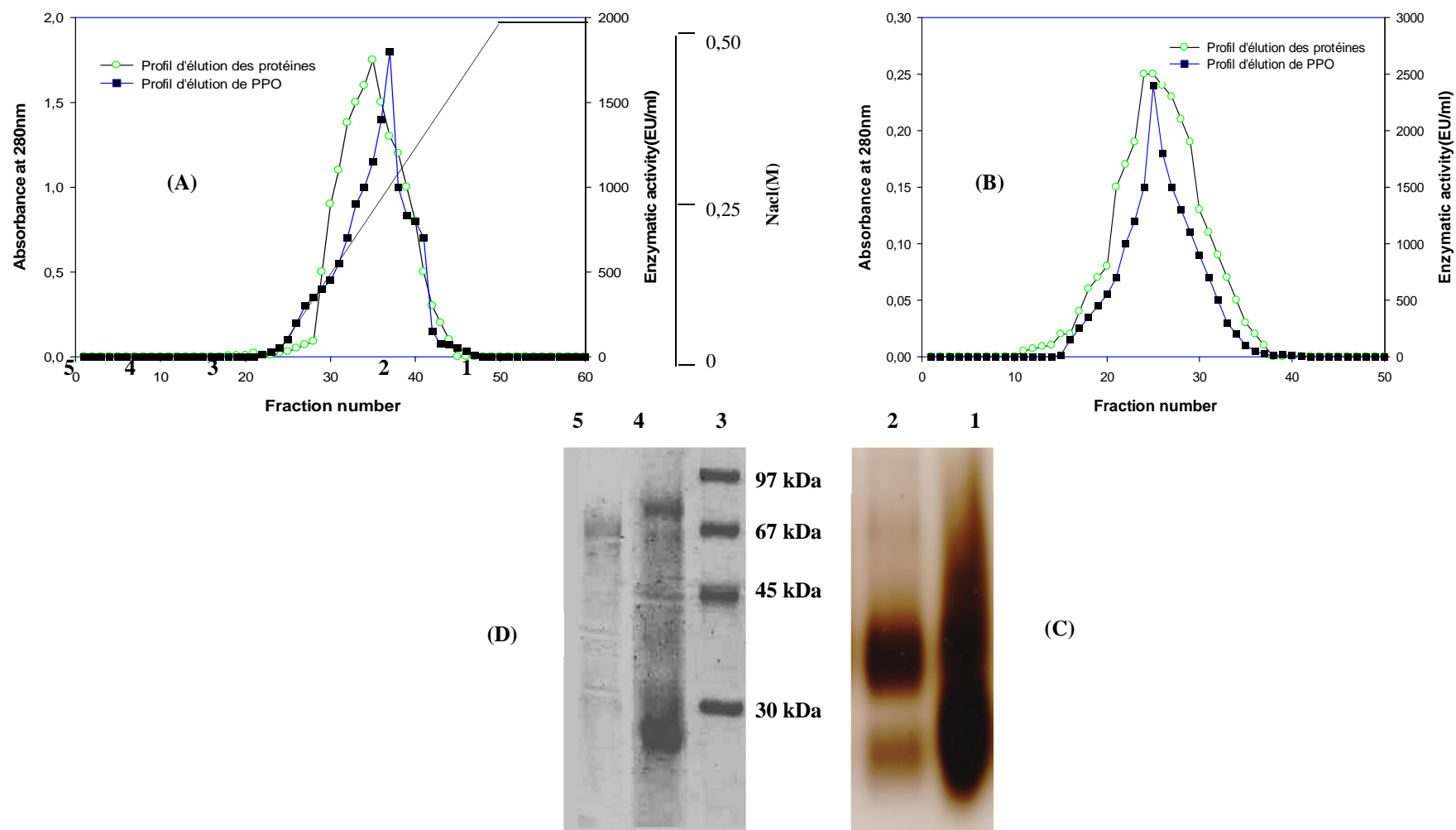




**Fig 14:** Résultats de purification de Ghars PPO (A) Séparation sur chromatographie d'échange d'anions Q-Sepharose Big beads. (B) Chromatographie par filtration sur gel Zorbax HPLC. (C) pistes 1 et 2 :PAGE-native de l'extrait brut et pure de Ghars PPO; SDS-PAGE :piste 3- marqueur de poids moléculaire de la protéine ,piste 4 et 5 l'extrait brut et pure de Ghars PPO.



**Fig 15:** Résultats de purification de Tadela PPO (A) Séparation sur chromatographie d'échange d'anions Q-Sepharose Big beads. (B) Chromatographie par filtration sur gel Zorbax HPLC. (C) pistes 1 et 2 :PAGE-native de l'extrait brut et pure de Tadela PPO; D) SDS-PAGE :piste 3- marqueur de poids moléculaire de la protéine ,piste 4 et 5 l'extrait brut et pure de Tadela PPO

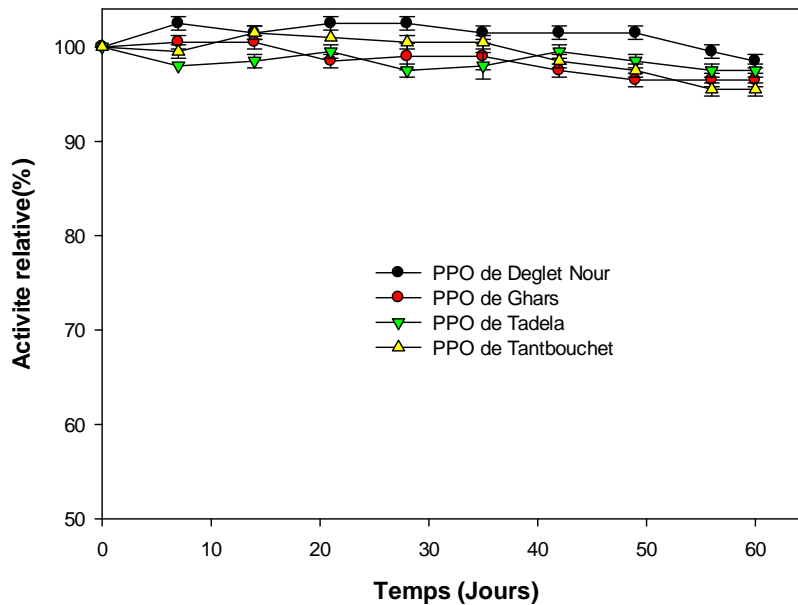


**Fig 16** :Résultats de purification de Tantbouchet PPO (A) Séparation sur chromatographie d'échange d'anions Q-Sepharose Big beads. (B) Chromatographie par filtration sur gel Zorbax HPLC. (C) pistes 1 et 2 :PAGE-native de l'extrait brut et pure de Tantbouchet PPO ; D) SDS-PAGE :piste 3- marqueur de poids moléculaire de la protéine ,piste 4 et 5 l'extrait brut et pure de Tantbouchet PPO.

## 5.2. Effet de stockage

Durant la durée de la réalisation des différentes expériences dans cette thèse, les enzymes ont été conservées à 4°C pendant une longue durée. Un suivi d'activité enzymatique des PPOs des dattes durant une telle durée de conservation semble être nécessaire pour prévenir la présence ou non d'un effet de stockage affectant l'efficacité des enzymes. Un contrôle périodique hebdomadaire a eu lieu durant 8 semaines en utilisant le catéchol comme substrat. Les résultats ainsi obtenus sont représentés dans la figure 17.

Nous remarquons que l'activité enzymatique des PPOs des dattes demeure stable tout au long de la période de stockage avec une diminution non significative au-delà de 7 semaines. L'activité enzymatique relative a été exprimée en pourcentage par rapport à l'activité de l'enzyme non traitée.



**Fig 17 :** Stabilité de l'activité enzymatique des PPOs des dattes à -4°C durant 8 semaines en présence de catéchol comme substrat.

Une telle stabilité des PPOs durant une longue durée à des températures basses a été aussi rapportée pour d'autres variétés.

Derardja et *al* (2017) ont rapporté la stabilité de l'activité enzymatique de PPO d'abricot à 4°C durant quatre semaines avec une diminution négligeable équivalente à 10% à la fin de la durée indiquée.

Simões et *al.* (2015) à leur tour ont étudié la stabilité de PPO de feuilles de chou pendant un stockage de 15 jours à 5°C et de 9 jours à 10°C. Ils ont observé qu'une conserva-

tion de feuilles de chou à une basse température permet de prévenir le phénomène de bruissement enzymatique en inhibant l'activité enzymatique de PPO et en retardant le métabolisme phénolique, de même quand l'enzyme elle-même a été stockée dans les mêmes conditions, sa stabilité était maintenue et aucune diminution n'a été rapportée.

La source de la PPO, la structure de l'enzyme, les constituants présents dans l'extrait des enzymes et la température de stockage choisie peuvent être à l'origine de cette différence de stabilité de l'activité enzymatique (Simões et al., 2015)

D'une manière générale, la PPO est stable à des températures basses (Simões et al., 2015 ; Derardja et al., 2017).

### 5.3. Caractérisation des PPOs des dattes

#### 5.3.1 pH optimum et stabilité de pH

L'influence du pH et sa stabilité sur les PPOs des dattes a été étudiée en utilisant le catéchol, pyrogallol et 4-méthylcatéchol comme substrats dans un intervalle de pH compris entre 2 et 10. Les résultats ainsi obtenus sont représentés dans les figures 18, 19, 20 et 21 pour la PPO de Deglet Nour, Ghars, Tadela et Tantbouchet, respectivement.

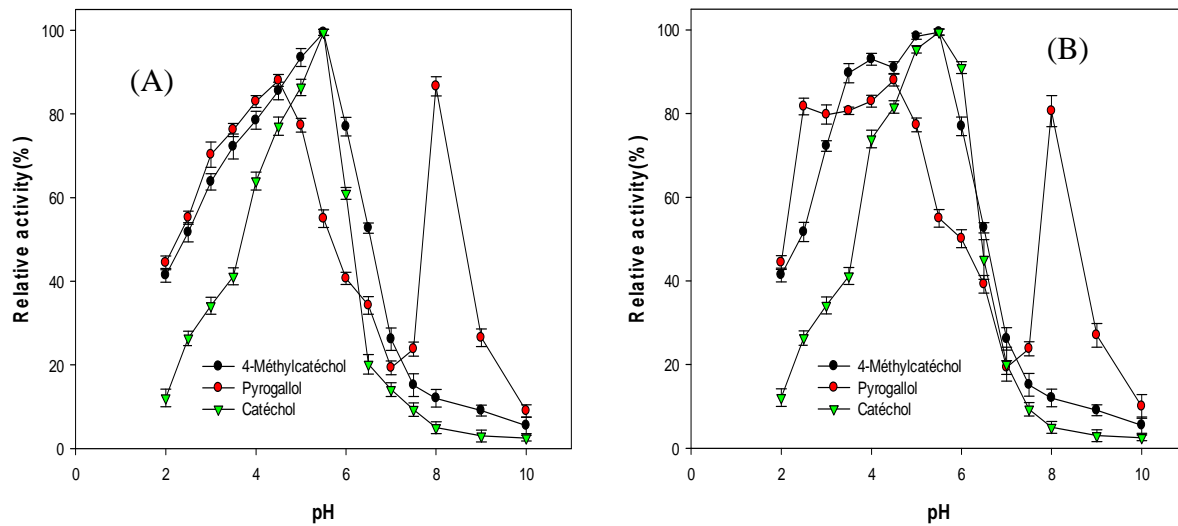


Fig 18 : Influence de pH (A) et stabilité de pH(B) sur la PPO de Deglet Nour

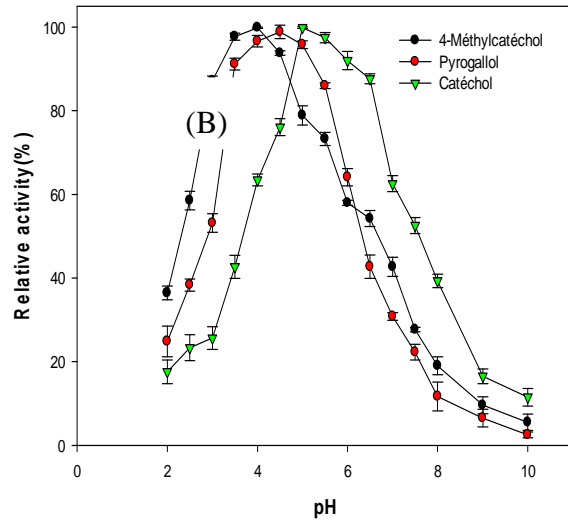
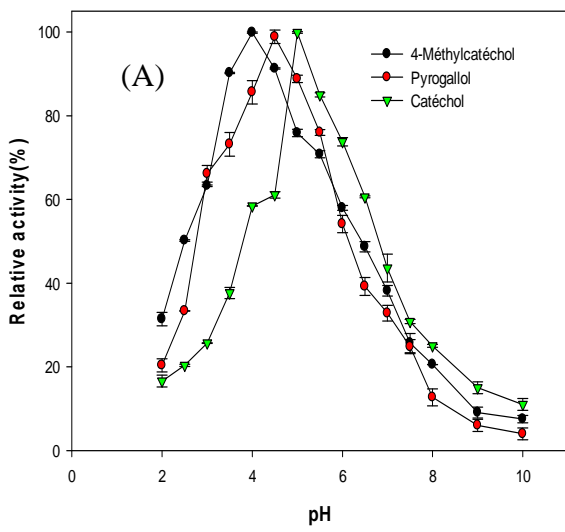


Fig 19 :Influence de pH (A) et stabilité de pH(B) sur la PPO de Ghars

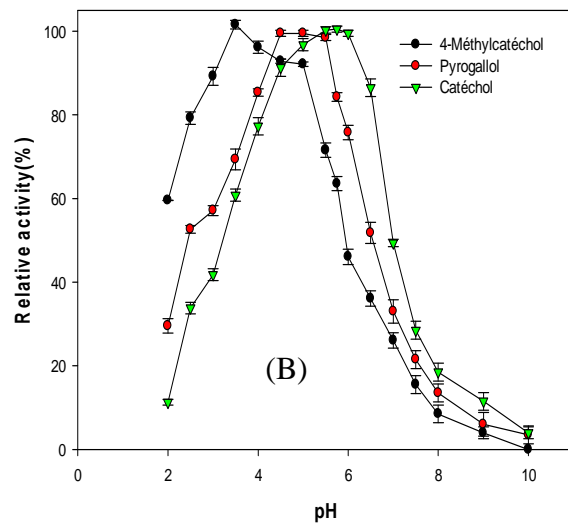
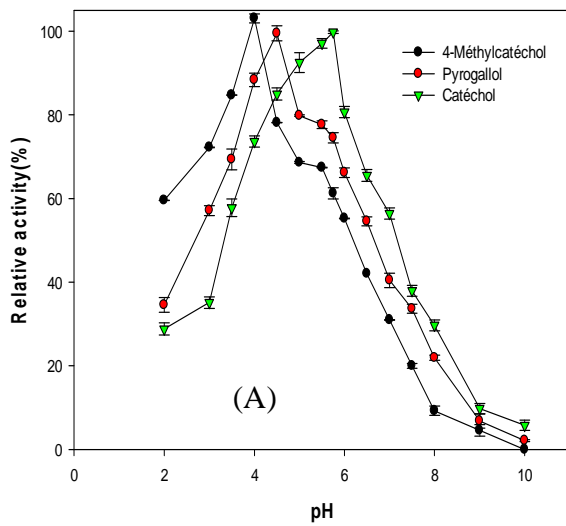
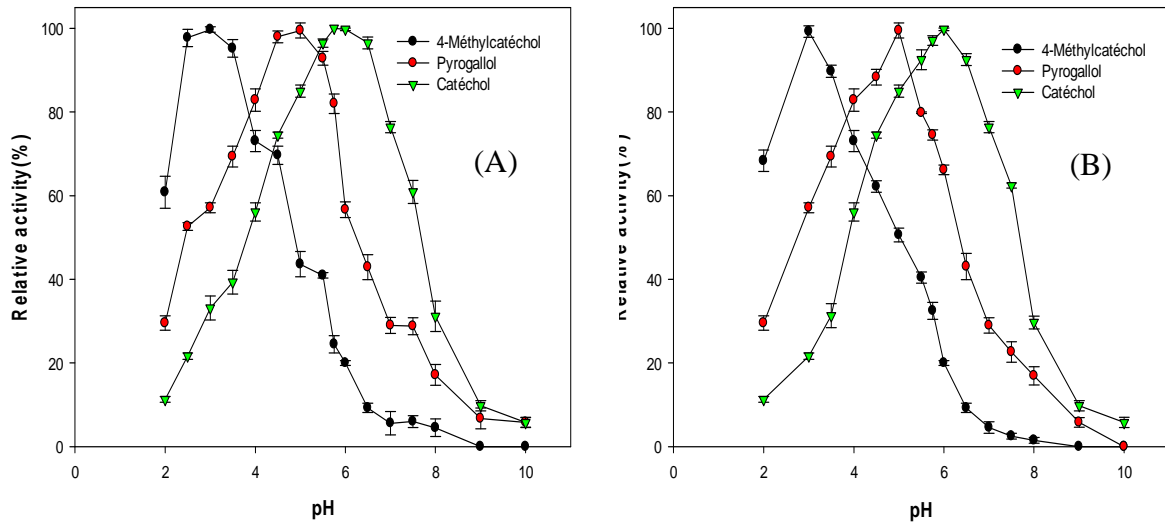


Fig 20 :Influence de pH (A) et stabilité de pH(B) sur la PPO de Tadela



**Fig 21** :Influence de pH (A) et stabilité de pH(B) sur la PPO de Tantbouchet

D’après ces courbes, on constate que quel que soit le substrat utilisé, les courbes de pH pour les enzymes des dattes présentent des profils en cloche. Les valeurs de pH optimum observés ainsi que l’intervalle de stabilité de pH correspondant à l’activité maximale semblent être similaire avec une légère variation .Une récapitulation des résultats est donnée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 19** :Valeurs de pH optimum et stabilité de pH pour les PPOs des dattes

Source \ Substrat	Catéchol		4-méthylcatéchol		Pyrogallol	
	pH	Stabilité de pH	pH	Stabilité de pH	pH	Stabilité de pH
Deglet Nour	5.5	4.5-6	5.5	3-5.5	4 et 7	2.5-4
Ghars	5	5-6.5	4	3-4.5	4.5	3.5-5.5
Tadela	5.75	5-6	4	3-5	4.5	4-5.5
Tantbouchet	6	5.5-6.5	3	2.5-3.5	5	4.5-5.5

Ces résultats sont en accord avec un pH optimal compris entre 4,5 et 6,5 pour les dattes américaines Deglet-Noor (Hasegawa et Maier, 1980) et 6,0 et 6,1 pour les dattes irakiennes (Bahree et Zahdi) (Sachde *et al.*, 1989).

Le pH est un paramètre très important pour la stabilité de l'enzyme. L'efficacité catalytique de l'enzyme est liée à son aptitude à oxyder le substrat. Une telle affinité entre complexe enzyme-substrat est assurée par la liaison du substrat sur son site actif.

L'état d'ionisation des acides aminés dans le site actif affecte à la fois la force de liaison et l'affinité. L'effet du pH réside dans le changement de cet état d'ionisation en présence d'un groupe fonctionnel (CH<sub>3</sub> en position méta pour 4 méthylcatéchol et OH en position ortho pour le pyrogallol) (Lemos *et al.*, 2000).

Généralement, le pH optimum de la PPO dans les fruits et légumes varie en fonction du substrat utilisé et de la source d'enzyme. Les valeurs optimum du pH pour la PPO de bourrache étaient respectivement de pH 7,5, pH 7,5, pH 5,5 et pH 5, en utilisant respectivement le catéchol, le pyrogallol, l'acide caféique et le 4-méthylcatéchol (Alici et Arabaci, 2016). Alors que Bravo et Osorio (2016) ont trouvé des valeurs de pH 5,5 et pH 4 en utilisant du catéchol et du 4-méthylcatéchol comme substrats.

Une faible activité a été obtenue à un pH inférieur à pH 2 ou supérieur à 8. Une diminution d'activité similaire a été rapportée pour les PPO d'abricot (Derardja *et al.*, 2017) et les PPO de poire (Zhou *et al.*, 2018).

La valeur de pH optimum pour l'activité de la PPO diffère entre les fruits. En outre, on constate également que les PPOs obtenues à partir de diverses sources ont des valeurs de pH différentes. Le pH optimum est pH 5,5 et 7,0 pour la PPO de banane d'Anamur (*Musa cavendishii*) (Ünal., 2007), 7,0 pour le mamey (*Pouteria sapota*) (Palma-Orozco *et al.*, 2011), le mûrier (*Morus alba L.*) (Arslan *et al.*, 2004), le marula (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*) (Mdluli., 2005) et le cerisier de la Barbade (*Malpighia glabra L.*) (Kumar *et al.*, 2008), 6,5 pour la PPO de fruit de la couleuvre (*Salacca zalacca (Gaertn.) Voss*) (Zaini *et al.*, 2013), 3,4 pour le raisin Sultaniye (*Vitis vinifera L. cv. Sultana*) (Ünal *et al.*, 2007), 5,5 pour le raisin muscadinne Noble (Lamikanra *et al.*, 1992), 5,0 pour le raisin Victoria (*Vitis vinifera ssp. Sativa*) (Rapeanu *et al.*, 2006), 8,5 chez le chien rose (Sakiroglu *et al.*, 1996), 6,0 chez le poirier sauvage (*Pyrus elaeagnifolia*) (Ülker *et al.*, 2008) et le caltrop (*Trapa Acornis Nakano*) (Zhu et Zhan, 2010) en utilisant le catéchol comme substrat.

Tandis qu'en utilisant le pyrogallol, des valeurs de pH équivalent à 7,0 pour le caltrop (*Trapa Acornis Nakano*) (Zhu et Zhan, 2010) et Chien rose (Sakiroglu *et al.*, 1996), 8,0



pour la cerise de la Barbade (*Malpighia glabra* L.) (Kumar et al., 2008), 7,5 pour le mûrier (*Morus alba* L.) (Arslan et al., 2004) et 8,6 pour la pomme Amasya (Oktay et al., 1995).

En outre, des valeurs de pH 6,5 pour les fruits médullaires (*Mespilus germanica* L., Rosaceae) (Dincer et al., 2002) et les longanes (*Dimocarpus longan* Lour.) (Yue-Ming, 1999), 8,5 pour chien rose (Sakiroglu et al., 1996), 5,0 pour le mûrier (*Morus alba* L.) (Arslan et al., 2004), 3,5-5,0 pour le raisin Monastrell (*Vitis vinifera* L. cv Monastrell) (Sánchez-Ferrer et al., 1988) et 7,0 pour la cerise de la Barbade (*Malpighia glabra* L.) (Kumar et al., 2008) ont été rapportées en utilisant le 4-méthylcatéchol comme substrat.

La stabilité du pH des PPOs des dattes a montré un comportement similaire et de même ordre à celui du changement de pH avec une légère diminution de l'activité. Les PPOs des dattes semblent être plus stables dans le domaine acide que le domaine alcalin. Nous avons remarqué que la diminution de l'activité enzymatique est accélérée au-delà de la valeur de pH 7 alors que ce n'est pas le même comportement cinétique aux valeurs de pH acides (<6). Cependant, lors de suivi de l'oxydation de pyrogallol par la PPO de deglet Nour, deux valeurs de pH optimum apparents avec une activité plus élevée à pH neutre (pH 8,0) qu'à pH acide (pH 5,6) a été obtenu. Ce résultat peut s'expliquer par la présence des isoenzymes confirmée par les résultats de SDS-PAGE.

L'activité des enzymes des dattes dans le domaine acide laisse suggérer que la localisation subcellulaire des PPOs des dattes peut avoir lieu dans des environnements acides, tels que la vacuole (Deepa et Arumughan, 2002).

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Ionita et al. (2017) qui ont étudié la stabilité du pH de PPO à partir de prunes. À pH 7,0, pH 7,5 et pH 8,0, les PPO de prune ont perdu 49%, 61% et 73% de leur activité, respectivement, alors que dans une gamme de pH acide (pH 4,0, 4,5 et 5,0) l'enzyme n'a perdu que 32%, 33% et 38%, respectivement.

En général, la plupart des plantes, légumes et fruits ont montré une activité maximale à des pH neutres ou proches de ceux-ci, mais ces valeurs peuvent varier avec la source d'enzyme et de substrat dans une plage relativement large de pH. Bien que, dans la plupart des cas, le pH optimum ait été trouvé entre 4,0 et 8,5.

Il convient de noter que le pH optimum peut également être affecté par les propriétés génétiques (variété et/ou cultivar), la température, les méthodes d'extraction, le type de tampon, la pureté de l'enzyme et la localisation de l'enzyme dans la cellule végétale (Whitaker, 1994 ; Kumar et al., 2008; Erat et al., 2010)

### 4.3.2 Effet de la température et stabilité thermique

L'effet de la température sur les PPOs des dattes a été étudié en utilisant le catéchol, pyrogallol et 4-méthylcatéchol comme substrats dans un intervalle de température compris entre 10°C et 90° tandis que l'étude de stabilité thermique des PPOs des dattes en utilisant ces mêmes substrats a été aussi rapporté en tenant 10min comme temps d'incubation au bain marée.

Les résultats qui en découlent sont montrées dans les figures 22,23,24 et 25 pour les PPOs de Deglet Nour ,Ghars,Tadela et Tantbouchet respectivement.

Comme pour la plupart des réactions enzymatiques, la vitesse des réactions catalysées par la PPO augmente en général avec la température. Cependant, quand la température s'élève au-dessus de 50 à 60°C, l'activité catalytique enzymatique diminue .Ce phénomène résulte de deux effets opposés :

- (a) de l'effet thermique activateur dont une augmentation exponentielle de la vitesse de la réaction avec la température, et
- (b) de l'effet thermique dénaturant de la structure de la protéine aux températures plus élevées.(Voet.,2011)

Les valeurs de températures optimales obtenues ainsi que l'intervalle de stabilité de température avec lesquelles l'enzyme semble être à son optimum peuvent être différentes d'un substrat à un autre pour la même enzyme et d'une enzyme à une autre pour le même substrat ..Une récapitulation des résultats est donnée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 20** : Valeurs de température optimale et stabilité thermique pour les PPOs des dattes

Source \ Substrat	Catéchol		4-méthylcatéchol		Pyrogallol	
	T (°C)	Stabilité de T (°C)	T (°C)	Stabilité de T (°C)	T (°C)	Stabilité de T (°C)
Deglet Nour	35	30-60	35	30-50	40	30-50
Ghars	30	30-60	30	30-60	30	30-60
Tadela	40	30-60	35	30-55	30	30-55
Tantbouchet	40	30-60	35	30-45	30	30-45

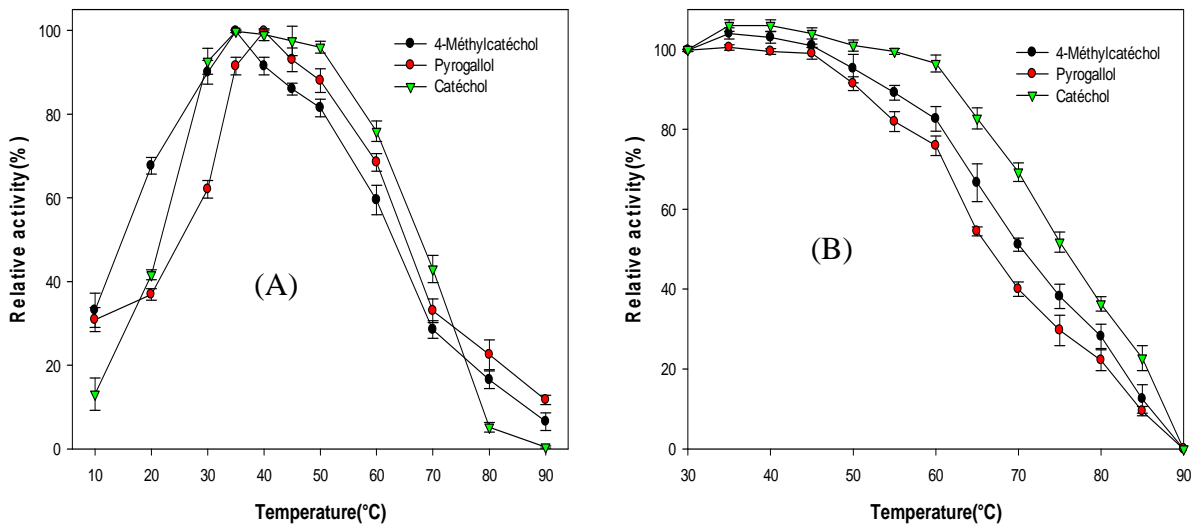


Fig 22 :Influence de température (A) et stabilité thermique (B) sur la PPO de Deglet Nour

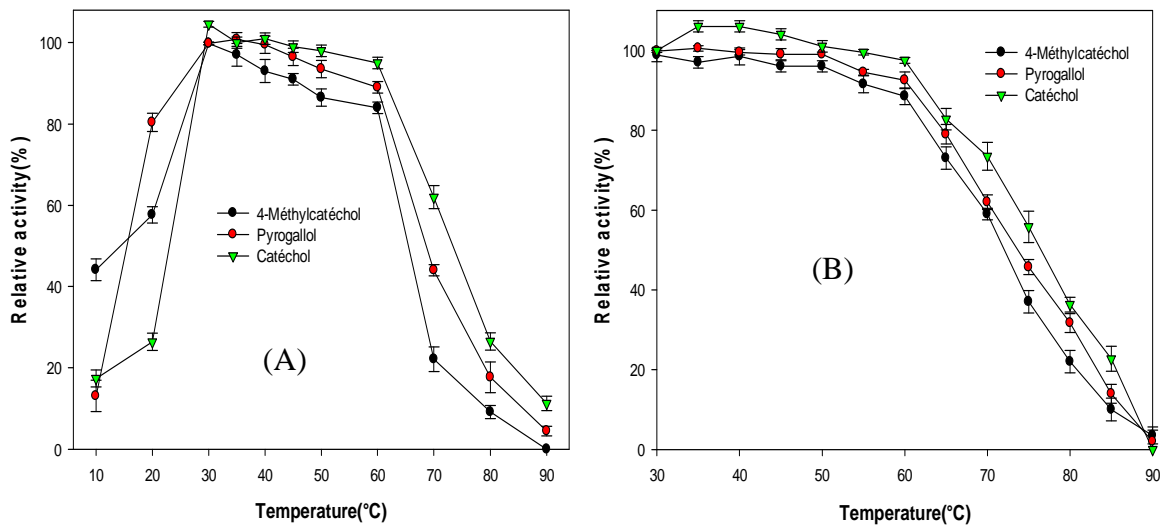


Fig 23 :Influence de température (A) et stabilité thermique (B) sur la PPO de Ghars

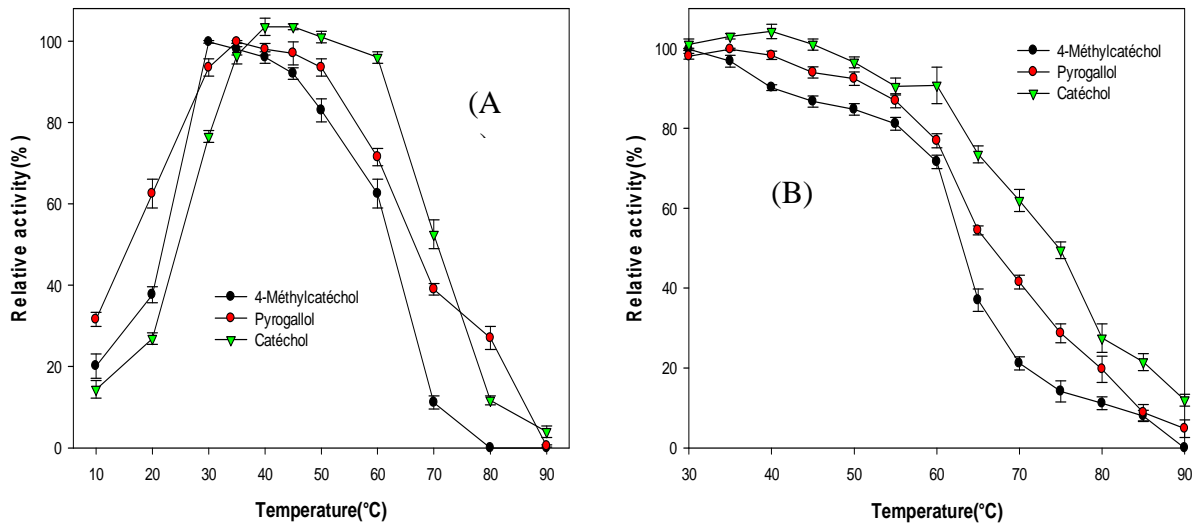


Fig 24 :Influence de température (A) et stabilité thermique (B) sur la PPO de Tadela

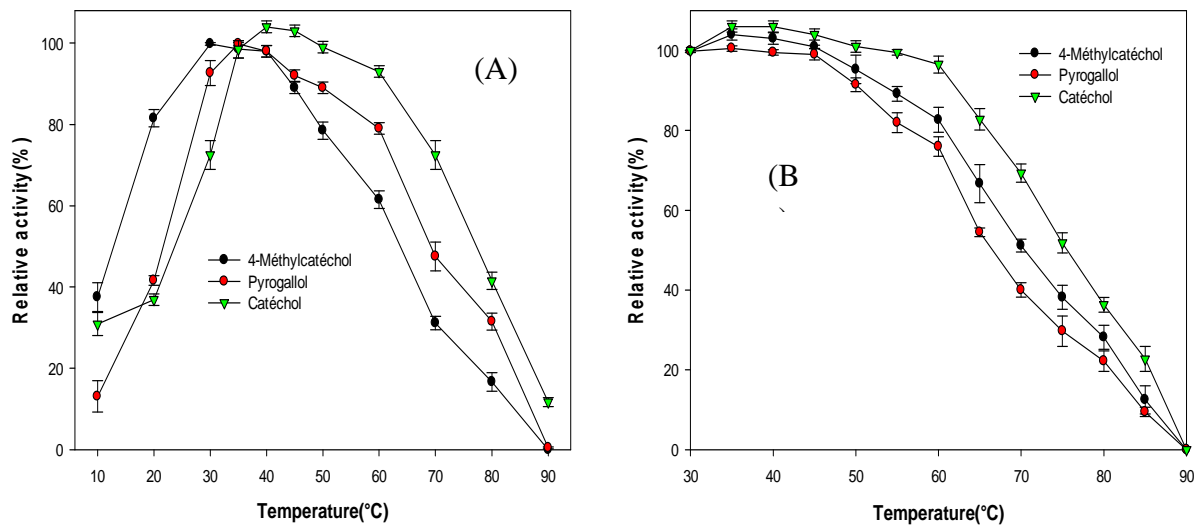


Fig 25 :Influence de température (A) et stabilité thermique (B) sur la PPO de Tantbouchet

Les PPOs des dattes présentent des températures optimales proches de la température ambiante, de même elles ont révélées une stabilité appréciable vis-à-vis l'augmentation de température avec un intervalle plus ou moins large (30-55 ou 60°C). Au-delà de 70°C, une diminution drastique a eu lieu pour les quatre enzymes jusqu'à une perte presque totale à 90°C. L'étude de la stabilité thermique semble être plus intéressante que l'étude de la température optimale en raison de l'importance de la stabilité enzymatique à la température de mesure et durant le temps de réaction. Afin de pouvoir suivre la cinétique sans risque de perdre l'activité enzymatique. Nous en avons déduit que la stabilité enzymatique est inversement proportionnelle à l'augmentation de la température. Différents taux de stabilité ont été observés pour les trois substrats utilisés. Les PPOs des dattes semblent être plus thermostable en utilisant le catéchol comme substrat.

En général, les valeurs des températures optimales des polyphénol-oxydases des fruits et légumes sont comprises entre 20 et 60 ° C. Alici et Arabaci (2016) ont indiqué les valeurs température optimales suivantes: 10 °C, 30 °C, 20 °C et 5 °C en utilisant respectivement du catéchol, du pyrogallol, de l'acide caféique et du 4-méthylcatéchol.

Bravo et Osorio (2016) à leur tour ont étudié l'effet de la température sur la PPO de groseille du Cap en utilisant plusieurs substrats. Ils ont trouvé une température optimale de 40 ° C en utilisant du catéchol et 25 ° C avec du 4-méthylcatéchol.

De plus, nos données sont similaires à ceux rapportés pour l'activité de la PPO extraite du litchi (*Litchi chinensis* Sonn. Cv. Maurice) (Jiang et al., 1997) et de la sève de mangue (*Mangifera indica* L.) (John et al., 2011) avec une stabilité jusqu'au 70°C. mais différent de ceux obtenus par Belarbi et al. (2003) qui ont suggéré que la PPO extraite de la datte algérienne Deglet-Noor était très thermolabile. Ces auteurs ont constaté que la PPO perd 50 et 66% de son activité initiale après 10 min de traitement thermique à 55 et 70 ° C, respectivement. Cela pourrait s'expliquer par le fait que nous avons utilisé un cultivar différent et / ou des méthodes d'extraction différentes.

Hasegawa et Maier (1980) ont rapporté que la PPO des dattes américaines Deglet-Noor a pu conserver son activité initiale lorsqu'elle était maintenue pendant 10 min à 60° C, mais qu'elle était complètement inactivée après une incubation de 10 min à 80 ° C. Le traitement à 67 ° C a provoqué une perte d'activité de 50%, en utilisant l'acide chlorhydrique comme substrat. Sachde et al. (1989) ont constaté que les PPO de dattes de Bahree et de Zahdi (*Phoenix dactylifera* L.) en Irak conservaient leur activité initiale lorsqu'elles étaient maintenues pendant 10 min à 35 ° C, mais qu'elles étaient complètement inactivées après 10 min à 70 ° C.

### 3.3Spécificité de substrat

L'étude de spécificité du substrat est importante pour avoir une idée de la capacité de l'enzyme à oxyder les substrats monphénoliques, o-diphénoliques et triphénoliques ainsi pour l'appréciation de ses affinités pour chaque substrat.

La spécificité de des PPOs des dattes vis-à-vis de différent substrats monophénoliques (phénol, L-tyrosine et crésol),o-diphénoliques (dopamine, catéchol et 4-méthylcatéchol), et triphénoliques. (pyrogallol, acide chlorogénique et acide gallique) a été étudié .Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 21 :Spécificité des PPOs des dattes vis à vis de certains substrats

Substrat	Longueur d'onde	Activité relative(%)				
		Deglet Nour	Ghars	Tadela	Tantbouchet	
<i>Monophenols</i>						
L-Tyrosine	475	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	
Phenol	390	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	
Cresol	485	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	
<i>O-Diphenols</i>						
Pyrocatechol	410	100±2.24	100±3.52	100±2,59	100± 4.51	
4-Methylcatechol	400	104.30±1.35	61.33±1.45	90,73±3,26	87.13±2.10	
<i>Dopamine</i>	395	33,15±1.08	22,46±12.01	55,49±1,33	60,95±3.05	
<i>Triphenols</i>						
Pyrogallol	475	18.66±0.67	65,85±3.67	83,21±3,55	70.22±1.19	
<i>Acide chlorogénique</i>	481	5.17±1.15	48,32±1.77	67,58±2,17	65.86±0.93	
<i>acide Gallique</i>	420	0±0,00	0±0,00	31,43±1,01	45.33±1.25	

L'activité enzymatique en présence de chaque substrat est exprimée en pourcentage par rapport à l'oxydation du catéchol. D'après le tableau 19, Nous remarquons que les PPOs des dattes sont capables d'oxyder les substrat o-diphénolique et triphénolique. Cependant, aucune activité monophénolase oxydase n' a été détectée. Une forte activité a été vérifiée en présence de catéchol et est considérée comme 100% L'absence d'activité tyrosinase a été également signalée pour la PPO de bourrache (Alici et Arabaci, 2016) et la PPO d'abricot ( Derardja et *al.*, 2017). De plus, l'oxydation des substrats o-diphénoliques par les PPOs des dattes semble être meilleure que celle des substrats triphénoliques.

De même, nous constatons que les PPOs des dattes se comporte différemment avec les substrats testés dont un taux d'oxydation différent a été observé pour le même substrat .

Une oxydation plus ou moins forte de l'acide gallique par la PPO de Tantbouchet et Tadela a été observé tandis qu'une absence d'activité a été trouvée pour la PPO de Deglet nour et celle de Ghars. Les PPOs de Tadela et Tantbouchet semblent avoir une meilleure oxydation de différents substrats testés par rapport à celle de Deglet Nour et de Ghars.

### **3.4 Efficacité et affinité (Paramètres cinétiques $K_m$ et $V_{max}$ )**

Pour déterminer les paramètres cinétiques des PPOs de quatre variétés des dattes les vitesses initiales ont été mesurées à différentes concentrations de catéchol et 4-méthylcatéchol (activité catécholase), et de pyrogallol (activité triphénolase). Nos résultats expérimentaux ont été estimés à l'aide de représentations de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk.

L'évolution de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de ces trois substrats est représentée dans les figures (26,27,28 et 29) pour la PPO de Deglet Nour, Ghars, Tadela et Tantbouchet, respectivement.

Nous remarquons que les représentations graphiques donnent des courbes d'allure hyperbolique, ce qui signifie que les quatre enzymes suivent une cinétique michalienne typique.

La valeur de  $K_m$  est la constante de Michaelis. Elle définit l'affinité et la force de liaison de l'enzyme pour son substrat. Une enzyme à valeur de  $K_m$  élevée a une faible affinité pour son substrat et vice versa. De même, la valeur de  $V_{max}$  est un autre paramètre permettant d'avoir une idée sur la vitesse de la réaction. D'autres part, le calcul de rapport  $V_{max}/K_m$  permet d'évaluer l'efficacité catalytique de l'enzyme vis à vis d'un substrat bien déterminé.

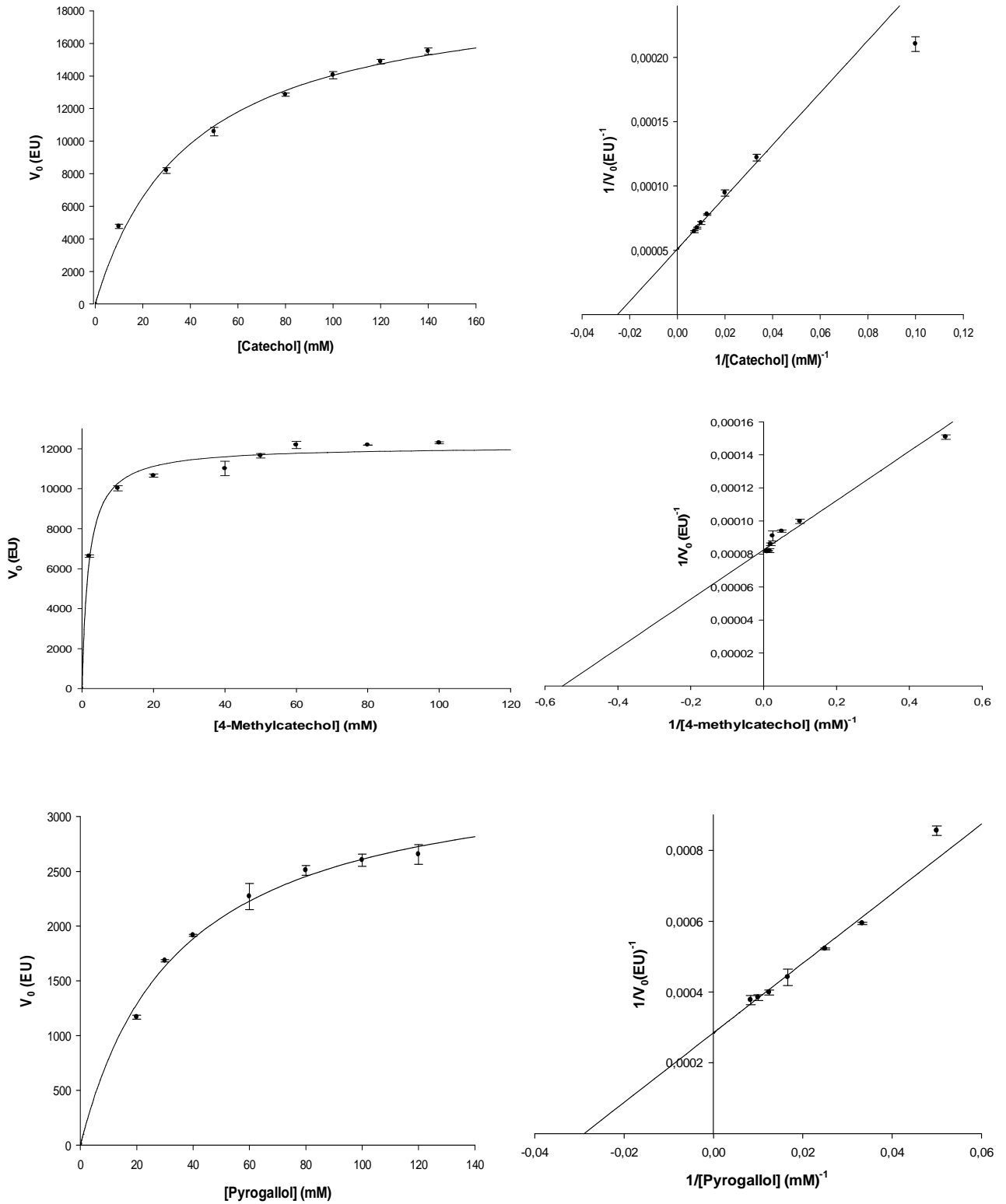


Fig 26 : Les graphiques de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk pour la PPO de Deglet Nour



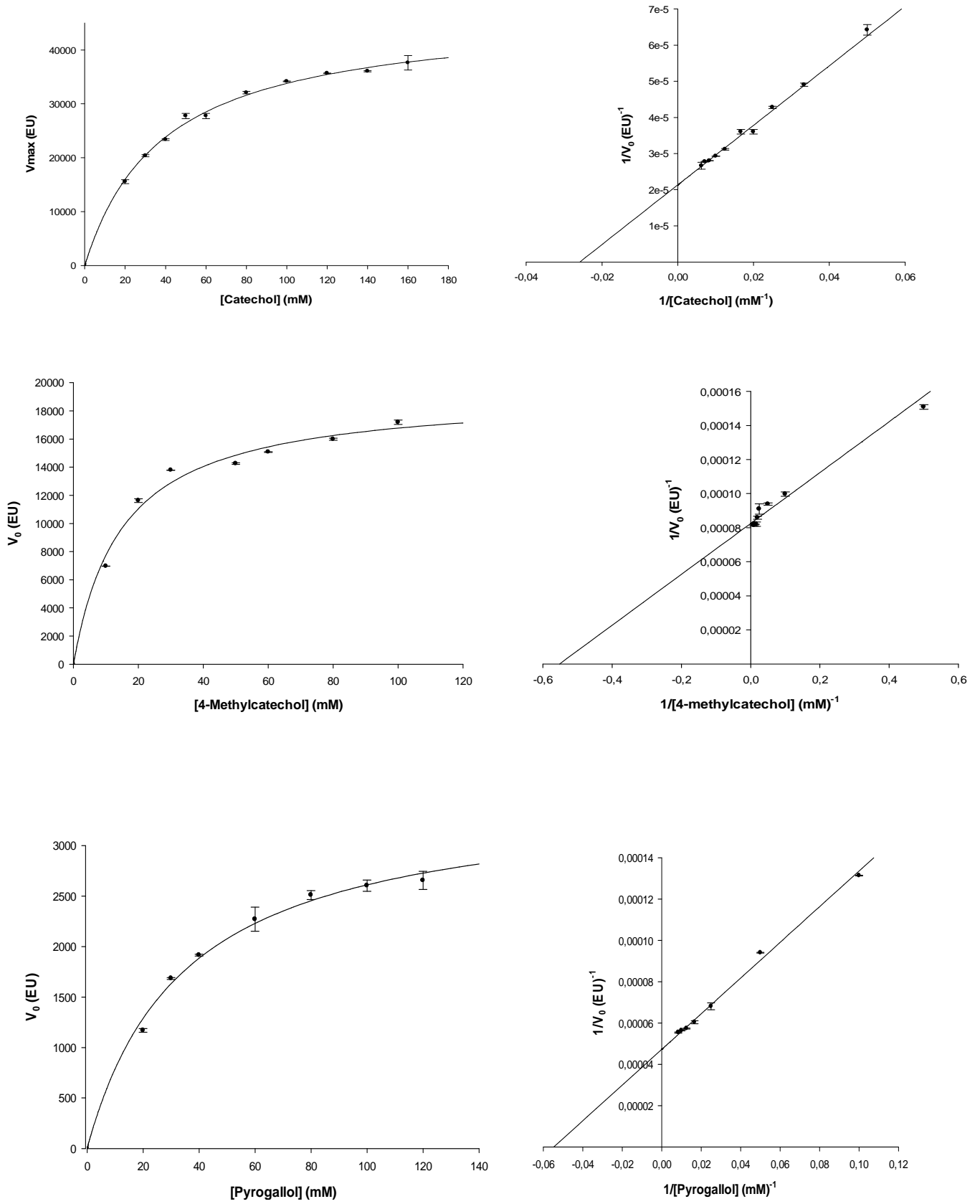


Fig 27 :Les graphiques de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk pour la PPO de Ghars

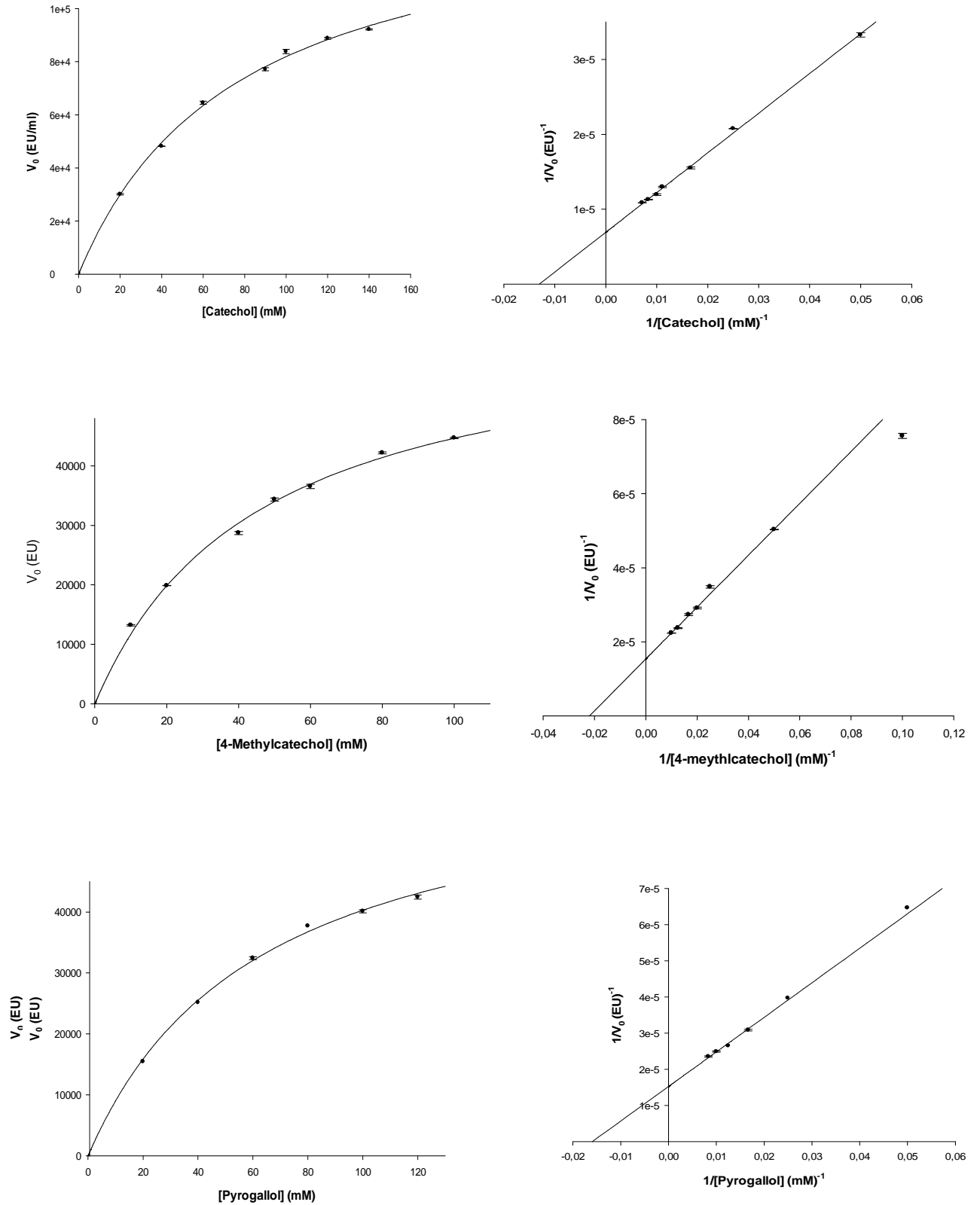


Fig 28 : Les graphiques de Michaelis-Menten et de Linweaver-Burk pour la PPO de Tadela

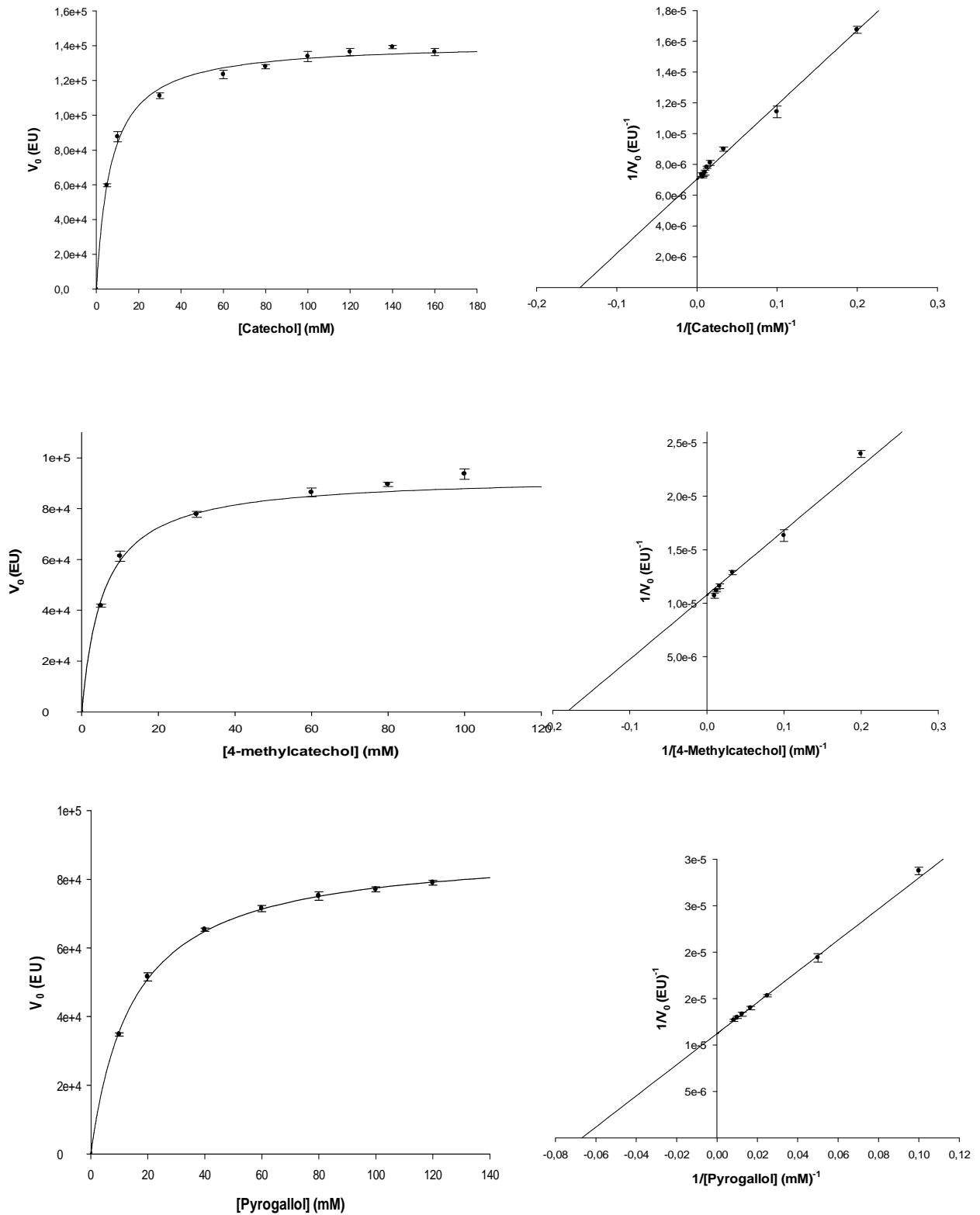


Fig 29 : Les graphiques de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk pour la PPO de Tantbouchet

Les valeurs des paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_m$ ) obtenus à partir des représentations graphiques de double inverse  $1/V=f(1/S)$  sont récapitulées dans le tableau 22.

**Tableau 22** : Paramètres cinétiques des PPOs des dattes

Source	Substrat	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (EU/mL)	$V_{max}/K_m$ (EU/mM.mL)	$R^2$
Deglet Nour	Catéchol	37.68±0.88	410.68±8.85	10.89±1.00	0.944
	4-Méthylcatéchol	1.94±0.12	268.30±9.06	138.29±3.96	0.981
	Pyrogallol	35.30±3.21	75.93±7.11	2.15±0.82	0.994
Ghars	Catéchol	35.44±1.95	937.42± 21.11	26.45±11.00	0.988
	4-Méthylcatéchol	13,39±0.92	393.36±10.30	29.37±17.00	0,963
	Pyrogallol	18.25±0.88	423.15±17.95	23.18±9.00	0.993
Tadela	Catéchol	38,066±10,47	2801.33± 4738,10	80.02±9.12	0.991
	4-Méthylcatéchol	48.50±2,99	1353.59±153,25	28.28±4.05	0.989
	Pyrogallol	60,15±4,11	1082.15±110.15	17.99±7,57	0.991
Tantbouchet	Catéchol	3.5±0.77	3161.41 ±18.13	903.26±18.3	0.984
	4-Méthylcatéchol	6.7±0.19	2171.99 ±13.28	324.17±17.5	0.978
	Pyrogallol	11.8±2.34	1963.36 ±10.14	166.38±13.82	0.984

D'après les résultats de tableau 22, nous remarquons une différence flagrante en terme d'affinité et efficacité par rapport au quatre enzymes purifiées .De même, l'utilisation de trois substrats permet d'avoir une idée sur l'effet de substrat sur les paramètres cinétiques.

La meilleure affinité pour le catéchol a été observée pour la PPO de Tantbouchet suivie de trois autres qui ont présentées des valeurs presque similaires vis-à-vis de ce substrat.

En utilisant le pyrogallol comme substrat, les PPOs de Tantbouchet et celle de Ghars ont révélé une meilleure affinité par rapport à celle de Deglet nour et celle de Tadela.

De plus, l'oxydation de 4-méthylcatéchol est plus forte en présence de la PPO de deglet Nour suivie de celle de Tantbouchet et Ghars. Cependant une valeur très élevée de  $K_m$  a été obtenue pour la PPO de Tadela.

En terme d'efficacité ,les PPOs de Deglet nour et de Ghars oxydent mieux le 4-méthylcatéchol par rapport au catéchol et pyrogallol, respectivement, tandis que les PPOs

de Tadela et Tantbouchet oxydent mieux le catéchol par rapport au 4-méthylcatéchol et pyrogallol.

Une telle efficacité pour le 4-méthylcatéchol a été aussi rapportée pour les fruits médullaires (*Mespilus germanica L.*, *Rosaceae*) (Dincer et al., 2002), *Thymbra* (*Thymbra spicata L. var. Spicata*) (Doğan et al., 2006), avocat (*Persea americana Mill.*) (Gomez-Lopez, 2002), aubergine (*Solanum melongena*) (Mishra et al., 2012), cerise de la Barbade (*Malpighia glabra L.*) (Kumar et al., 2008), alors qu'Aydemir (2004) et Aydemir et Akkanlı (2006) ont rapporté que le catéchol est le meilleur substrat pour la PPO d'artichaut (*Cynara scolymus L.*) et de céleri-rave (*Apium graveolens L.*), respectivement.

Dans la littérature, les valeurs de Km rapportés sont différentes en fonction de la source et le substrat utilisé.

Les valeurs de Km obtenues pour le catéchol dans la littérature étaient de 25,1 mM pour le raisin Emir (*Vitis vinifera L. cv. Emir*) (Ünal et Şener, 2006), 79,3 mM pour l'Atemoya (*Annona cherimola Mill.*) (Chaves et al., 2011), 34 mM pour la pomme Amasya (Oktay et al., 1995), 52,6 pour la PPO du raisin Victoria (Râpeanu et al., 2006), 180 mM pour la pomme Starking (Rocha et al., 1998), 44 mM pour le mamey (*Pouteria sapota*) (Palma-Orozco et al., 2011), 4,99 mM pour le fruit du marula (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*) (Mdluli, 2005), 44,5 mM pour le raisin Sultaniye (*Vitis vinifera L. cv. Sultana*) (Ünal et al., 2007), 5,7 mM pour les fruits médullaires (*Mespilus germanica L.*, *Rosaceae*) (Dincer et al., 2002), 20 mM pour *Thymbra spicata L. var. spicata* (Doğan et al., 2006), 29 mM pour le céleri-rave (*Apium graveolens L.*) (Aydemir et Akkanlı., 2006), 18 mM pour le thymus (*Thymus longicaulis subsp. chaubardii var. chaubardii*) (Dogan et Dogan, 2004), 3,2 mM pour la laitue beurre (*Lactuca sativa var. Capitata L.*) (Gawlik-Dziki et al., 2008), 5,2 mM pour la cerise de la Barbade (*Malpighia glabra L.*) (Kumar et al., 2008) et 10,2 mM pour l'artichaut (*Cynara scolymus L.*) (Aydemir, 2004), 28,3 mM pour le radis (*Raphanus sativus var. sativus*) (Goyeneche et al., 2013), 2,24 mM pour la PPO de Bourrache (*Trachystemon orientalis L.*) (Alici and abbasci., 2016).

De plus, les valeurs de Km obtenues pour le 4-méthylcatéchol dans la littérature étaient de 3 mM pour *Thymbra* (*Thymbra spicata L. var. Spicata*) (Doğan et al., 2006), 9,8 mM pour *Thymus* (*Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. Chaubardii*) (Dogan et Dogan, 2004), 42 mM pour le céleri-rave (*Apium graveolens L.*) (Aydemir et Akkanlı, 2006), 1 mM pour la laitue beurre (*Lactuca sativa var. Capitata L.*) (Gawlik-Dziki et al., 2008), 6,9 mM pour le cerisier de la Barbade (*Malpighia glabra L.*) (Kumar et al., 2008), 12,4

mM pour les têtes d'artichaut (*Cynara scolymus L.*) (Aydemir, 2004) et 7,5 mM pour les fruits médlares (*Mespilus germanica L.*) (Dincer et al., 2002).

Les valeurs de Km pour le pyrogallol dans la littérature étaient de 1,3 mM pour le ma-mey (*Pouteria sapota*) (Palma-Orozco et al., 2011), 39,4 mM pour le Thymbra (*Thymbra spicata L. var. Spicata*). (Doğan et al., 2006), 5,5 mM pour le thymus (*Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. Chaubardii*) (Dogan et Dogan., 2004), 50 mM pour le céleri-rave (*Apium graveolens L.*) (Aydemir et Akkanlı., 2006), 1,24 mM pour la Barbade cerise (*Malpighia glabra L.*) (Kumar et al., 2008) et 14,3 mM pour les têtes d'artichaut (*Cynara scolymus L.*) (Aydemir., 2004) et 6,3mM pour le radis (*Raphanus sativus var. sativus*) (Goyeneche et al., 2013).

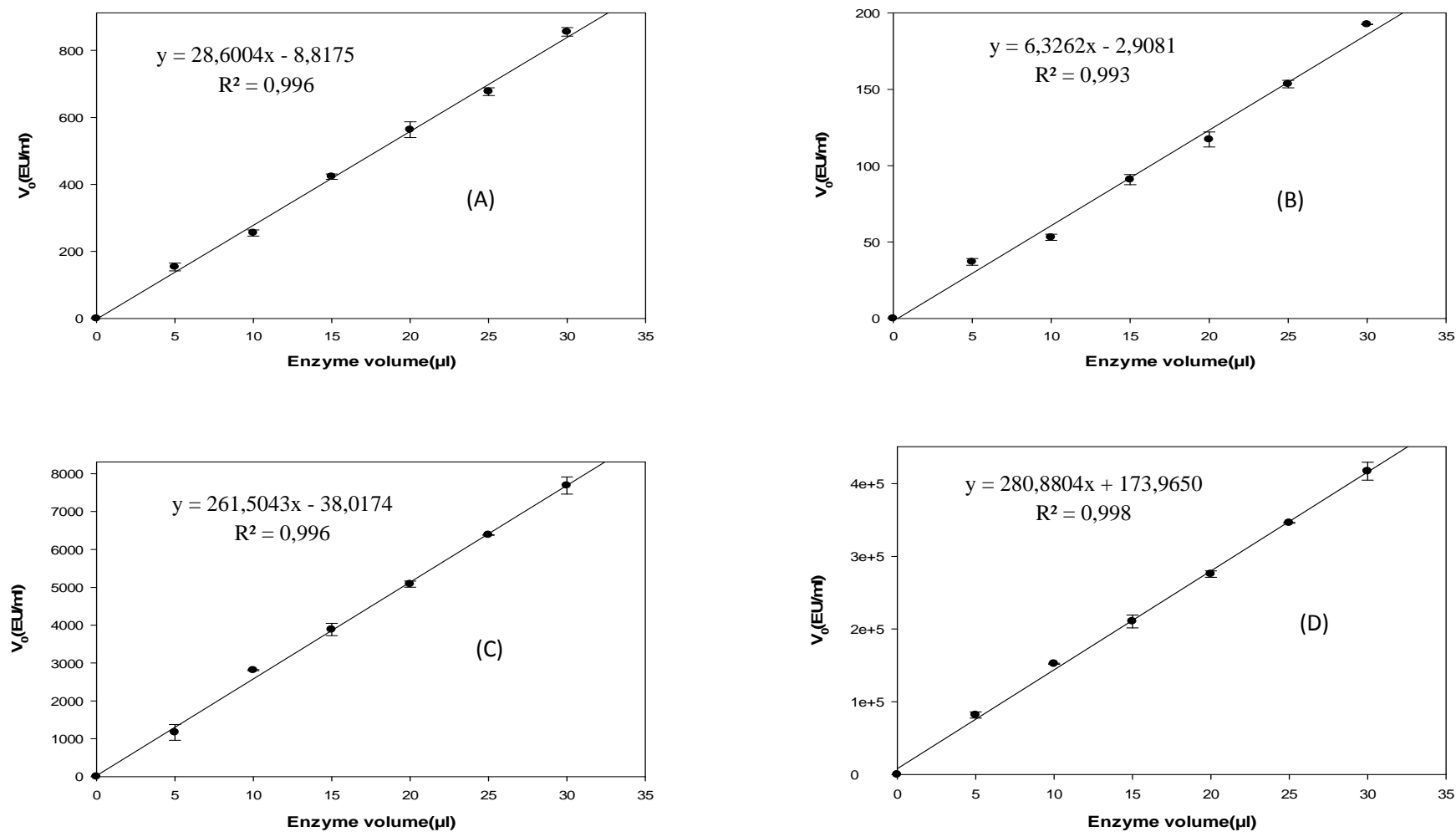
### 3.5. Effet de la concentration de l'enzyme

Dans le but de préciser le volume de l'enzyme à ajouter pour initier la réaction permettant un suivi facile avec une vitesse moyenne ni lente ni trop rapide, nous avons mesuré l'activité des PPOs des dattes vis-à-vis de la variation de volume d'enzyme de 5 à 30µl en utilisant le catéchol comme substrat. Les résultats ainsi obtenus sont représentés dans la figure 30.

Nous avons remarqué une corrélation linéaire entre l'augmentation de l'activité enzymatique et le volume d'enzyme. Un volume de 15µl était choisi dans toutes les mesures d'activité.

Dans la littérature, différents volumes ont été rapportés pour la mesure d'activité des PPOs. La valeur est en fonction de la vitesse et l'efficacité de l'oxydation du substrat, et aussi le degré de purification de l'enzyme. Bravo et Osorio. (2016) en travaillant sur la PPO pure de Groseillier à maquereau ont utilisé un volume de 12µl, de même, Cheema et Sommerhalter. (2015) ont utilisé un volume de 20µl pour le suivi de l'activité de PPO purifié à partir de mangue tandis que Ionita et al. (2017) ont rapporté un volume de 100µl lors de mesure de l'activité enzymatique de l'extrait brut de la PPO de prune.

A partir de cette relation de proportionnalité, nous pouvons estimer la valeur de la constante catalytique, ainsi que l'efficacité catalytique qui outre le rapport  $V_{max}/k_m$  peut être exprimé par le ratio  $K_{cat}/k_m(s^{-1})$ . Les valeurs ainsi correspondantes sont regroupées dans le tableau 23.



**Fig 30 :** Effet de la concentration de des enzymes des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol

A)PPO de Deglet Nour,B) PPO de Ghars C) PPO de Tadela,D) PPO de Tantbouchet.

La constante catalytique ou turnover (Kcat) correspondant à la quantité d'enzyme qui convertit une mole de substrat par seconde a été calculé selon l'équation suivante :

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_0}$$

Avec :

Vmax: Vitesse maximale ou activité catalytique ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )

Kcat: Constante catalytique ( $\text{s}^{-1}$ ).

[E]<sub>0</sub>: Concentration initiale en enzyme (g/mol)

**Tableau 23** : Valeurs de constante catalytique des PPOs des dattes

Source	Poids Moléculaire kDa	Substrat	K <sub>m</sub> (mM)	Kcat (S <sup>-1</sup> )	Kcat/K <sub>m</sub> (S <sup>-1</sup> Mm <sup>-1</sup> )
Deglet Nour	PPO <sub>1</sub> 20	Catéchol	37.68±0.88	214.26±3.43	5.68±0.05
		4-Méthylcatéchol	1.94±0.12	139.98±3.15	72.15±1.88
		Pyrogallol	35.30±3.21	39.61±0.19	1.11±0.00
	PPO <sub>2</sub> 44	Catéchol	37.68±0.88	471.38±5.96	12.51±0.13
		4-Méthylcatéchol	1.94±0.12	307.96±2.15	158.74±2.69
		Pyrogallol	35.30±3.21	87.15±1.19	2.46±0.50
	PPO <sub>3</sub> 65	Catéchol	37.68±0.88	696.37±6.11	18.48±0.77
		4-Méthylcatéchol	1.94±0.12	454.94±7.32	234.50±1.63
		Pyrogallol	35.30±3.21	128.75±1.95	3.64±0.80
Ghars	30	Catéchol	35.44±1.95	276.61± 5.18	7.80±0.14
		4-Méthylcatéchol	13,39±0.92	116.07±3.77	8.66±0.22
		Pyrogallol	18.25±0.88	124.86±17.95	6.84±0.15
Tadela	90	Catéchol	35,066±10,47	2192.34± 13,25	62.52 ±3.85
		4-Méthylcatéchol	48.50±2,99	1201.76±10,12	24.77±0.79
		Pyrogallol	60,15±4,11	846.9±9.13	14.07±0,21
Tantbouchet	67	Catéchol	3.5±0.77	738.88 ±8.44	211.11±5.71
		4-Méthylcatéchol	6.7±0.19	507.63 ±13.28	75.76±6.53
		Pyrogallol	11.8±2.34	458.87 ±11.09	38.88±4.69



D'après les valeurs de tableau 23, plusieurs remarques peuvent être déduites comme suit :

1-La valeur de constante catalytique diffère d'une source à une autre pour le même substrat et d'un substrat à un autre pour la même enzyme.

2- Pour une même enzyme et un même poids moléculaire, une proportionnalité existe entre les valeurs de  $V_{max}$  et  $K_{cat}$ , d'autant les valeurs de  $V_{max}$  sont grandes, d'autant les valeurs de cette constante sont ainsi grandes.

3-L'efficacité catalytique dépend de la source de l'enzyme, le substrat utilisé et la présence ou non des isoenzymes.

4-Nous avons remarqué une corrélation entre l'augmentation de l'affinité ( $\ll K_m$ ) et l'efficacité catalytique.

5-En présence d'isoenzymes dans le cas des PPOs des dattes, nous remarquons une corrélation linéaire entre l'augmentation d'efficacité catalytique et le poids moléculaire.

6-Comme ordre d'efficacité catalytique en présence de catéchol, pyrogallol et 4-méthylcatéchol, nous pouvons classer les PPOs de ces 4 variétés des dattes comme suit :

La PPO de Tantbouchet semble être la plus efficace pour les trois substrats testés suivi de la PPO de Tadela puis des PPOs deglet Nour ( $PPO_3 > PPO_2 > PPO_1$ ) tandis que la PPO de Ghars semble être la moins efficace.

Dans la littérature, plusieurs rapports ont étudié l'efficacité catalytique des PPO d'origine différentes vis-à-vis de plusieurs substrats. Derrarja et *al.* (2017) ont rapporté les valeurs de constante catalytique ( $s^{-1}$ ) et efficacités catalytiques ( $s^{-1}mM^{-1}$ ) suivantes pour la PPO d'abricot : catéchol ( $210 s^{-1}, 40 s^{-1}mM^{-1}$ ), acide chlorogénique ( $1400 s^{-1}, 500 s^{-1}mM^{-1}$ ), 4-méthylcatéchol ( $700 s^{-1}, 340 s^{-1}mM^{-1}$ ) et pour le pyrogallol ( $590 s^{-1}, 50 s^{-1}mM^{-1}$ )

Dogru et Erat (2012) à leur tour ont étudié aussi les propriétés cinétiques de PPO extraite à partir de persil vis à vis de 6 différents substrats. Ils ont rapporté les valeurs suivantes : catéchol ( $19.7 min^{-1}, 24937 min^{-1}mM^{-1}$ ), catéchine ( $3.3 min^{-1}, 206.3 min^{-1}mM^{-1}$ ), 4-méthylcatéchol ( $2.6 min^{-1}, 2680 min^{-1}mM^{-1}$ ), L-dopa ( $1.5 min^{-1}, 10000 min^{-1}mM^{-1}$ ) Dopamine ( $18 min^{-1}, 3.04 min^{-1}mM^{-1}$ ) et pour le pyrogallol ( $3.6 min^{-1}, 48.65 min^{-1}mM^{-1}$ )

Cependant des valeurs élevées ont été trouvées par Alici et Arabaci. (2016) pour la PPO de bourrache : catéchol ( $2.2 \cdot 10^4 s^{-1}, 9.8 \cdot 10^9 s^{-1}mM^{-1}$ ), acide caféique ( $6.2 \cdot 10^4 s^{-1}, 122 \cdot 10^9 s^{-1}mM^{-1}$ ), 4-méthylcatéchol ( $10, 7 \cdot 10^4 s^{-1}, 24 \cdot 10^9 s^{-1}mM^{-1}$ ) et pour le pyrogallol ( $1.15 \cdot 10^4 s^{-1}, 4.9 \cdot 10^9 s^{-1}mM^{-1}$ ).

## 5.4. Contrôle de brunissement enzymatique

### 5.4.1 Effet des détergents et agents chaotropiques

L'influence de trois concentrations (0,1,2 et 5mM) d'onze détergents et agents chaotropiques souvent utilisés dans l'industrie alimentaire sur les PPOs des dattes a été examinée. L'effet de la charge de détergent a été aussi étudié en utilisant à la fois des détergents ioniques et non ioniques.

Une comparaison en terme de sensibilité vis-à-vis de ces détergents et agents a été également faite entre l'oxydation des o-diphénol en utilisant le catéchol et l'oxydation des triphénols en utilisant le pyrogallol comme substrat.

Les résultats ainsi obtenus sont représentés dans les tableaux 24,25,26 et 27 pour les PPOs de Deglet Nour, Ghars, Tadela et Tantbouchet, respectivement.

**Tableau 24** : Effet des détergents et agents chaotropiques la PPO de Deglet Nour

Réactifs	Taux d'inhibition de l'activité relative (%)					
	Catéchol			Pyrogallol		
	0.1 mM	2mM	5 mM	0.1mM	2 mM	5 mM
<b>a- Détergents ioniques</b>						
Sodium dodecyl sulfate	NE	NE	-17.8± <sup>a</sup> 1.2	NE	NE	-40.9±1.5
Sarkosyl	NE	NE	-40.5±1.0	NE	NE	-43.7±1.6
Sodium cholate	NE	NE	NE	NE	NE	-5.2±0.6
Sodium dodecyl cholate	NE	NE	NE	NE	NE	-3.7±0.4
<b>a- Détergents non ioniques</b>						
Triton X-100	NE	NE	NE	NE	NE	-15.9±1.0
Tween 20	NE	NE	NE	NE	NE	-20.7±1.1
Tween 80	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NP-40	NE	NE	-23.1±1.5	NE	NE	-30.7±1.3
<b>c- Agents chaotropiques</b>						
Urea	-78.1±12	-100	-100	-83.1±1.3	-100	-100
Guanidine hydrochloride	-51.5±0.9	-70.9±1.8	-100	-62.4±1.7	-80.3±2.0	-100

NE :No effect

(-) & (+) ie : Inhibition.et activation.

(a) signifie (± SD) pour des expériences en triple.

**Tableau 25** : Effet des détergents et agents chaotropiques la PPO de Ghars

Réactifs	Taux d'inhibition de l'activité relative (%)					
	Catéchol			Pyrogallol		
a-Détergents ioniques	0.1 mM	2mM	5 mM	0.1mM	2 mM	5 mM
Sodium dodecyl sulfate	+2.0± <sup>a</sup> 0.0	-9.5±0.4	-22.8± <sup>a</sup> 0.9	NE	+11.0±0.5	-53.2±1.8
Sarkosyl	+1.3±0.0	-32.4±1.0	-50.3±1.2	+2.5±0.2	+8.3±1.2	-57.8±1.3
Sodium cholate	NE	NE	-13.0±0.5	NE	NE	-16.2±1.0
Sodium dodecyl cholate	NE	NE	-8.1±0.1	NE	NE	-10.9±0.7
a- Détergent non ionique						
Triton X-100	NE	-11.3±0.6	-25.9±1.7	NE	-16.3±0.2	-35.2±1.4
Tween 20	-20.22±1.5	-35.6 ±1.2	-53.7±1.1	-30.1±2.4	-51.2±2.0	-66.7±1.1
Tween 80	NE	NE	NE	NE	NE	-15.4±0.9
NP-40	-5.5±0.8	-19.3±0.7	30±1.9	-15.3±1.4	-30.1±1.2	-50±1.9
c- Agents chaotropiques						
Urea	-38.5±1.7	-67.6±2.4	-70.3±1.2	-50.1±1.3	-73.9±1.8	-90.1±1.7
Guanidine hydrochloride	-25.7±0.8	-39.7±1.6	-50.6±1.0	-40.2±2.2	-59.8±2.1	-70.4±2.2

**Tableau 26** : Effet des détergents et agents chaotropiques la PPO de Tadela

Réactifs	Taux d'inhibition de l'activité relative (%)					
	Catéchol			Pyrogallol		
a- Détergents ioniques	0.1 mM	2mM	5 mM	0.1mM	2 mM	5 mM
Sodium dodecyl sulfate	NE	NE	-13.7± <sup>a</sup> 0.3	NE	+3.0±0.0	-47.9±1.3
Sarkosyl	NE	-25.7±1.3	-37.2±1.1	NE	-25.3±1.6	-38.4±0.8
Sodium cholate	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Sodium dodecyl cholate	NE	NE	NE	NE	NE	NE
a- Détergents non ioniques						
Triton X-100	NE	NE	-20.2±1.7	NE	-13.7±1.8	-31.2±1.4
Tween 20	-20.22±1.0	-34.7 ±1.2	-50.1±2.2	-28.9±2.4	-45.0±1.6	-66.3±1.5
Tween 80	NE	NE	-13.1±1.6	NE	-8.9±0.4	-21.6±1.7
NP-40	-9.4±0.4	-23.6±0.9	-33±2.0	-19.6±1.7	-36.7±1.4	-55.1±2.1
c- Agents chaotropiques						
Urea	-41.8±0.7	69.7±1.6	-80.4±1.0	-62.9±2.7	-83.5±3.0	-97.8±3.4
Guanidine hydrochloride	-34.2±2.9	53.7±1.4	-62.8±1.9	-57.3±1.0	-70.6±1.7	-83.8±2.8

NE :No effect

(-) & (+) ie Inhibition.et activation.

(a) signifie (± SD) pour des expériences en triple.

Tableau 27 : Effet des détergents et agents chaotropiques la PPO de Tantboucht

Réactifs	Taux d'inhibition de l'activité relative (%)					
	Catéchol			Pyrogallol		
<b>a- Détergents ioniques</b>	0.1 mM	2mM	5 mM	0.1mM	2 mM	5 mM
Sodium dodecyl sulfate	NE	NE	-10.3± <sup>a</sup> 0.8	NE	+8.0±0.0	-40.2±1.8
Sarkosyl	NE	-20.1±1.3	-30.1±1.6	NE	-20.8±1.5	-30.5±1.1
Sodium cholate	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Sodium dodecyl cholate	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<b>a- Détergents non ioniques</b>						
Triton X-100	NE	NE	-16.6±1.3	NE	9.4±0.6	-25.5±1.7
Tween 20	-15.12±0.9	-28.3 ±1.4	-45.4±1.7	-25.6±3.2	-41.7±3.5	-60.7±1.1
Tween 80	NE	NE	NE	NE	NE	-15.4±0.9
NP-40	-5.5±0.8	-19.3±0.7	-30±1.9	-15.3±1.4	-30.1±1.2	-50±1.9
<b>c- Agents chaotropiques</b>						
Urea	-38.5±1.7	-67.6±2.4	-70.3±1.2	-50.1±1.3	-73.9±1.8	-90.1±1.7
Guanidine hydrochloride	-25.7±0.8	-39.7±1.6	-50.6±1.0	-40.2±2.2	-59.8±2.1	-70.4±2.2

NE :No effect

(-) &amp; (+) ie Inhibition.et activation.

(a )signifies (± SD) pour des expériences en triple.

D'après les résultats de ces tableaux nous remarquons que la sensibilité des PPOs des dattes diffère d'une part en fonction de type de détergent et agent chaotrope utilisé et d'autre part en fonction de substrat aussi. Nous constatons aussi que pour le même détergent ou agent chaotrope et le même substrat, la sensibilité est variable en fonction de la variété (Source ) de l'enzyme.

Une corrélation linéaire existe aussi entre le taux d'inhibition et l'augmentation de la concentration de réactif. Les agents chaotropiques ont présentés des taux d'inhibition appréciables pour les quatre enzymes utilisés et vis-à-vis des deux activités triphénolase et o-diphénolase. A l'exception de celle de Deglet Nour, les détergents non ioniques (Triton X-100, Tween 20, Tween 80 et NP-40) à leur tour présentent aussi un effet inhibiteur sur les autres PPOs des dattes à des concentrations  $\geq 2\text{mM}$ .

La PPO de Deglet Nour semble être plus résistance aux détergents non ioniques mais plus sensible vis-à-vis des agents chaotropiques par rapport aux trois autres enzymes. Ceci peut être dû à la présence de trois isoenzymes ayant un comportement différent.

La PPO de Ghars semble être la plus sensible. Un taux d'inhibition élevé a été estimé vis-à-vis de réactifs testés, tandis que la PPO de Tantbouchet présente des taux d'inhibition plus bas vis-à-vis des agents chaotropiques, détergents ioniques et non ioniques notamment à forte concentration (5mM) en la comparant avec ses homologues.

De même, la PPO de Tadela présente une sensibilité intermédiaire entre la PPO de Tantbouchet et celle de Deglet Nour. Nous avons également constaté que l'activité o-diphénolase est moins sensible que l'activité triphénolase.

Soulignons qu'un tel comportement n'est flagrant qu'à des concentrations élevées (5mM). En effet, une telle étude permet de vérifier d'une part la présence ou non d'une forme latente de l'enzyme via une activation proprement dite avec tels réactifs et d'autre part leur efficacité en tant qu'inhibiteurs de l'activité de PPO.

En outre, pour les détergents ioniques, différents effets ont été observés, le cholate de sodium et le dodécylcholate de sodium n'ayant aucun effet significatif sur les PPOs des dattes à l'exception de celle de Ghars.

Le sarkosyl inhibe l'activité triphénolique et o-diphénolique pour les PPO des dattes. Le SDS augmente légèrement l'activité (8%) à une concentration de 2 mM. Cet effet n'est pas très significatif et prouve l'absence d'une forme latente de PPO de Tantbouchet. Une concentration élevée de SDS (5 mM) inhibe 40% de l'activité. En fait, son effet a été noté exclusivement en utilisant le pyrogallol comme substrat et aucun effet n'a été observé en présence de catéchol.

Dans la littérature, l'effet de ces réactifs a été aussi rapporté. Saeidian et ses collaborateurs (2007) ont étudié l'effet de ces réactifs sur l'activité de la PPO de safran d'Iran en utilisant du catéchol et du p-crésol comme substrats. Ils ont signalé un effet d'activation de l'activité en utilisant le SDS (+ 400%) et le sarkosyl (+ 130%) et pour les détergents non ioniques et les agents chaotropiques, une diminution de l'activité a également été observée avec l'augmentation de la concentration. Une inhibition élevée a été rapportée pour l'urée (3,5 mM) avec une perte d'activité allant jusqu'à 92% avec le p-crésol, contre 15% avec le catéchol.

En général, l'utilisation de détergents est effectuée pour activer l'activité enzymatique. Plusieurs rapports mentionnaient que l'ajout de SDS peut probablement activer la forme latente de l'enzyme. Un tel comportement a été rapporté dans le cas de PPO de mangue (Cheema et Sommerhalter., 2015) et PPO d'abricot (Derardja et al., 2017).

### 5.4.2 L'effet des ions métalliques

L'effet des ions monovalents et divalents sur l'activité enzymatique des PPOs des dattes a été examiné en utilisant le catéchol et le pyrogallol comme substrats et en suivant l'effet de concentration aussi dont cinq concentrations ont été utilisées 0.1,1.,2.,5 et 10mM. Etant donné que la PPO est une métalloenzyme avec de cuivre comme cofacteur dans son site actif, le suivi de présence de certains métaux (CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, KCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub> et ZnSO<sub>4</sub>) semble être intéressant.

Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 28,29,30 et 31 pour les PPOs de Deglet Nour, Ghars, Tadela et Tantbouchet, respectivement.

**Tableau 28** : Effet des ions métalliques sur la PPO Deglet Nour

Substrat	Ion métallique	Activité relative (%)				
		0,1 mM	1mM	2 mM	5 mM	10 mM
Catéchol	ALCl <sub>3</sub>	100,0±1,1	100,0±1.7	85,4±1,1	77,8±0,5	70,7±1,1
	CdSO <sub>4</sub>	100,0±2.0	100,0±0.9	92,5±1,6	86,4±1,8	78,4±1.8
	CaCl <sub>2</sub>	100,0±3.0	100,0±0.4	96,7±3.1	94,5±1,3	90,1±1.3
	CuSo4	100,0±0.4	100,0±1.5	101,8±0.9	103.8±3,0	105.7±1.5
	FeSO4	100,0±0.5	100,0±1.3	100,0±0.7	102,3±2,0	104,5±2.2
	ZnSO <sub>4</sub>	100,0±1.9	100,0±1.6	100,0±3.0	101,0±1,0	102.5±2.4
	NaCl	100,0±1.0	100,0±1.8	100,0±2.5	100,0±1,4	100,0±1.9
	KCl	100,0±1.2	100,0±1.9	100,0±2.8	100,0±1,9	100,0±2.7
Pyrogallol	ALCl <sub>3</sub>	100,0±1,4	90,7±1.5	82,4±1.0	72,1±0,5	65,7±2.3
	CdSO <sub>4</sub>	100,0±1,8	95,1±0.9	87,0±1.2	83,0±1,6	75,1±3.0
	CaCl <sub>2</sub>	100,0±1,2	98,9±1.3	94,3±3.3	90,2±1,1	87,5±2.5
	CuSo4	100,0±1,3	100,0±2.6	102,8±1.4	103,5±3,0	106,9±2.8
	FeSO4	100,0±1,9	100,0±2.1	101,9±1,7	102.6±2,0	105,8±1.0
	ZnSO <sub>4</sub>	100,0±2.0	100,0±2.9	101,5±1.6	102.4±3,0	104,7±0.8
	NaCl	100,0±4.0	100,0±2.4	100,0±0.9	100,0±1,4	100,0±1.1
	KCl	100,0±0.6	100,0±1.8	100,0±0.4	100,0±1,9	100,0±0.7

**Tableau 29** : Effet des ions métalliques sur la PPO Ghars

Substrat	Ion métallique	Activité relative (%)				
		0,1 mM	1mM	2 mM	5 mM	10 mM
Catéchol	ALCl <sub>3</sub>	100,0±1,5	84,3±1,3	75,3±1,1	68,5±1,7	62,3±1,8
	CdSO <sub>4</sub>	100,0±1,1	87,5±0,5	84,0±1,8	80,5±1,5	75,3±1,4
	CaCl <sub>2</sub>	100,0±1,3	96,4±1,7	94,3±1,9	91,3±1,4	88,5±1,9
	CuSo4	102,5±1,0	107,9±1,5	112,3±1,4	114,9±2,0	119,1±3,0
	FeSO4	101,0±2,0	104,3±1,8	109,8±1,0	112,7±3,0	116,5±1,9
	ZnSO <sub>4</sub>	100,0±2,2	102,5±3,0	108,3±0,7	110,5±2,0	113,5±1,4
	NaCl	100,0±1,8	100,0±1,1	99,3±1,4	97,5±1,3	96,4±0,6
	KCl	100,0±3,0	100,0±1,0	98,5 ±1,5	96,9±1,5	95,0±1,7
Pyrogallol	ALCl <sub>3</sub>	100,0±2,7	81,5±1,2	73,5±0,6	65,3±0,9	60,1±1,5
	CdSO <sub>4</sub>	100,0±1,1	85,3±1,3	80,5±0,7	77,9±1,5	70,7±0,9
	CaCl <sub>2</sub>	100,0±0,9	95,7±1,7	96,7±0,9	88,7±1,7	90,1±0,5
	CuSo4	101,0±0,7	109,5±0,4	110,7±1,0	115,8±2,0	117,4±2,1
	FeSO4	100,0±1,5	106,4±2,2	108,5±2,5	113,6±3,0	114,1±3,0
	ZnSO <sub>4</sub>	100,0±1,6	104,5±3,0	105,1±2,7	109,1±1,0	111,3±2,0
	NaCl	100,0±3,2	100,0±0,5	100,0±1,3	96,1±1,6	95,3±1,8
	KCl	100,0±2,8	100,0±1,0	99,3±1,4	95,5±1,1	94,7±1,1

**Tableau 30** : Effet des ions métalliques sur la PPO de Tadela

Substrat	Ion métallique	Activité relative (%)				
		0,1 mM	1mM	2 mM	5 mM	10 mM
Catéchol	ALCl <sub>3</sub>	100,0±1,9	87,7±2,6	78,4±1,3	72,8±0,5	65,7±1,4
	CdSO <sub>4</sub>	100,0±1,5	90,1±1,1	87,0±2,3	83,7±1,8	78,4±2,7
	CaCl <sub>2</sub>	100,0±1,0	98,9±1,8	96,7±2,2	94,5±1,3	90,1±0,9
	CuSo4	101,0±1,4	105,6±1,9	110,7±1,1	113,6±3,0	115,4±2,6
	FeSO4	100,0±1,4	103,1±0,6	108,5±1,9	110,2±2,0	111,1±1,1
	ZnSO <sub>4</sub>	100,0±1,4	101,9±0,8	105,1±2,1	108,7±3,0	111,3±1,2
	NaCl	100,0±0,9	100,0±1,1	100,0±1,0	99,9±1,4	98,5±1,3
	KCl	100,0±1,7	100,0±1,4	99,3±1,2	98,8±1,9	98,1±1,6
Pyrogallol	ALCl <sub>3</sub>	100,0±1,1	84,1±1,1	75,9±1,0	69,3±1,9	60,5±1,7
	CdSO <sub>4</sub>	100,0±10	86,3±2,2	83,7±1,8	80,1±1,2	75,6±2,3
	CaCl <sub>2</sub>	100,0±1,2	94,5±0,9	94,2±1,6	90,2±0,7	86,5±1,0
	CuSo4	101,0±1,8	109,5±0,5	113,4±1,4	114,7±2,1	116,7±1,3
	FeSO4	100,0±1,9	106,2±2,7	110,2±0,8	112,3±1,7	115,3±1,5
	ZnSO <sub>4</sub>	100,0±1,6	104,9±2,4	108,3±1,7	110,9±0,8	112,5±1,9
	NaCl	100,0±1,2	100,0±3,0	100,0±2,2	97,7±1,9	96,0±1,1
	KCl	100,0±2,0	100,0±2,9	97,3±1,4	96,1±1,3	95,1±0,8

**Tableau 31:** Effet des ions métalliques sur la PPO de Tantbouchet

Substrat	Ion métallique	Activité relative (%)				
		0,1 mM	1mM	2 mM	5 mM	10 mM
Catéchol	ALCl <sub>3</sub>	100,0±1,1	90,3±0,9	81,9±1,7	75,3±1,4	68,9±1,1
	CdSO <sub>4</sub>	100,0±1,2	93,4±1,5	90,1±1,9	85,4±1,1	80,3±1,5
	CaCl <sub>2</sub>	100,0±0,6	100,0±1,3	98,5±1,8	96,7±1,9	93,5±1,7
	CuSO <sub>4</sub>	100,0±0,9	102,2±1,4	105,5±1,4	107,5±2,0	110,3±3,4
	FeSO <sub>4</sub>	100,0±1,0	100,0±0,9	103,3±2,5	105,9±3,0	108,6±1,0
	ZnSO <sub>4</sub>	100,0±1,8	100,4±0,7	102,2±1,2	104,9±0,9	106,7±1,4
	NaCl	100,0±1,3	100,0±1,4	100,0±3,0	100,0±2,0	99,8±1,7
	KCl	100,0±1,5	100,0±1,8	100,0±1	100,0±0,3	99,1±1,1
Pyrogallol	ALCl <sub>3</sub>					
	CdSO <sub>4</sub>					
	ALCl <sub>3</sub>	100,0±1,0	88,3±1,1	80,3±1,3	74,6±1,2	71,5±1,0
	CdSO <sub>4</sub>	100,0±0,8	90,1±1,1	88,0±1,5	86,9±1,5	82,5±3,6
	CaCl <sub>2</sub>	100,0±3,0	99,1±1,0	97,9±1,6	95,4±1,9	92,7±1,4
	CuSO <sub>4</sub>	101,0±2,4	104,3±1,8	106,8±1,9	108,8±4,0	111,5±1,5
	FeSO <sub>4</sub>	100,0±1,9	102,0±0,7	105,1±1,4	107,9±1,0	109,2±1,8
	ZnSO <sub>4</sub>	100,0±1,7	101,1±0,9	103,3±1,0	105,8±2,0	108,1±1,6
NaCl	100,0±1,3	100,0±2,0	100,0±1,0	100,0±1,7	99,6±1,3	
KCl	100,0±2,8	100,0±1,9	100,0±3,0	100,0±1,5	98,9±1,2	

En analysant les résultats l'effet de différentes concentrations de certains ions métalliques sur les PPOs des dattes, plusieurs remarques peuvent être déduite comme suit :

1-Parmi les ions métalliques utilisés, certains se comportent comme des inhibiteurs, certains comme activateurs, et autres sans effet significatif.

2- Une augmentation légère de l'activité enzymatique des PPOs des dattes a été observé en présence de ions divalents ( Cu<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> et Zn<sup>+2</sup>).L'augmentation est d'autant remarquable que la concentration est élevée. Le taux le plus élevé a été enregistré pour la PPO de Ghars (13-19%) suivi de Tadela (11-15%) et Tantbouchet (8-11%) tandis qu'un taux faible a été obtenu avec la PPO de Deglet noir (2-4%) à une concentration de 10mM.L'ordre de pouvoir activateur peut être donné comme suit : Cu<sup>+2</sup> > Fe<sup>+2</sup> > Zn<sup>+2</sup>.

3-Une diminution remarquable a été notée en présence des ions de Ca<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> et Al<sup>+</sup> avec l'ordre d'efficacité d'inhibition suivant : Al<sup>+</sup> > Cd<sup>+2</sup> > Ca<sup>+2</sup>.

4-Aucun effet significatif n'a été observé en présence des ions monovalents (Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>) quoique ce soit le substrat utilisé ou la source d'enzyme.



5-L'oxydation du pyrogallol semble être plus sensible à l'effet des ions métalliques par rapport à l'oxydation de catéchol.

6-L'ordre de sensibilité croissant des PPOs des dattes vis-à-vis des ions métalliques testés peut être donné comme suit :

PPO Ghars > PPO Tadela > PPO Tantbouchet > PPO Deglet Nour.

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés pour la PPO de sapote (Palma- Orozco et al., 2011) ,la PPO des fleurs de colza (Sun et al., 2012) ,la PPO de pomme de Hemşin (Aydin et al., 2015) et la PPO d'abricot (Derardja et al., 2017).

Derardja et al. (2017) ont remarqué que la présence de la plupart des ions métalliques testés a affecté négativement l'activité enzymatique. Les ions métalliques tels que  $Al^{+3}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  et  $Fe^{+2}$  inhibaient nettement l'activité de la PPO, moins de 35% de l'activité de la PPO était conservée à une concentration de 10 mM. De même, ils ont rapporté un effet stimulateur en présence de  $MgSO_4$ ,  $ZnSO_4$  et  $CuSO_4$ .

Des effets similaires ont été observés pour la PPO de pommes, où 50 mM de  $CuSO_4$  a pu provoquer une augmentation de l'activité de la PPO à 145% et 3,69 mM de  $AlCl_3$  l'a réduit à 50% (Aydin et al., 2015).

De plus, l'activité du PPO de litchi était réduite en présence de  $FeSO_4$  et de  $NaCl$  et stimulée en présence de  $MnSO_4$  et  $CuSO_4$  (Liu et al., 2013)

Palma et al. (2011) ont rapporté une stimulation de la PPO de sapote en présence de  $MgSO_4$  et  $ZnSO_4$ , mais contrairement à nos résultats, ils ont observé une diminution de son activité en présence de  $CuSO_4$ .

L'effet inhibiteur de certains ions métalliques comme le  $Ca^{+2}$  peut être dû à la répulsion de l'oxygène moléculaire, et le co-substrat nécessaire pour la réaction enzymatique de la PPO. (Sun et al., 2012)

En effet, la polyphénol-oxydase est une métalloenzyme contenant du cuivre sur son site actif. L'effet de certains métaux change en fonction de plusieurs facteurs y compris, l'ion métallique utilisé et sa concentration, le substrat utilisé, la source d'enzyme, le degré de pureté et la présence ou non des isoenzymes. Leur effet peut être positif en augmentant la stabilité et en renforçant les interactions enzyme-substrat, tandis que certains métaux peuvent diminuer le taux d'oxygène et modifier l'état de valence cuivrique ou bivalent, ce qui perturberait l'activité enzymatique (Valko et al., 2005; Aydin et al., 2015)

### 5.4.3 Effet des inhibiteurs

L' effet des sulfites (métabisulfite de sodium, métabisulfite de potassium et dioxyde de soufre) des fluorures (acide fluorosilicique, fluorosilicate de sodium et fluorure de sodium) des acides aminés (L-cystéine, arginine, acide glutamique, glycine) et les acides organiques (acide salicylique, acide ascorbique et l'acide benzoïque) sur l'activité des PPOs des dattes a été étudié en utilisant le catéchol et le pyrogallol comme substrats et aussi en appliquant trois concentrations différentes (0,1 mM, 2 mM et 5 mM). Les résultats ainsi obtenus sont récapitulés dans les tableaux 32,33,34 et 35 pour les PPOs de Deglet Nour, Ghars, Tadela et Tantbouchet, respectivement.

**Tableau 32** : Effet de certains inhibiteurs sur la PPO de Deglet Nour

Inhibiteur	Activité relative (%)					
	Catéchol			Pyrogallol		
	0.1 mM	2mM	5 mM	0.1mM	2 mM	5mM
<b>a-Sulfites</b>						
Metabisulfite de potassium	35.5±1.9	9.1±0.3	0.00	59.1±1.2	0.00	0.00
Metabisulfite de sodium	10.2±1.5	0.00	0.00	21.0±2.0	0.00	0.00
Sulfur dioxide	25.9±2.1	0.00	0.00	33.9±1.5	0.00	0.00
<b>b-Fluorures</b>						
Acide fluorosilicique	35.3 ±1.0	15.2 ±0.7	0.00	39.8±0.0	0.00	0.00
Fluorure de sodium	28.1±1.6	0.00	0.00	33.6 ±12	0.00	0.00
Fluorosilicate de sodium	42.8 ±1.2	20.6 ±1.3	0.00	45.7±1.0	0.00	0.00
<b>c-Acides amines</b>						
Arginine	NE	27.6±1.4	6.1±0.8	NE	33.4±1.7	0.00
L-cysteine	12.5±2.7	0.00	0.00	25.4±1.0	0.00	0.00
Glycine	75.3±19	54.7±1.0	0.00	79.1±1.6	39.4±2.5	5.2±0.3
Acide Glutamique	NE	68.3±1.4	13.5±1.1	NE	75.8±3.0	26.5±1.0
<b>d-Acides organiques</b>						
Acide benzoïque	62.5±1.8	0.00	0.00	68.7±2.0	22.8±1.9	0.00
Acide ascorbique	18.5±2.3	0.00	0.00	36.4±0.5	0.00	0.00
Acide Salicylique	80.3±1.4	56.7±1.3	45.4±0.5	NE	75.3±1.6	50.3±1.2

NE : Sans Effet.

**Tableau 33** : Effet de certains inhibiteurs sur la PPO de Ghars

Inhibiteur	Activité relative (%)					
	Catéchol			Pyrogallol		
a-Sulfites	0.1 mM	2mM	5 mM	0.1mM	2 mM	5mM
Metabisulfite de potassium	40.3±1.5	10.6±1.8	0.00	75.7±1.3	24.6±0.7	0.00
Metabisulfite de sodium	15.3±1.2	0.00	0.00	25.7±1.0	0.00	0.00
Sulfur dioxide	35.7±1.1	0.00	0.00	38.5±1.2	0.00	0.00
<b>b-Fluorures</b>						
Acide fluorosilicique	45.7 ±1.2	0.00	0.00	50.7±3.0	0.00	0.00
Fluorure de sodium	48.2±1.4	0.00	0.00	40.1 ±1.5	0.00	0.00
Fluorosilicate de sodium	53.1 ±1.5	10.6 ±0.9	0.00	55.1±1.0	10.3±0.4	0.00
<b>c-Acides amines</b>						
Arginine	NE	60.1±1.2	305±0.9	NE	55.1±1.3	30.7±1.6
L-cysteine	28.4±2.1	13.7±2.0	0.00	30.4±1.3	11.3±1.9	0.00
Glycine	50.3±1.5	18.5±2.0	0.00	40.1±1.8	20.3±1.7	0.00
Acide Glutamique	60.1±1.6	40.3±1.2	10.6±3.1	60.5±1.7	41.7±0.5	11.6±1.0
<b>d-Acides organiques</b>						
Acide benzoïque	37.5±1.8	8.5±0.7	0.00	69.8±1.7	36.3±2.0	0.00
Acide ascorbique	38.5±2.1	0.00	0.00	42.5±1.4	0.00	0.00
Acide Salicylique	54.3±1.8	14.7±1.3	0.00	NE	30.5±1.9	5.3±1.8

**Tableau 34** : Effet de certains inhibiteurs sur la PPO de Tadela

Inhibiteur	Activité relative (%)					
	Catéchol			Pyrogallol		
a-Sulfites	0.1 mM	2mM	5 mM	0.1mM	2 mM	5mM
Metabisulfite de potassium	52.3±1.2	17.3±1.4	0.00	65.2±1.2	29.4±1.7	0.00
Metabisulfite de sodium	50,2±2,1	0,0±0,0	0,0±0,0	54,1±1,9	0,00	0,00
Sulfur dioxide	58.7±1.6	0.00	0.00	62.4±1.3	8.5±0.6	0.00
<b>b-Fluorures</b>						
Acide fluorosilicique	50.1 ±1.7	3.2 ±0.9	0.00	53.7±0.0	9.5 ±0.3	0.00
Fluorure de sodium	54.2±1.4	0.00	0.00	60.1 ±1.5	0.00	0.00
Fluorosilicate de sodium	62.5 ±1.2	19.7 ±0.4	0.00	67.9±2.0	23.5±0.9	0.00
<b>c-Acides amines</b>						
Arginine	NE	NE	48.3±0.9	NE	NE	52.9±1.6
L-cysteine	75,7±1,6	0,0±0,0	0,0	83,5±1,1	13,1±1,8	0,00
Glycine	86,3±1,4	14,3±1,6	0,00	90,1±1,0	19,9±1,7	0,00
Acide Glutamique	NE	53,4±1,1	28,5±3,2	NE	57,9±1,5	405±1,7
<b>d-Acides organiques</b>						
Acide benzoïque	85,7±1,5	46,5±0,7	0,0±0,0	88,5±1,2	50,6±2,0	6,5±0,3
Acide ascorbique	75,3±2,2	0,0	0,0	80,4±0,5	25,3±2,3	0,00
Acide Salicylique	NE	86,6±1,8	78,0±3,2	NE	NE	85,7±1,9

NE : Sans Effet

Tableau 35 : Effet de certains inhibiteurs sur la PPO de Tantbouchet

Inhibiteur	Perte d'Activité relative (%)					
	Catéchol			Pyrogallol		
a-Sulfites	0.1 mM	2mM	5 mM	0.1mM	2 mM	5mM
Metabisulfite de potassium	49.9±1.9	17.3±1.4	0.00	70.4±1.5	20.5±2.4	0.00
Metabisulfite de sodium	18.1±1.8	0.00	0.00	29.5±1.4	0.00	0.00
Sulfur dioxide	39.4±2.7	0.00	0.00	41.7±1.8	2.5±0.6	0.00
<b>b-Fluorures</b>						
Acide fluorosilicique	50.1 ±1.7	3.2 ±0.9	0.00	53.7±0.0	9.5 ±0.3	0.00
Fluorure de sodium	48.2±1.4	0.00	0.00	40.1 ±1.5	0.00	0.00
Fluorosilicate de sodium	58.9 ±1.3	13.9 ±0.7	0.00	59.5±2.0	14.4±0.9	0.00
<b>c-Acides amines</b>						
Arginine	NE	67.3±2.4	36.1±0.8	NE	69.2±1.7	38.5±1.3
L-cysteine	70.3±2.7	17.5±2.5	0.00	75.7±1.4	19.5±1.2	0.00
Glycine	55.1±1.8	24.2±1.0	0.00	46.4±1.3	29.5±2.2	0.00
Acide Glutamique	67.6±1.6	48.1±1.2	18.8±3.1	70.0±0.9	49.5±2.5	14.3±1.6
<b>d-Acides organiques</b>						
Acide benzoïque	42.3±1.4	12.3±2.6	0.00	74.1±0.5	41.2±3.2	14.4±1.7
Acide ascorbique	38.5±2.1	0.00	0.00	66.4±0.5	45.3±2.3	0.00
Acide Salicylique	59.9±1.2	26.5±1.4	4.64±0.5	NE	60.7±1.6	30.1±1.3

NE : Sans Effet

En comparant les valeurs des activités relatives des PPOs dattes vis-à-vis des inhibiteurs testés ainsi que le substrat utilisé, nous pouvons conclure que :

Les sulfites et les fluorures sont des inhibiteurs puissants de l'activité enzymatique des dattes. Un tel effet inhibiteur puissant a été également signalé pour la PPO de bourrache (Alici et Arabaci, 2016) et la PPO d'aubergine (Mishra et al., 2012). Néanmoins, leur utilisation dans l'industrie alimentaire reste limitée en raison de leur toxicité et risque sur la santé du consommateur. (Benaceur et al., 2018)

Le taux d'inhibition de l'activité des PPOs des dattes varie en fonction de la catégorie d'inhibiteur et le substrat utilisé. Différents acides aminés (résidus non polaires, aliphatiques: Glycine, résidus polaires non chargés: L-cystéine, résidus chargés positivement: Arginine et résidus chargés négativement : l'acide glutamique) ont été utilisés parmi une telle liste, la L-cystéine semble être la plus puissante suivie de la glycine et de l'acide glutamique.

Zhou et al.(2018) ont signalé l'inhibition totale de la PPO de Poire par la L-cystéine. Saeidian (2013) à son tour a également signalé l'effet de la L-cystéine et de la glycine sur la PPO de la poire européenne.

L'effet de l'acide glutamique a été signalé pour les PPOs de champignons et *Ocimum basilicum* L.P POs (Doğan, et al.,2007). D'autre part,Mogol et al (2010) ont trouvé une inhibition fiable du brunissement enzymatique par les produits de réaction de Maillard dérivés de différents acides aminés (Arg, His, Lys et Pro).

En outre, l'étude de l'effet de l'acide salicylique, de l'acide benzoïque et de l'acide ascorbique montre inhibition significative en utilisant une concentration de 5 mM avec comme ordre : acide ascorbique> acide benzoïque> acide salicylique

L'inhibition de l'activité enzymatique de PPO par ces trois acides a été rapportée pour la PPO de poire en utilisant l'inhibiteur salicylique (Zhou et al.,2018) et aussi pour la mangue Ataulfo (Cheema et Sommerhalter.,2015) en présence de l'acide ascorbique comme inhibiteur, alors qu'une inhibition remarquable par l'acide benzoïque a été observée pour la myrtille PPO (Siddiq et Dolan.,2017) et les prunes PPO (Ionita et al.,2017).

L'effet du substrat sur la stabilité enzymatique est observé beaucoup plus en utilisant les acides organiques et les acides aminés. L'ordre n'est pas modifié pour les quatre catégories mais le taux d'inhibition et la perte d'activité sont amplifiés en utilisant le pyrogallol par rapport à l'utilisation du catéchol.

Le taux d'inhibition dépend à priori de la source d'enzyme,de substrat utilisé,de l'inhibiteur examiné et le degré de pureté de l'enzyme.

#### **5.4.4 Cinétique de l'inhibition de la PPOs des dattes**

##### **5.4.4.1 Efficacité des inhibiteurs**

L'inhibition du brunissement enzymatique peut être le résultat de (1) l'inactivation de la PPO, (2) de l'élimination de l'un des substrats de la réaction (O<sub>2</sub>, polyphénols), et (3) de l'action des inhibiteurs sur les produits de la réaction enzymatique pour empêcher la formation de produits colorés après des réactions secondaires (Mesquita et Quiroz.,2013).

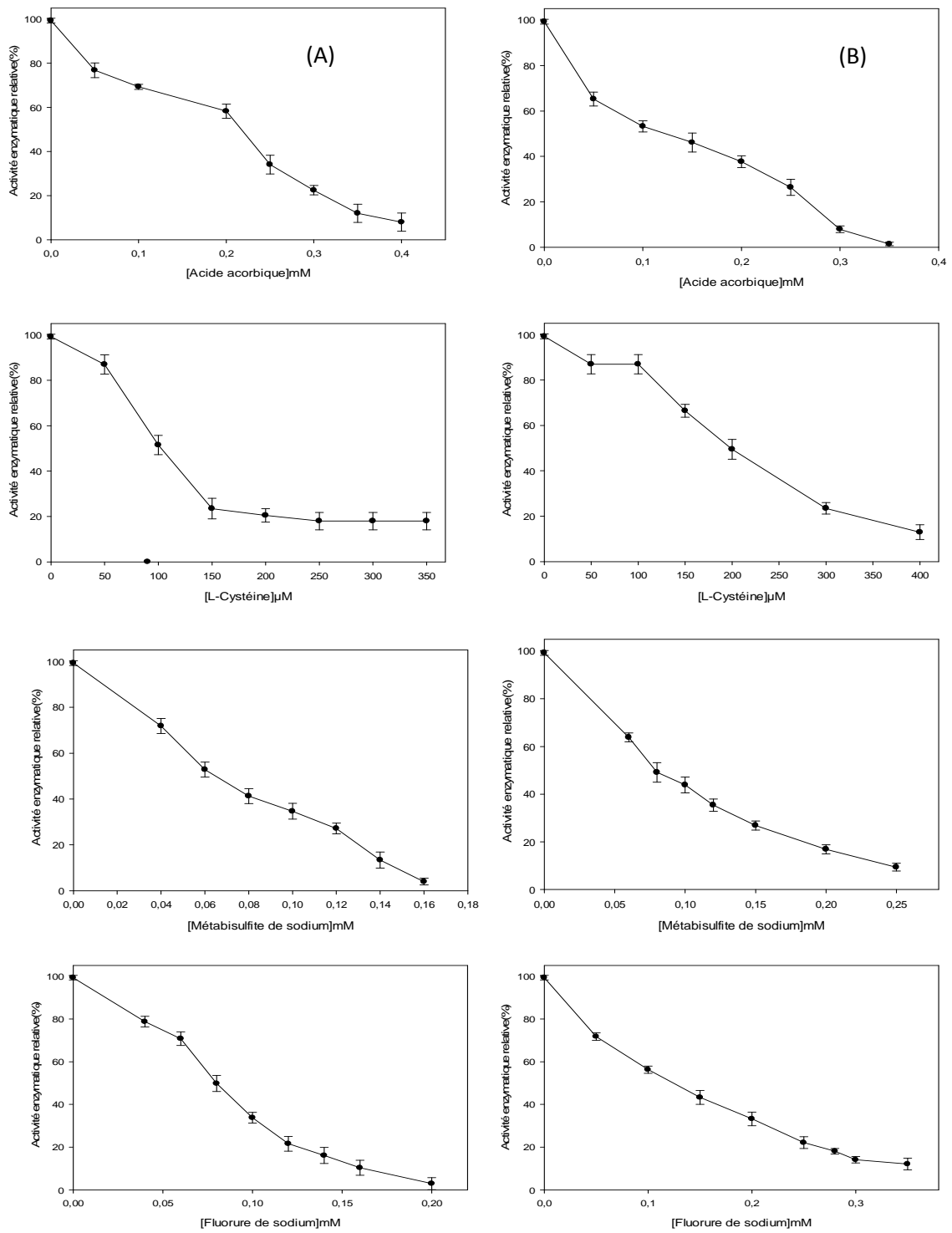
En se basant sur l'effet des inhibiteurs décrits précédemment ,les inhibiteurs les plus puissants par catégorie sont :le métabisulfite de sodium (Sulfite)le fluorure de sodium(Fluorure),la L-Cystéine(acides aminés) et l'acide ascorbique(Acides organiques).

Ces inhibiteurs ont fait l'objet d'une étude détaillée dont leur d'efficacité(Valeur d'IC<sub>50</sub> et K<sub>i</sub>) ainsi que leur mécanisme d'inhibition ont été déterminé pour les quatre PPOs des dattes tout en étudiant avec, l'effet de choix de substrat sur les paramètres d'inhibition.

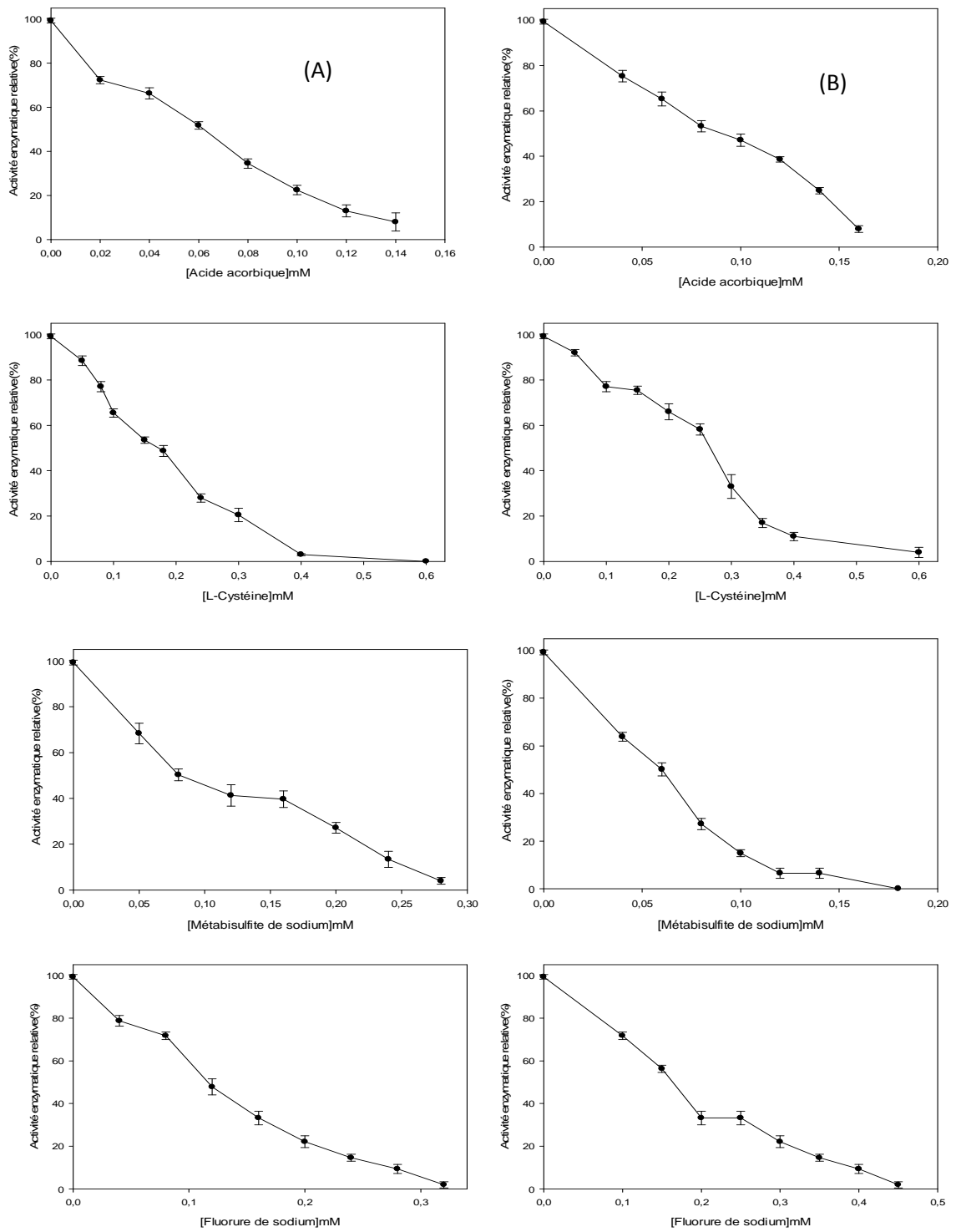
L'effet inhibiteur de ces composés sur les PPOs des dattes a été déterminé en utilisant le catéchol et le pyrogallol comme substrats. Nous remarquons que l'activité enzymatique diminue significativement avec l'augmentation de la concentration d'inhibiteur. Afin de comparer entre l'efficacité de ces différents inhibiteurs, les  $IC_{50}$  ont été déterminées et les valeurs ainsi obtenues sont regroupées dans le Tableau (36).

**Tableau 36** : Efficacité et valeurs d' $IC_{50}$  de certains inhibiteurs sur les PPOs des dattes

Source	Inhibiteur	IC 50(mM)	
		Activité catécho- lase	Activité triphéno- lase
Deglet Nour	Acide ascorbique	0.23±0.01	0.11±0.00
	L-Cystéine	0.10±0.00	0.19±0.02
	Métabisulfite de sodium	0.06±0.00	0,08±0.00
	Fluorure de sodium	0,08±0.00	0.12±0.01
Ghars	Acide ascorbique	0.06± 0.01	0.09±0.02
	L-Cystéine	0.16±0.02	0.26±0.03
	Métabisulfite de sodium	0.08±0.00	0.06±0.00
	Fluorure de sodium	0.11±0.02	0.17±0.01
Tadela	Acide ascorbique	0.22± 0.01	0.43 ±0.03
	L-Cystéine	0.33±0.05	0.65±0.08
	Métabisulfite de sodium	0.11±0.02	0.30±0.04
	Fluorure de sodium	0.15±0.06	0.38±0.01
Tantbouchet	Acide ascorbique	1.03 ±0.07	1.48±0.71
	L-Cystéine	1.15 ±0.09	1.37±0.08
	Métabisulfite de sodium	0.10 ±0.02	0.29±0.01
	Fluorure de sodium	0.23±0.01	0.42±0.03

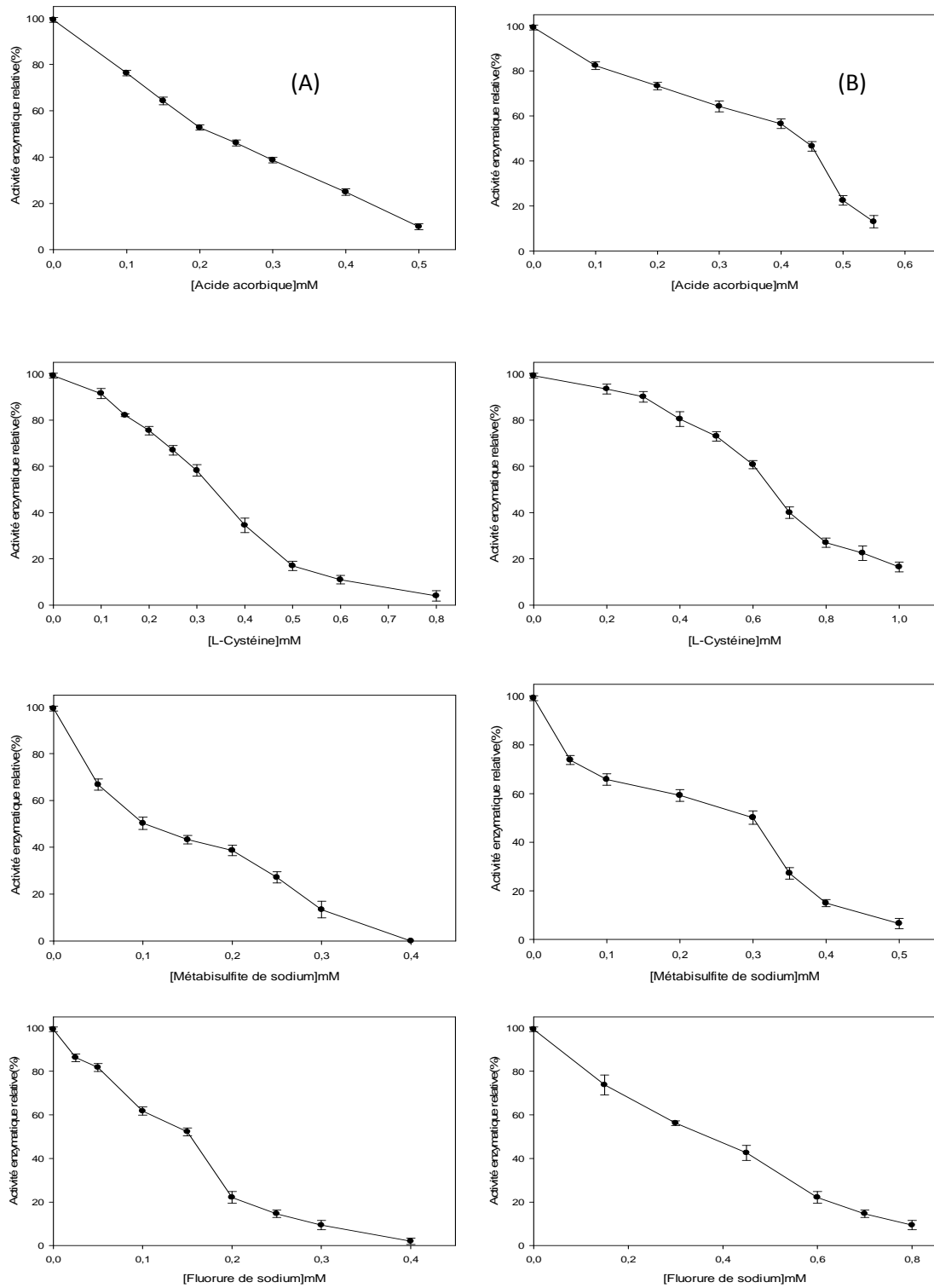


**Fig 31:** Effet de la concentration de certains inhibiteurs sur la PPO de Deglet Nour en présence de (A) Catéchol et de (B) pyrogallol comme substrats

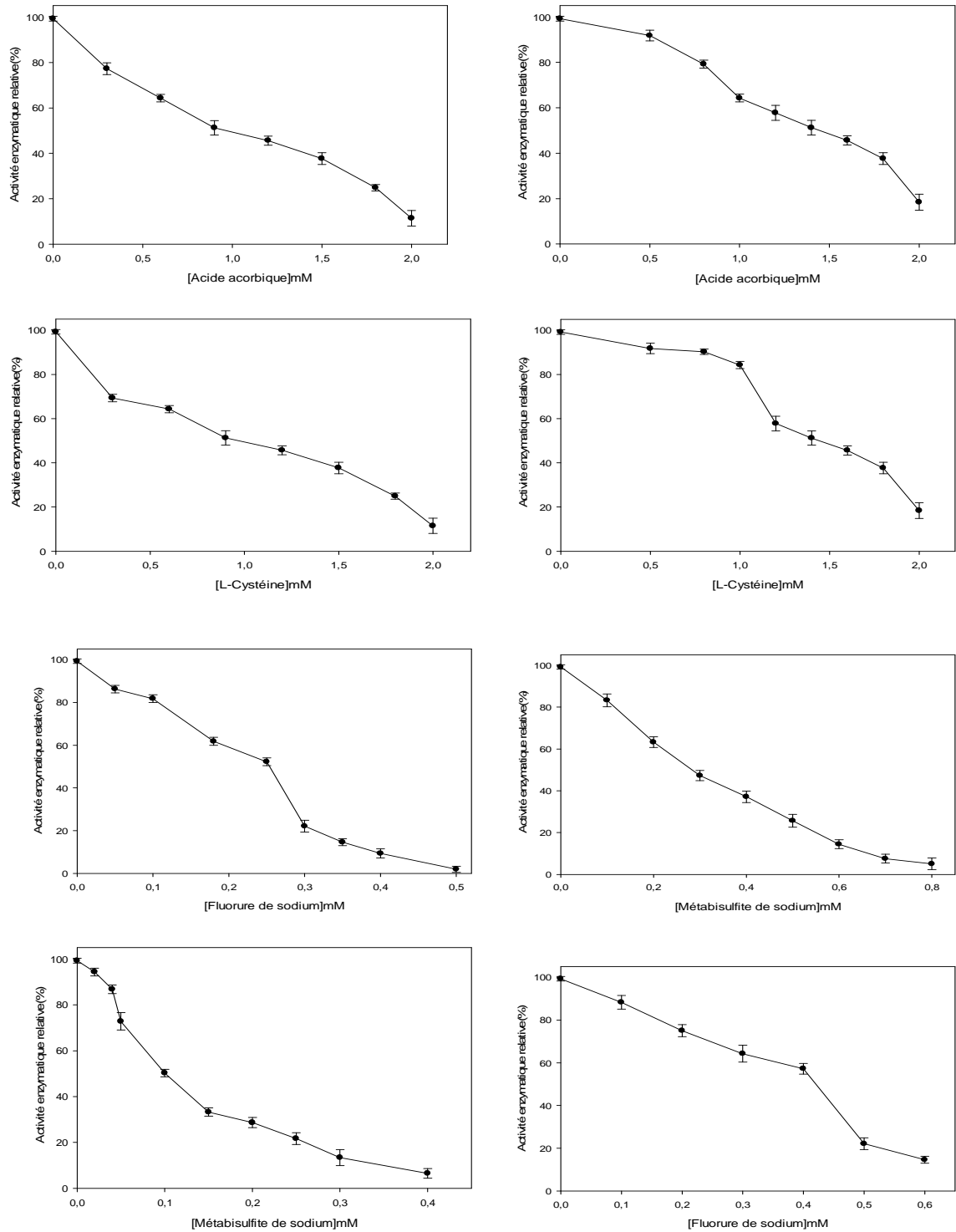


**Fig 32:** Effet de la concentration de certains inhibiteurs sur la PPO de Ghars en présence de (A) Catéchol et (B) pyrogallol comme substrats





**Fig 33:** Effet de la concentration de certains inhibiteurs sur la PPO de *Tadela* en présence de (A) Catéchol et de (B) pyrogallol comme substrats.



**Fig :34:** Effet de la concentration de certains inhibiteurs sur la PPO de Tantbouchet en présence de (A) Catéchol et de (B) pyrogallol comme substrats

Selon des valeurs estimées, le pouvoir des inhibiteurs utilisés sur les PPOs des dattes décroît selon l'ordre suivant : Métabisulfite de sodium > Fluorure de sodium > L-Cystéine > acide ascorbique .

L'effet de ces inhibiteurs sur l'activité de la PPO de différentes sources végétales a été rapporté tandis qu'à notre connaissance aucune étude n'a rapporté auparavant leur effet sur l'activité des PPO des dattes. Nous constatons aussi que l'activité triphénolase semble être plus sensible par rapport à l'activité catécholase. Une telle remarque a été aussi rapportée par Dogan et al. (2007) qui ont étudié l'effet inhibiteur de l'acide ascorbique en utilisant trois substrats différents (catéchol, 4-méthylcatéchol et pyrogallol). Ils ont trouvés qu'en utilisant le pyrogallol, la sensibilité est amplifiée d'un facteur de 600 fois en comparant les valeurs d'IC<sub>50</sub> ainsi obtenues (0.0003 face à 2mM). De même, une différence légère a été enregistrée en présence de 4-méthylcatéchol comme substrat.

Alici et Arabacia. (2016) ont étudié aussi l'effet de l'acide ascorbique, métabisulfite de sodium et de L-cystéine sur la PPO de bourache en utilisant le 4-méthylcatéchol et le pyrogallol comme substrats. Ils ont trouvés contrairement à nos résultats que l'oxydation de 4-méthylcatéchol est plus sensible de celle de l'oxydation de pyrogallol. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ainsi rapportées sont les suivantes : (0,11 < 0,28mM) pour l'acide ascorbique, (0,07 < 0,15mM) pour la L-cystéine et de (0,18 < 0,37mM) en présence de métabisulfite de sodium et en utilisant le pyrogallol et le 4-méthylcatéchol comme substrats.

Bravo et al. (2016) ont rapporté que l'acide ascorbique, L-cystéine, quercétine et sulfite de sodium inhibent efficacement la PPO de châtaigne.

Zhou et al. (2018) ont rapporté que l'activité de PPO de la poire de Whangkeumbae peut être inhibée par divers inhibiteurs universellement utilisés dans l'industrie alimentaire, tels que la L-cystéine, l'acide ascorbique, l'acide kojique et l'acide citrique. Il ont montré que l'activité de la PPO a diminué de manière réversible à une faible concentration de L-cystéine de 0,1 à 0,8 mg / ml.

Lim et Wong. (2018) ont étudié à leur tour l'inhibition de PPO de gingembre par le métabisulfite de sodium et de L-cystéine en utilisant le catéchol et le 4-méthylcatéchol comme substrats. Des valeurs d'IC<sub>50</sub> équivalentes à 10.28 mM et 10.44 ont été obtenues en présence de métabisulfite de sodium et de L-cystéine avec de catéchol comme substrat tandis qu'en utilisant de 4-méthylcatéchol, des valeurs équivalentes à 3.62 et 8.82 ont été obtenues, respectivement. L'efficacité d'un inhibiteur donnée semble être dépendante de substrat utilisé, de son concentration dans le milieu réactionnel, de la source de l'enzyme et le degré de son pureté. (Alici et Arabacia., 2016 ; Lim et Wong., 2018; Zhou et al., 2018).

#### 5.4.4.2 Mode d'action des inhibiteurs

Pour déterminer le mode d'action de ces inhibiteurs sur les deux activités catécholase et triphénolase des PPOs des dattes en utilisant de catéchol et le pyrogallol comme substrats respectivement, nous avons utilisés les représentations de Lineweaver-Burk ( $1/V=f(1/S)$ ) en absence et en présence de deux concentrations de chaque inhibiteur. Différents modes d'action ont été trouvé pour chaque inhibiteur.

Pour la PPO de deglet Nour et de Ghars aucun effet de substrat n' a été remarqué et des mécanismes similaires ont été observés dont un mécanisme compétitif en utilisant l'acide ascorbique, un mécanisme incompétitif en utilisant le métabisulfite de sodium, tandis qu'un mécanisme non compétitif a été obtenu en présence de L-cystéine et de fluorure de sodium.

En revanche ,pour les PPOs de Tadela et celle de Tantbouchet, des mécanismes différents ont été observés en changeant le substrat.

D'une part un mécanisme mixte type 1, compétitif, Incompétitif et Noncompétitive ont été remarqués en présence de Métabisulfite de sodium, l'acide ascorbique, le fluorure de sodium et la L-cystéine en utilisant le catéchol comme substrat alors qu'en utilisant le pyrogallol comme substrat un mode d'inhibition compétitif a été observé pour l'acide ascorbique et le fluorure de sodium, un mode mixte type 1 pour L-cystéine et un mode non-compétitif en présence de Metabisulfite de sodium.

Les résultats ainsi obtenus sont montrés dans les figures 35,36,37 et 38 pour l'effet de l'acide ascorbique, L-cystéine, fluorure de sodium et métabisulfite de sodium sur les PPOs des dattes, respectivement en utilisant le catéchol et le pyrogallol comme substrats.

Ainsi ,les valeurs de constantes d'inhibitions  $K_I$  et le coefficient de détermination ( $R^2$ ), les valeurs des  $V_{max}$  et  $K_m$ , le mode d'action pour chaque inhibiteur ont été aussi estimées.

Selon les résultats obtenus, on remarque que le mode d'action et le pouvoir de ces inhibiteurs diffèrent d'une source à une autre .

Il est dépendant de substrat utilisé dans ce travail (catéchol et/ou pyrogallol) pour le cas des PPOs de tadela et Tantbouchet tandis que il indépendant pour le cas des PPOs de Deglet nour et Ghars. Une telle étude d'inhibition permet de comprendre le comportement cinétique de l'enzyme vis-à-vis de certains inhibiteurs souvent utilisés en industrie alimentaire et la mise en place par la suite d'une stratégie efficace de prévention contre le phénomène de brunissement enzymatique.

### a) Inhibition par l'acide ascorbique

Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence d'acide ascorbique, en utilisant le catéchol et le pyrogallol comme substrats pour les PPOs des dattes sont représentés dans la figure 36.

La représentation graphique de  $1/V_0$  en fonction de  $1/[S]$  est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, et qui se croisent l'une sur l'autre sur l'axe des ordonnées. La valeur de  $V_{max}$  demeure constante tandis que, la valeur de  $K_m$  augmente avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. Ceci indique que, l'acide benzoïque et l'acide ascorbique sont considérés comme des inhibiteurs compétitifs de l'activité O-diphénolase triphénolase des PPOs des dattes.

L'acide ascorbique se comporte comme un inhibiteur compétitif des PPOs des dattes pour les deux activités des PPOs des dattes. Un tel inhibiteur se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat. Un schéma simplifié de la fixation de l'inhibiteur compétitif est montré dans la figure 35.

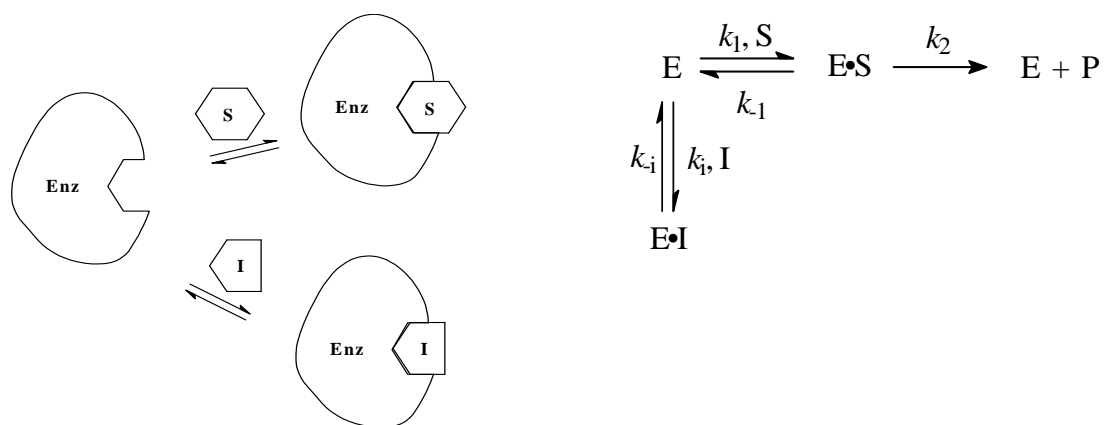


Fig 35 : Schéma simplifié de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitive (Cornish-Bowden et al., 2005)

De même l'équation de Lineweaver-Burk pour l'inhibition compétitive s'écrit comme suit:

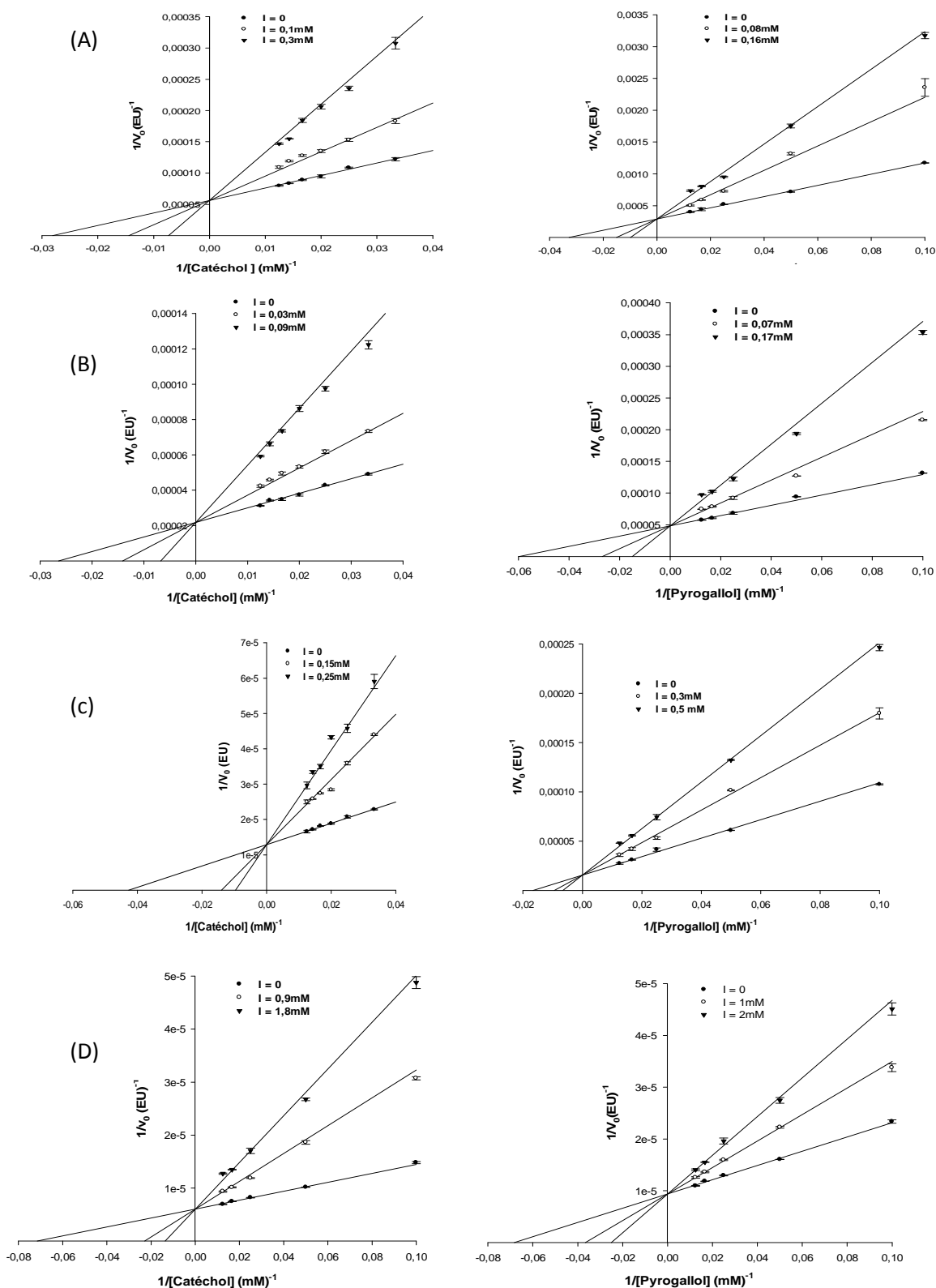
$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{\alpha K_m}{V_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Avec :

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

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

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



**Fig 36 :** Représentations de Lineweaver-Burk de l'inhibition de des PPO des dattes par l'acide ascorbique.(A) PPO de deglet Nour,(B) PPO de Ghars,(C) PPO de Tadela et (D) PPO de Tantbouchet

Les constantes d'inhibition ( $K_I$ ) pour l'acide ascorbique, en utilisant le catéchol comme substrat sont 0.116 mM, 0.034mM,0.072 mM et 1.04 mM pour deglet Nour,Ghars,Tadela et Tantbouchet ,respectivement tandis qu'en utilisant le pyrogallol des valeurs de constantes d'inhibition équivalentes à 0.068mM,0.059Mm ,0.3952mM et 1.160mM ont été obtenues, respectivement.

Les résultats ainsi obtenus sont récapitulés dans le tableau 37.Les valeurs de  $K_I$  obtenus sont en accord avec les interprétations déduites pour les valeurs d'IC<sub>50</sub>.L'activité triphénolase semble être plus sensible que l'activité catécholase et est variable en fonction de source utilisée dont la PPO de Tantbouchet a présenté plus de résistante suivie de celle Tadela PPO ,la PPO de Deglet Nour et celle de Ghars.

**Tableau 37:**Paramètres cinétiques de l'inhibition compétitive des PPOs des dattes par l'acide ascorbique

Substrat	Paramètres cinétiques	Variétés			
		Deglet Nour	Ghars	Tadela	Tantbouchet
Catéchol	[I](mM)	0 0.1 0.3	0 0.03 0.09	0 0.15 0.25	0 0.9 1.8
	$K_i$ (mM)	0.116±0,010	0.0341±0,0001	0.0727±0,0001	1.044±0,0424
	KIS(mM)	-	-	-	-
	$K_{is}/K_i$	-	-	-	-
	$K_m$ (mM)	36.65±1.58 69.88±2.17 138.93±4,55	37.78±1.11 71.65±1.93 151.50±3,79	20.39±2.24 75.09±3.11 103.68±4,17	14.63±2.24 75.09±3.11 103.68±4,17
	Vmax (EU)	17799.96±10.65	45946.023±15.63	77618,708±27.56	171150,708±16.31
Pyrogallol	[I] (mM)	0 0.08 0.16	0 0.07 0.17	0 0.3 0.5	0 1 2
	$K_i$ (mM)	0.068±0,000	0.059±0.0004	0.3952±0.0025	1.160±0.0470
	$K_s$ (mM)	-	-	-	-
	$K_{is}/K_s$	-	-	-	-
	$K_m$ (mM)	37,34±2.43 60.19±2.76 104.30±3.12	17.68±1.34 37.813±2.06 67.24±2,99	72,94±144 111.38±2.81 150.12±4,09	14.63±1.39 27.45±1.87 39.96±2.13
	Vmax (EU)	3453,53±8.65	20 630,71±13.45	64056,720±20.67	99065,59±18.55

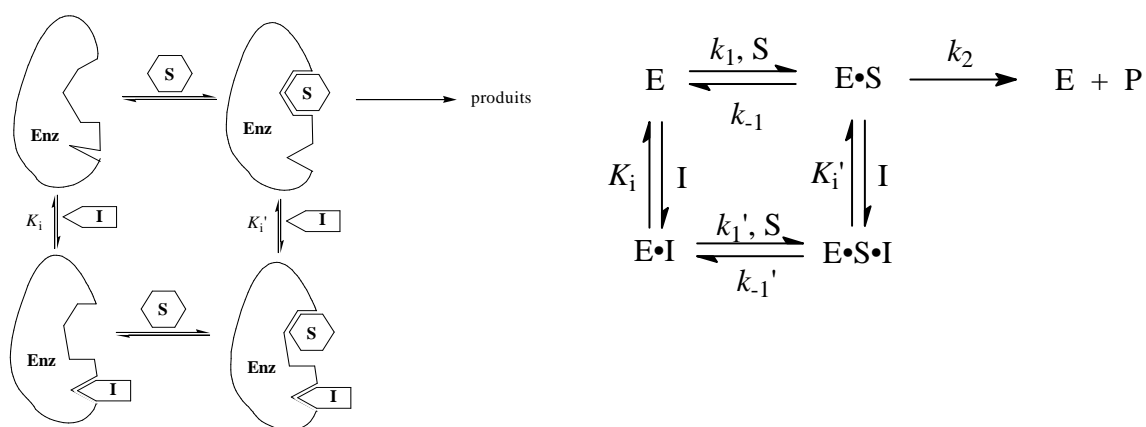
Les résultats trouvés, montrent que cet inhibiteur provoque une diminution significative de l'activité enzymatique de la PPO et que leur pouvoir inhibiteur, dépend non seulement de sa concentration dans le milieu réactionnel, mais aussi de la concentration du substrat utilisé.

Dans la littérature, des mécanismes différents ont été rapporté lors de l'inhibition des PPOs par l'acide ascorbique.

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés pour la PPO extraite d'artichauts (*Cynara scolymus L.*) (Tülin, 2004), et pour la PPO de Bourache dont Alici et Arabaci.(2016) ont rapporté un mécanisme incompétitif et compétitif en utilisant le 4-méthylcatéchol le pyrogallol comme substrats. De même, Dogan et *al.*(2011) ont observé un mécanisme compétitif, incompétitif et mixte pour la PPO de mélisse en utilisant le pyrogallol, le catéchol et le 4-méthylcatéchol ,respectivement Tandis que ,Batista et al(2014) ont rapporté un mécanisme incompétitif pour la PPO de Lobeira en utilisant le catéchol comme substrat.

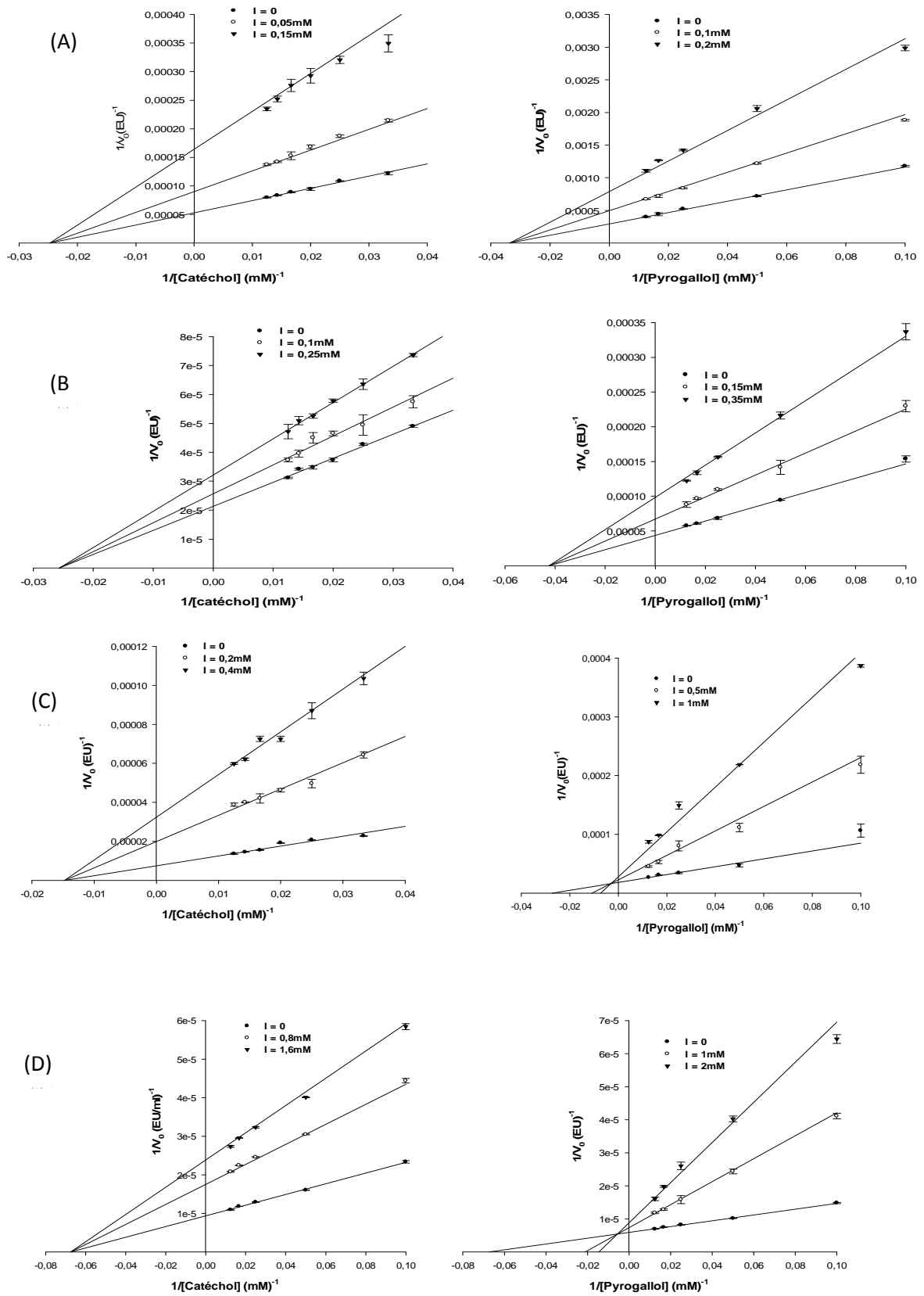
**b) Inhibition par L-cystéine**

L'inhibition de l'activité des PPO des dattes par la L-cystéine a été étudiée (figure 38). Cet inhibiteur agit tant qu'inhibiteur non compétitif avec une diminution des valeurs de  $V_{max}$  et sans effet sur le  $K_m$ . Il peut se fixer sur l'enzyme libre et également sur le complexe enzyme-substrat (ES). En effet, l'inhibition résulte de leur fixation indépendante de celle de substrat sur le site enzymatique. Un schéma simplifié compétitive de l'inhibition est donné ci-dessous :



**Fig 37** : Schéma simplifié de type Michaelis-Menten de l'inhibition noncompétitive (Cornish-Bowden et *al.*,2005)





**Fig 38 :** Représentations de Lineweaver-Burk de l'inhibition de des PPO des dattes par le L-Cystéine.(A) PPO de deglet Nour,(B) PPO de Ghars,(C) PPO de Tabela et (D) PPO de Tantbouchet

Les affinités de liaison exprimées par les constantes d'équilibres  $K_{IS}$  pour L-cystéine (Tableau 38) sont de 0.071 ,0.492 ,0,120 et 1.033 Mm pour l'activité catécholase tandis que pour l'activité triphénolase, des valeurs de 0.130 mM , 0.279 mM , 1.86 et 4.01mM ont été trouvées pour les PPOs de Deglet Nour,Ghars,Tadela et celle de tantbouchet ,respectivement.

**Tableau 38** :Paramètres cinétiques de l'inhibition des PPOs des dattes par L-cystéine .

Mécanisme		Noncompétitive			
Substrat	Paramètres	Deglet Nour	Ghars	Tadela	Tantbouchet
Catéchol	[I](mM)	0 0.05 0.15	0 0.1 0.25	0 0,2 0,4	0 0,9 1,8
	$K_i$ (mM)				
	$K_{IS}$ (mM)	0.071±0,003	0,492±0,002	0.120±0,003	1,033±0.013
	$K_{is}/K_i$	1±0,2	1±0,4	1±0,2	1±0,01
	$K_m$ (mM)	40,42±2.45	38,94 ±3.22	77.56±5.2	8,15±8,21
Vmax (EU)		18 869,95±27.72 11054.13±12.79 6074.22±8.16	46885,87 ±36.46 38840.53±19.38 30814.93±13.44	133650.15±31.77 0.12±0,01 0.08±0,007	106805.14±39.84 57316.11±27.69 41813.88±19.11
	Mécanisme	Noncompétitive		Mixte Type 1	
	[I] (mM)	0 0.1 0.2	0 0.15 0.35	0 0.5 1	0 1 2
Pyrogallol	$K_i$ (mM)	1±0,2	1±0,4	0,212±0,045	0,338±0,02
	$K_s$ (mM)	0.130±0,003	0,279±0,008	1.86±0,07	4.01±0,75
	$K_{is}/K_s$	1±0,2	1±0,2	4.59±2,42	4.59±2,42
	$K_m$ (mM)	35,72±1.59	23,58±1.11	56,43±0,97 105.77±2 ,55 144.65±3.79	14,80±1.3 48.463±2 ,98 70.44±3.82
	Vmax (EU)	3416.66±20.75 2023.34±10.32 1280.92±6.55	22879,47 ±22.11 15264.61±15.66 10191.60±10.18	54600,12±33.90 44214.52±24.69 35105.73±15,87	168800,59±29.20 134857.58±16.33 113406.20±11.05

Un mécanisme noncompétitif a été retrouvé pour les deux activités catécholase et triphénolase des PPOs de Deglet Nour et Ghars laissant supposer une indépendance d'inhibition par rapport au substrat.

Dans le cas de la PPO de Tadela et Tantbouchet, l'effet de substrat était flagrant avec des mécanismes différents. Un mécanisme noncompétitif en utilisant le catéchol a été obtenu tandis qu'en présence de pyrogallol une inhibition mixte a été retrouvée.

L'inhibiteur mixte peut se fixer aussi bien sur la forme enzymatique libre que sur la forme enzymatique liée au substrat mais à l'inverse de mécanisme noncompétitif, la liaison à l'enzyme affecte son affinité au site enzymatique pour le substrat et vice versa.

Des rapports de  $K_I$  équivalent à 2.14, 14.30 et 30.80 pour la PPO de Deglet Nour, Tadela et Tantbouchet par rapport à la PPO de la variété la plus sensible (Ghars) ont été trouvés.

Différents mode et mécanismes des PPOs par la L-cystéine ont été rapporté. Nos résultats sont en accord avec ceux de Zhou et *al.* (2018) pour la PPO de poire dont ils ont rapporté un mécanisme noncompétitif en présence de L-cystéine comme inhibiteur alors que Alici et Arabacia. (2016) ont trouvé un mécanisme compétitif avec le pyrogallol et mixte avec le 4-méthylcatéchol comme substrats pour la PPO de Bourache.

De même, Lim et Wong. (2018) ont observé un mécanisme incompétitif et mixte en utilisant le pyrogallol et le 4-méthylcatéchol, respectivement.

### **c) Inhibition par le fluorure de sodium.**

L'étude de l'inhibition de l'activité enzymatique des PPO des dattes en présence de fluorure de sodium a révélé trois mécanismes d'action différents en fonction de la source d'enzyme et le substrat utilisé (figure 40).

Le fluorure de sodium agit à la fois comme un inhibiteur non compétitif lors de l'oxydation de catéchol et pyrogallol par les PPOs de Deglet Nour et Ghars alors qu'un mécanisme incompétitif et compétitif ont été observé pour l'activité catécholase et triphénolase, respectivement pour les PPOs de Tadela et Tantbouchet.

Lors de mécanisme compétitif, l'affinité demeure constante tandis qu'une diminution de la vitesse de réaction s'installe, alors que dans le cas d'une compétition la vitesse reste stable et que l'affinité se perd au fur et à mesure que l'inhibiteur est présent et sa concentration s'augmente. L'inhibiteur incompétitif à son tour, affecte à la fois les vitesses et les affinités, et ça se traduit graphiquement par des droites parallèles confirmant son mode d'action met en jeu sa fixation sur la forme d'enzyme liée au substrat. La liaison du substrat induit un changement de conformation sur l'enzyme ce qui permet à l'inhibiteur

d'augmenter son affinité pour l'enzyme. (Benaceur et al., 2018)

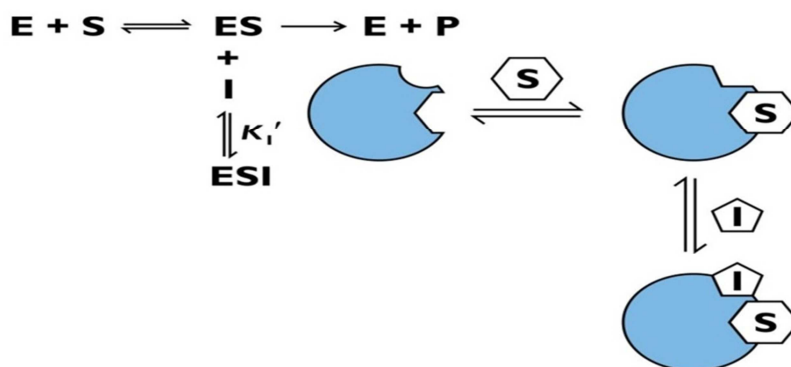
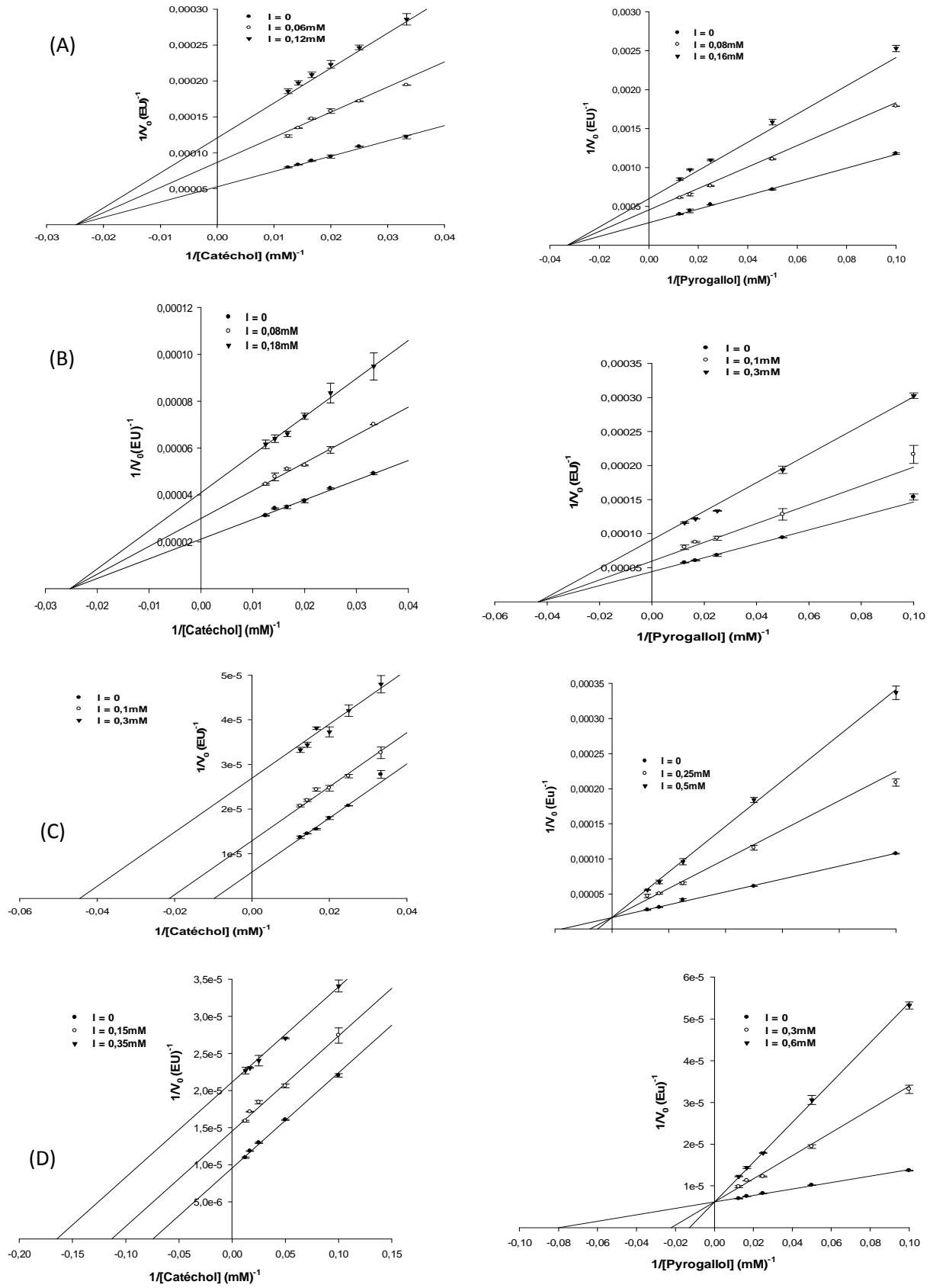


Fig 39 : Schéma simplifié de type Michaelis-Menten de l'inhibition incompétitive (Cornish-Bowden et al., 2005)

Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans le tableau 39 et la figure 40.

Tableau 39: Paramètres cinétiques de l'inhibition des PPOs des dattes par le fluorure de sodium

Substrat	Mécanisme	Noncompétitive		Incompétitive	
		Deglet Nour	Ghars	Tadela	Tantbouchet
Catéchol	[I](mM)	0 0.06 0.12	0 0.08 0.18	0 0,1 0,3	0 0,15 0,35
	$K_i$ (mM)				
	$K_{is}$ (mM)	0.093±0,001	0,192±0,004	0.084±0,005	0,289±0.007
	$K_{is}/K_i$	1±0,2	1±0,4	1±0,2	
	$K_m$ (mM)	39,27±2.34	39,63±2.19	91.52±4.71 46.61±2.88 22.39±1.42	6.8±1.45 4.80±0.97 3.60±0.56
	$V_{max}$ (EU)	18 923,280±24.22 11422.40±18.46 8200.11±10.79	47215,485±29.95 33351.56±21.59 24255.83±19.43	168500.33±31.77 76089.59±23.15 37038.13±17.11	104589.18±25.71 69850.93±14.25 49603.36±10.79
Pyrogallol	Mécanisme	Noncompétitive		compétitive	
	[I] (mM)	0 0.1 0.2	0 0.1 0.3	0 0.25 0.5	0 0.3 0.6
	$K_i$ (mM)	1±0,2	1±0,4		0,115±0,005
	$K_s$ (mM)	0.130±0,003	0,284±0,015	0,196±0,013	
	$K_{is}/K_s$	1±0,2	1±0,2		
	$K_m$ (mM)	35,72±1.59	25,09±1.33	58,42±1.59 135.71±2 ,87 214.516±3.25	12,49±0.66 45.52±1.92 78.98±2.49
$V_{max}$ (EU)	3416.66±20.75 2023.34±10.32 1280.92±6.55	24 595,27±25.48 16293.22±13.45 11060.50±8.76	61 563,38±34.23	162380,158±30.45	



**Fig 40** : Représentations de Lineweaver-Burk de l'inhibition de des PPO des dattes par le fluorure de sodium .(A) PPO de deglet Nour,(B) PPO de Ghars,(C) PPO de Tadela et (D) PPO de Tantbouchet.

Dans la littérature, il y a peu d'étude qui ont rapporté le mécanisme d'action de fluorure de sodium sur l'activité de PPO, ce qui rend notre étude aussi bien originale en terme de source d'enzyme, activités traitées ainsi que le choix de l'inhibiteur testé.

Gouzi et *al.*(2007) ont étudié en détail l'inhibition de la PPO partialement purifiée de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) en utilisant plusieurs inhibiteurs y compris le fluorure de sodium. Un mécanisme mixte a été observé en utilisant le pyrogallol comme substrat avec une inhibition dépendante du pH impliquant entre autres trois acteurs : les résidus de l'histidine, les anions  $F^-$  et le cuivre de site actif.

De même, Robert et *al.*(1998) ont signalé l'inhibition de la PPO de coeur de palmier par les sels d'halogénure. Ils ont trouvé un mécanisme d'action non compétitif en présence de catéchol comme substrat.

### **c) Inhibition par le métabisulfite de sodium**

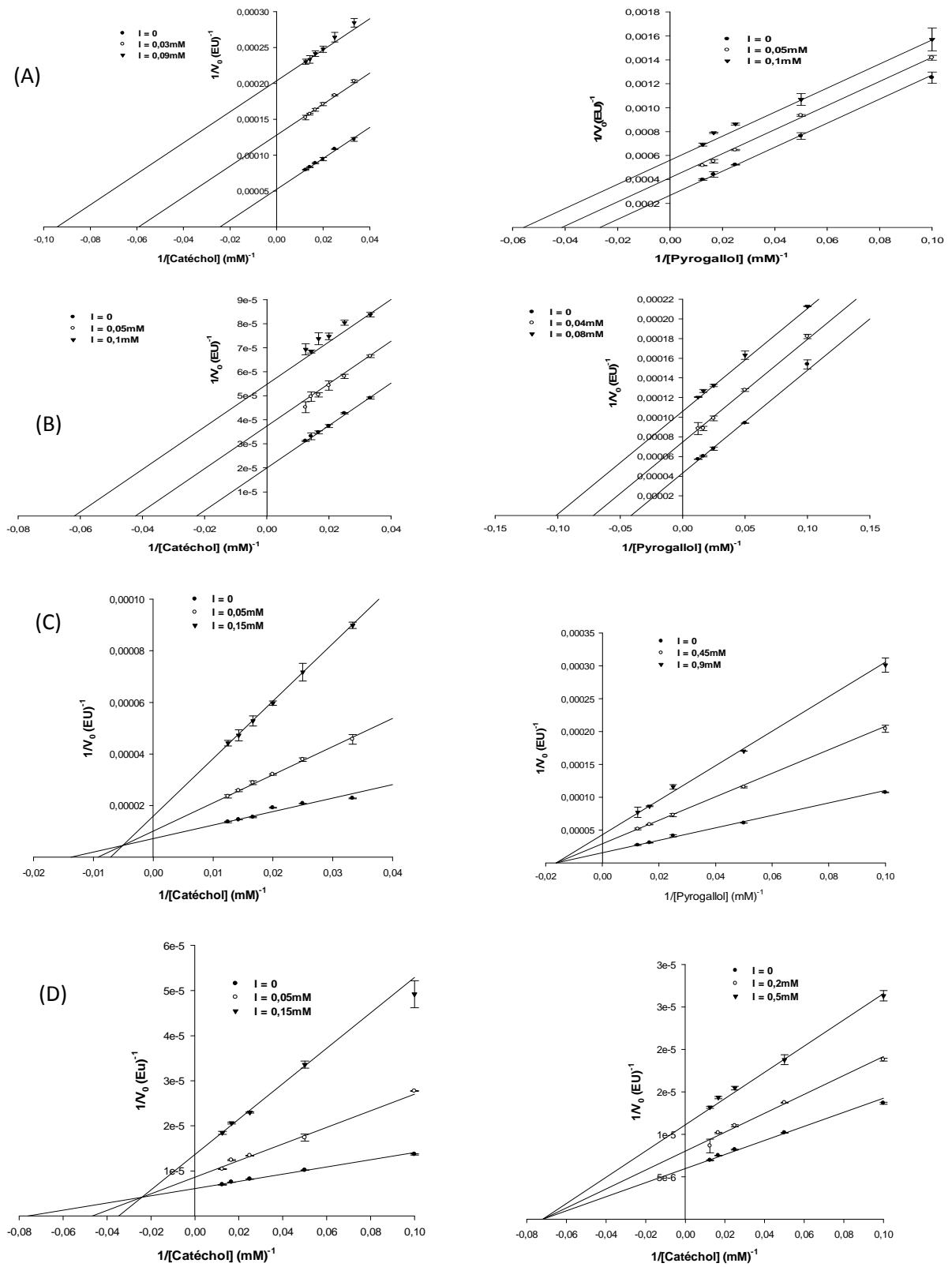
Le métabisulfite de sodium est souvent utilisé en industrie agroalimentaire pour la conservation et le contrôle de brunissement enzymatique de fruits. Leur toxicité limite son utilisation à une concentration élevée mais son efficacité est indiscutable.

En étudiant l'effet de métabisulfite de sodium sur les quatre enzymes des dattes, nous avons remarqués des modes d'actions différents avec aussi une efficacité et/ou valeurs de  $K_I$  variables.

Nous avons obtenu des valeurs de  $K_I$  équivalentes à 0.0208, 0,0577, 0.0459 et 0.0385 mM pour l'activité catécholase, de même, lors d'oxydation de pyrogallol, les valeurs de la constante d'inhibition ( $K_I$ ) ainsi obtenues étaient 0.0914, 0.0549, 0,507 et 0,578 mM, respectivement en présence de la PPO de Deglet Nour, Ghars, Tadela et celle de Tantbouchet, respectivement.

De plus, nous avons obtenu un mode d'action incompétitif typique pour les PPOs de Deglet Nour et Ghars quoique soit le substrat utilisé avec plus d'efficacité sur l'activité triphénolase. Une inhibition de type mixte en présence de catéchol et de type compétitif en présence de pyrogallol ont été obtenus pour les PPO de Tadela et celle de Tantbouchet.

La fixation d'un tel inhibiteur sur le site actif affecte l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat, de même une telle fixation peut se faire soit sur la forme enzymatique libre soit sur la forme enzymatique liée au substrat. Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans le tableau 40 et la figure 41.



**Fig 41** : Représentations de Lineweaver-Burk de l'inhibition de des PPO des dattes par le fluorure de sodium.(A) PPO de deglet Nour,(B) PPO de Ghars,(C) PPO de Tadela et (D) PPO de Tantbouchet

**Tableau 40:** Paramètres cinétiques de l'inhibition des PPOs des dattes par le métabisulfite de Sodium

Substrat	Mécanisme	Incompétitive		Mixte Type 1		
	Paramètres	Deglet Nour	Ghars	Tadela	Tantbouchet	
Catéchol	[I](mM)	0 0.03 0.09	0 0.1 0.25	0 0,05 0,15	0 0,05 015	
	K <sub>i</sub> (mM)	-	1±0,4			
	K <sub>I</sub> S(mM)	0.0208±0.0004	0,0577±0,003	0.0459±0,007	0.0385±0.0004	
	K <sub>i</sub> s/K <sub>i</sub>	-		1±0,2	3,14 alpha	
	K <sub>m</sub> (mM)		41.18±3.98	43,98±2.61	72,60±3.69	10,13±0.95
			16.85±2.59	25.05±1.43	108.66±4.97	21.85±1.22
		10.62±1.07	15.38±1.10	143.55±5.63	29.29±1.53	
V <sub>max</sub> (EU)		19059,74±21.74	49605,46±18.20	138950.79±29.54	108589.10±36.79	
		7799.46±14.11	27641.03±15.66	100848.43±18,15	86356.82±25.13	
		4898.14±9.75	17174±10.18	62786.06±12.89	48885.80.±19.11	
	Mécanisme	Incompétitive		Compétitive		
Pyrogallol	[I] (mM)	0 0.05 0.1	0 0.04 0.08	0 0.45 0.9	0 0.2 0.4	
	K <sub>i</sub> (mM)	-	1±0,4	0,507±0,016	0,578±0,03	
	K <sub>S</sub> (mM)	0.0914±0.0057	0.0549±0,001	0,507±0,016	0,578±0,03	
	K <sub>i</sub> s/K <sub>s</sub>	-				
	K <sub>m</sub> (mM)		38.50±1.72	24,21±1.23	61.22±2.37	13,88±1.09
			24.44±1.25	14.07±1.01		
		17.86±0.98	9.88±8.38			
V <sub>max</sub> (EU)		3731,190±9.05	23167,198±24.85	64541,93±42.48	167560,87±35.89	
		2424.33±7.79	13363.44±13.61	34628.79±29.33	124684.70±24.28	
		1787.35±5.11	9477.77±7.57	22938.19±17,69	89049.57±17.67	

Dans la littérature, plusieurs travaux ont rapporté le contrôle de brunissement enzymatique par cet inhibiteur. Batista et *al.*(2014) ont trouvé un mécanisme incompétitif pour la PPO de Lobéira en utilisant le catéchol ,de même un mécanisme incompétitif et compétitif ont été obtenus pour la PPO de bourache en utilisant le pyrogallol et le 4-méthylcatéchols comme substrats, respectivement.(Alici et Arabaci.,2016).

Lim et Wong.(2018) à leur tour ont rapporté un mécanisme non compétitif en présence de 4-méthylcatéchol et catéchol comme substrats et ceci pour la PPO de gingembre.

Nous remarquons que pour les PPOs de Deglet Nour et Ghars,le choix de substrat n'affecte pas le mode d'action de l'inhibiteur tandis que son effet est remarquable pour les deux autres variétés.



L'efficacité est donc fonction de la source d'enzyme, l'inhibiteur et le substrat choisis. L'obtention des mécanismes distincts pour les PPOs des dattes confirme outre la différence des propriétés catalytiques et biochimiques, la variabilité de conformation structurale entre les quatre enzymes dont le mode de fixation de l'inhibiteur et/ou de substrat diffère d'une enzyme à une autre en fonction de leur affinité au site actif qui est elle-même dépendante de la localisation de site actif et son accessibilité. Une telle hypothèse peut être probablement soutenue par l'obtention des valeurs de  $K_I$  incomparables et sa confirmation nécessite de faire recours au moyen de cristallographie X-Ray.

#### **5.4.5 Inactivation thermique des PPOs des dattes**

##### **5.4.5.1 Etude cinétique**

Dans le but de suivre la cinétique d'inactivation et déterminer les paramètres thermodynamiques de l'inactivation thermique des PPOs des dattes, l'activité enzymatique a été suivie à pression atmosphérique en utilisant le catéchol et le pyrogallol comme substrats dans l'intervalle des températures compris entre 65 à 80° (Incréments de 5°C).

Les représentations graphiques de la cinétique d'inactivation montrent que la cinétique d'inactivation des PPOs de Ghars, Tadela et Tantbouchet suivent une cinétique de premier ordre ce qui est le cas fréquemment rapporté pour les PPOs des fruits et légumes y compris la PPO de radis (Goyeneche et *al.*, 2013), de Lobéira (Batista *al.*, 2014), de l'ananas (Chutintrasri et Noomhorm., 2006; Dhakal et *al.*, 2018), celle de l'igname de pied d'éléphant (Singh et Wadhwa., 2017) et aussi pour le Jaquier (Tao et *al.*, 2018).

En revanche, l'inactivation thermique de la PPO de Deglet Nour a été décrite par un modèle biphasique suggérant la présence de deux fractions, une sensible et l'autre résistante. Ce comportement biphasique est principalement attribué à la présence d'isoenzymes de structure similaire mais présentant une résistance différente à la température (Yoruk et Marshall, 2003). Le modèle biphasique d'inactivation par la température pour les PPOs a déjà été utilisé avec celle du raisin blanc de Victoria et celle des fraises d'Elsanta (Dalma-di et *al.*, 2006; Sulaiman et *al.*, 2015).

L'inactivation biphasique est un processus à plusieurs étapes incorporant la formation d'agrégats thermostables ou d'intermédiaires stables. (Sulaiman et *al.*, 2015). Les valeurs des constantes d'inactivation des PPOs des dattes ont été estimées en exploitant la pente de la régression linéaire du  $\log(A_t/A_0)$  en fonction du temps (Tao et *al.*, 2018).

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

La description de l'inactivation thermique de la PPO de Deglet Nour par le modèle biphasique est montré dans les figures 42 et 43 en utilisant le catéchol et le pyrogallol, respectivement tandis que les courbes d'inactivation des PPOs de Ghars ,Tadela et Tantbouchet suivant le modèle de premier ordre sont regroupés dans les figures 44 et 45 en utilisant ainsi el catéchol et le pyrogallol, respectivement

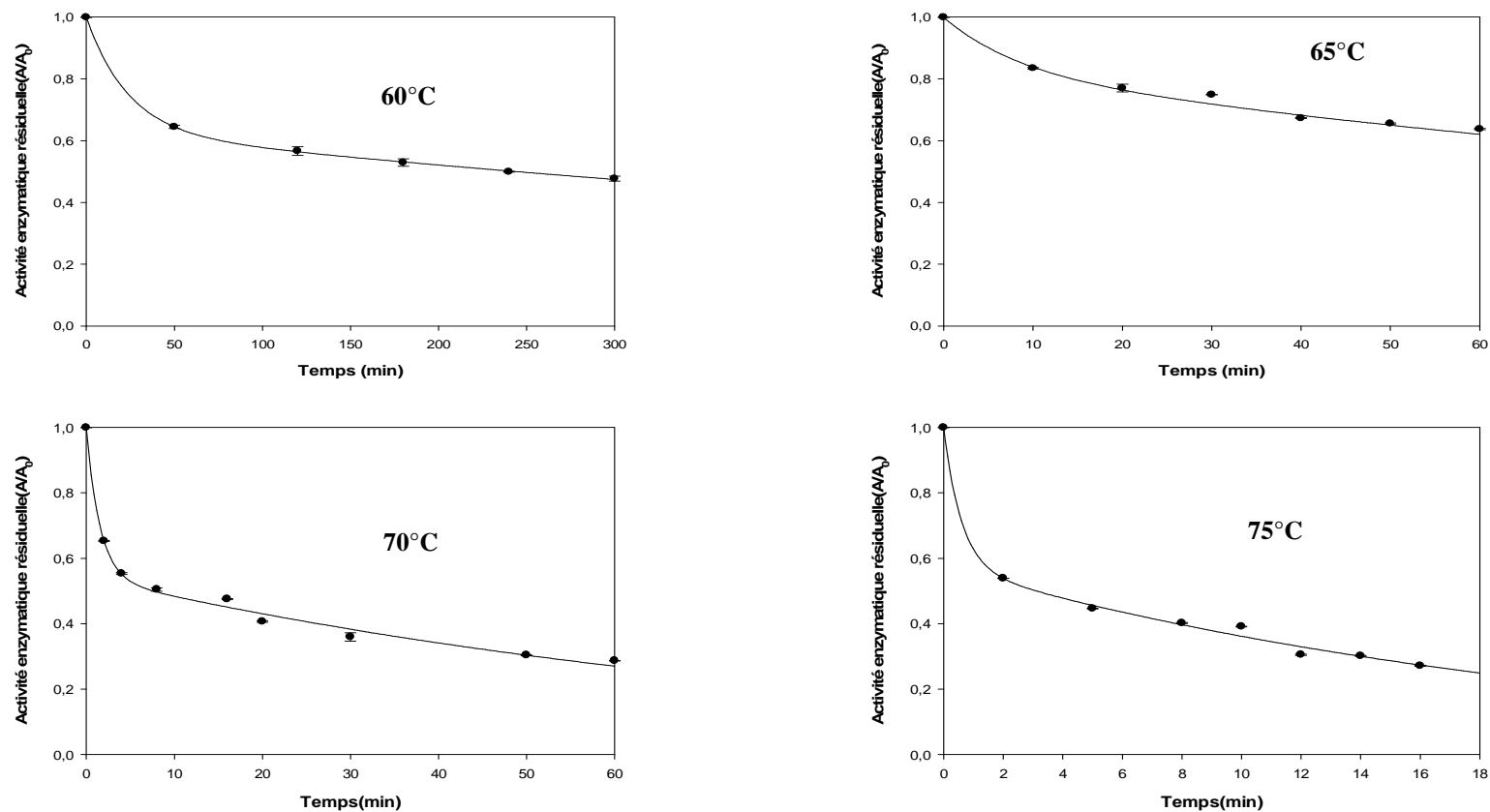


Fig 42 :Les graphes de l'inactivation thermique de la catéchol oxydase de Deglet Nour dans des températures comprises entre 60-75°C

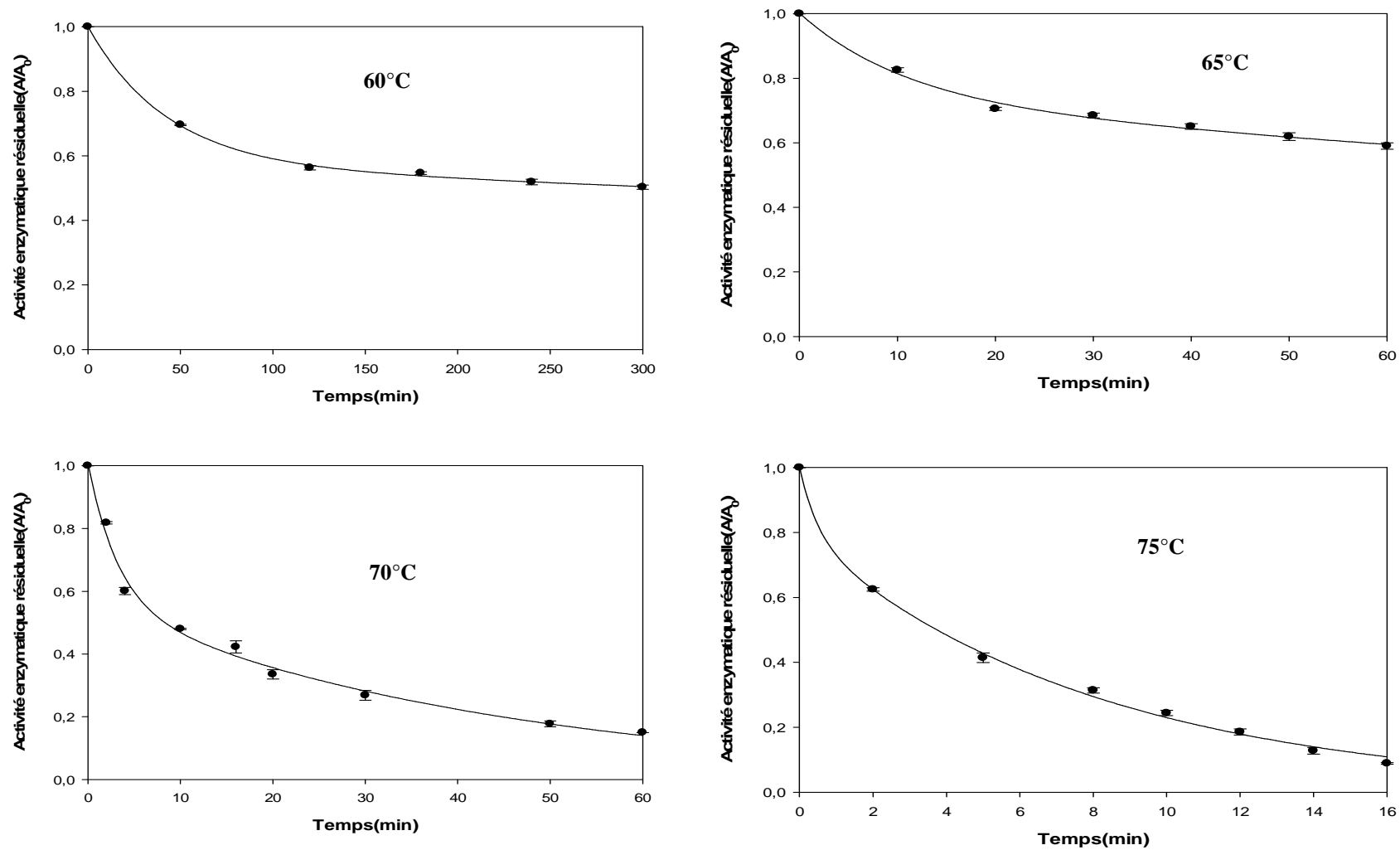


Fig 43 : Les graphes de l'inactivation thermique de l'oxydation de pyrogallol de Deglet Nour dans des températures comprises entre 60-75°C .

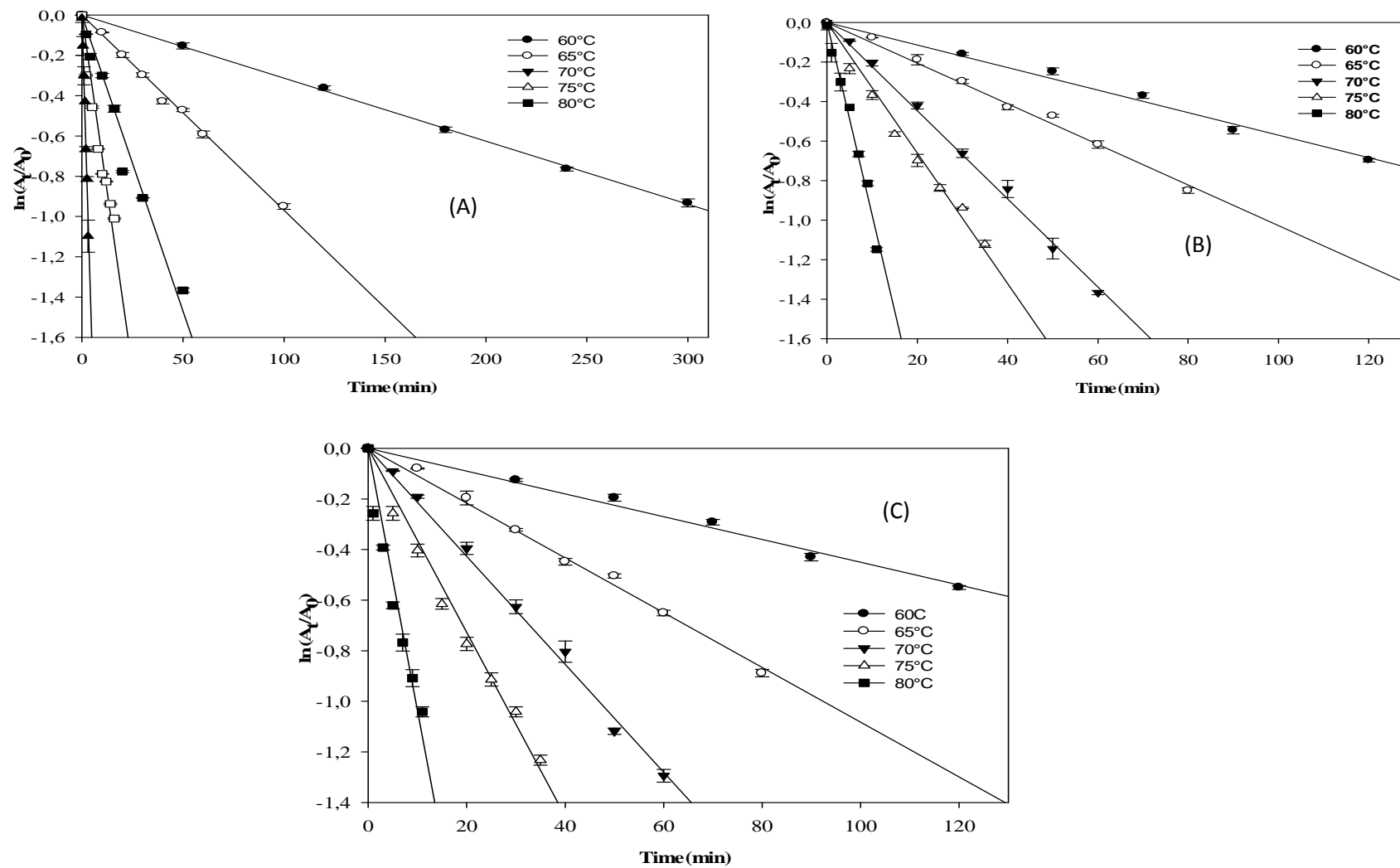
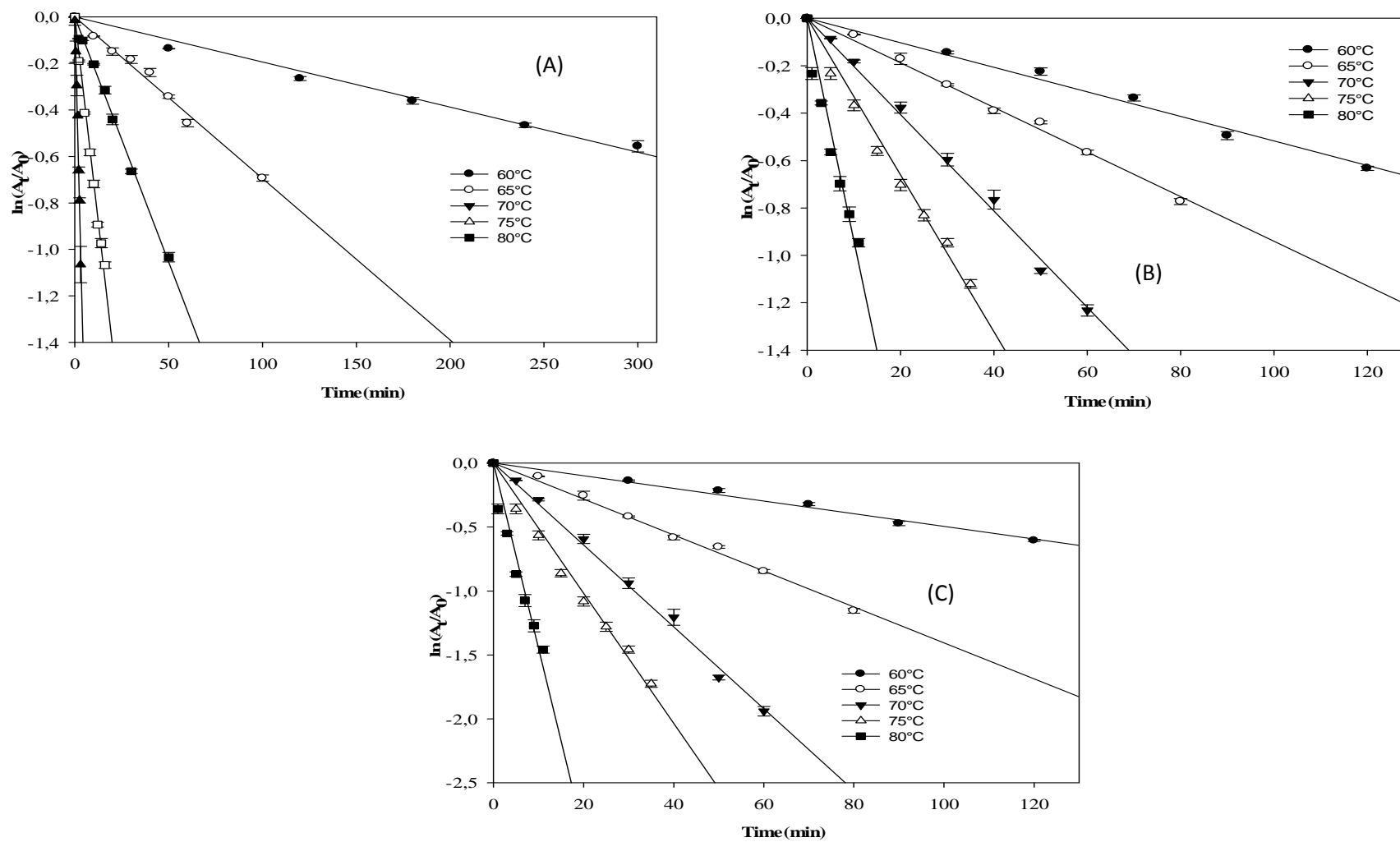


Fig 44: Les graphes de l'inactivation thermique de la catéchol oxydase des dattes dans des températures comprises entre 60-80°. (A) Ghars PPO, (B) Tadelá PPO et (C) Tant-bouchet.



**Fig 45** : Les graphes de l'inactivation thermique de l'oxydation de pyrogallol par les PPOs des dattes dans des températures comprises entre 60-80°. (A) Ghars PPO, (B) Tadela PPO et (C) Tantbouchet

Dans la gamme de températures étudiée, une cinétique d'inactivation fractionnelle biphasique a été remarquée pour la PPO de deglet Nour quelque soit le substrat utilisé dont une inactivation très rapide d'une fraction labile suivie d'une activité résiduelle constante sur une durée de traitement prolongée a été observée. La fraction stable restante après l'inactivation initiale de la phase labile dépend de la température. L'inactivation des trois autres enzymes semble être plus simple avec la présence d'une seule fraction homogène.

Le taux d'inactivation est d'autant plus élevé avec l'augmentation de température et la durée de traitement. Pour la PPO de deglet Nour, l'inactivation a commencé à 70 ° C et, après 30 minutes de traitement thermique, l'enzyme a conservé environ 30 et 35% des activités initiales triphénolase et diphénolase, respectivement. Lorsque l'enzyme a été exposée à 75 ° C pendant 8 minutes, seulement 30 et 40% de son activité initiale a été conservée avec le catéchol et le pyrogallol, respectivement.

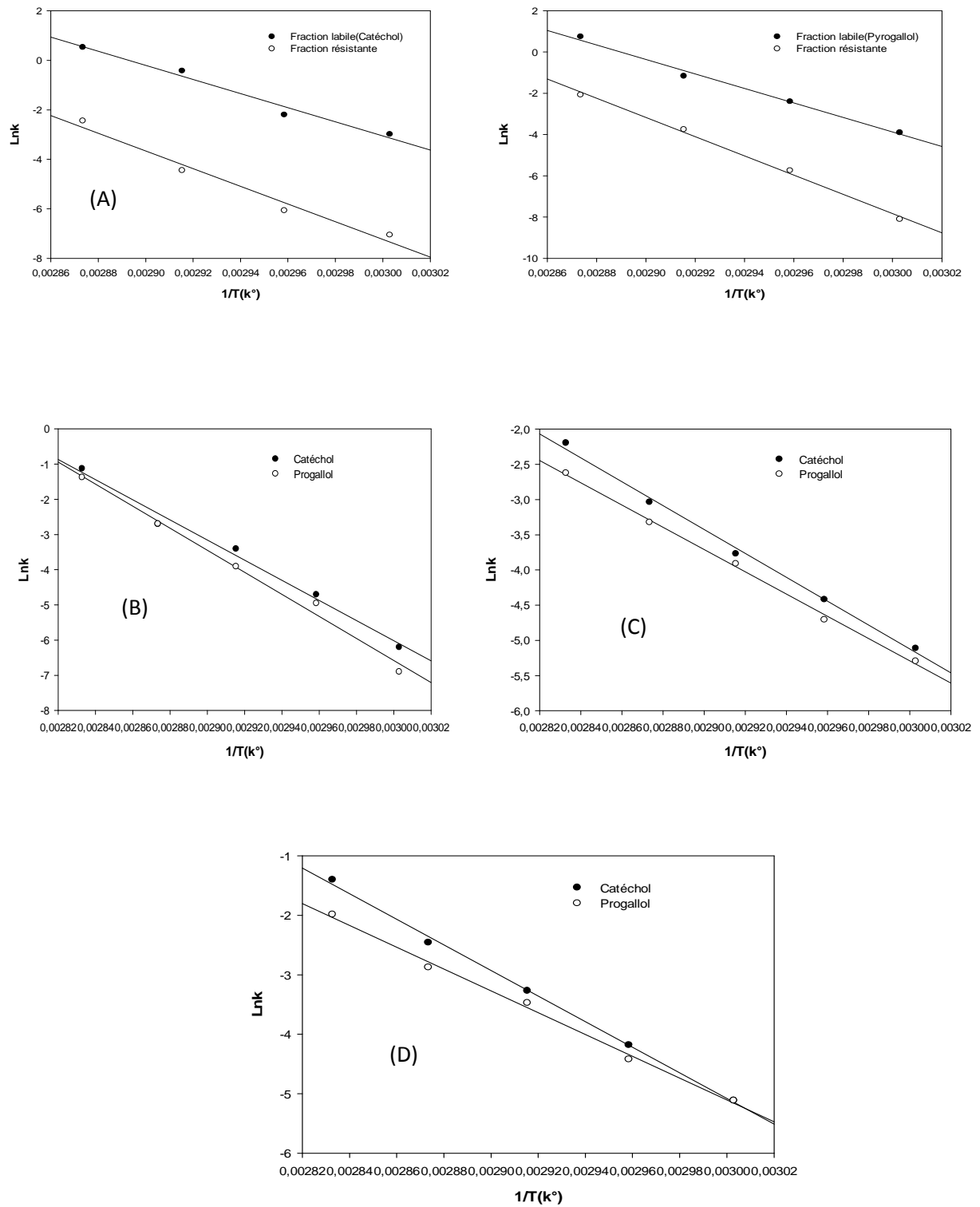
Pour les PPOs de Ghars, Tadela et Tantbouchet, l'inactivation semble être différente et est dépendante de la source d'enzyme. La PPO de Ghars a montré plus de sensibilité au effet thermique avec une diminution rapide dans l'activité par rapport aux deux autres. En outre, l'activité catécholase pour les quatre sources d'enzyme révèle plus de stabilité et résistance à l'augmentation de température par rapport à l'activité triphénolase, ce qui est en accord et complémentaires avec les résultats obtenus lors de l'étude de la stabilité thermique.

Pour mieux décrire les cinétiques d'inactivation thermique des PPOs des dattes, nous avons estimés aussi les valeurs de  $D$  et  $t_{1/2}$ . La valeur  $D$  est définie comme étant le temps nécessaire à une température bien déterminée pour réduire l'activité enzymatique initiale ( $A_0$ ) de 10% ou d'une unité logarithmique. Dans les deux modèles cinétiques la valeur  $D$  est inversement proportionnelle à la constante de vitesse d'inactivation ( $k$ ). Le temps de réduction décimale  $D$ , est calculé à partir de l'équation suivante (Tao et *al.*, 2018) :

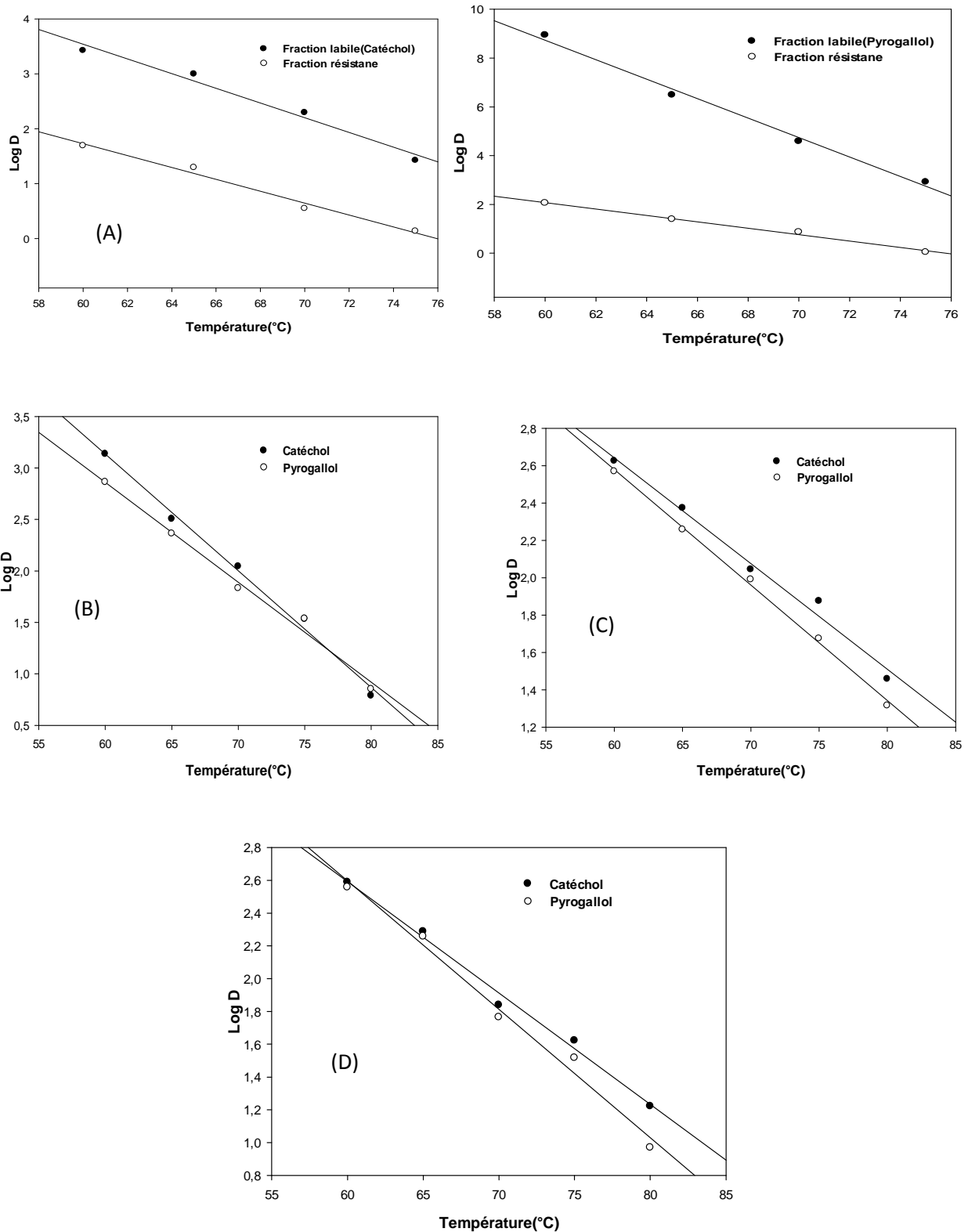
$$D = \frac{2,303}{k}$$

Tandis que les valeur de  $t_{1/2}$ (min) ont été estimée en calculant le rapport entre  $\ln 2$  et la valeur de la constante d'inactivation  $k$ . De même, les valeurs des énergies d'activation des PPOs des dattes ainsi que les valeurs de  $z_t$ (paramètres de sensibilité thermique) ont été déduites en exploitant les graphiques d'Arrhenius (figures 40 et 41) et la pente de la courbe de représentation de  $\log D$  en fonction de la température ( $T$  en °C) (figures 46 et 47), en utilisant le catéchol et le pyrogallol, respectivement.

Les valeurs de paramètres cinétiques ainsi calculées sont regroupées dans les tableaux 41, 42, 43 et 44 pour les PPOs de Deglet Nour, Ghars, Tadela et Tantbouchet.



**Fig 46 :** Les graphiques d' Arrhenius de l'inactivation thermique de l'oxydation de catéchol et pyrogallol par les PPOs des dattes dans des températures comprises entre 60-80°. (A) Deglet Nour (B) Ghars (C) Tadela et (D) Tantbouchet.



**Fig 47** :Les graphiques de variation de réduction décimale avec la température (60-80°) Pour les PPOs des dattes en présence de catéchol et pyrogallol comme substrats .(A) Deglet Nour (B) Ghars (C) Tadela et (D)Tantbouchet.



**Tableau 41** : Paramètres cinétiques d'inactivation thermique pour la PPO de Deglet Nour.

Substrate	T (°C)	Fraction résistante					Fraction labile				
		$K_s$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$D_s$ (min)	$t_{1/2}$ (min)	$Z_T$ (°C)	$Ea_L$ (KJ/mol)	$K_l$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$D_l$ (min)	$t_{1/2}$ (min)	$Z_T$ (°C)	$Ea_s$ (KJ/mol)
Catéchol	60	0.05±0.00	49.20±2.23	14.80±1.57	9.23±0.53	240.50±0.24	0.00086±0.0000	2677.42±1.59	805.98±1.10	7.45±1.74	297.04±0.48
	65	0.11±0.02	19.73±0.98	6.00±0.30			0.0023±0.0000	1001.12±1.35	301.37±0.96		
	70	0.65±0.06	3.53±0.36	1.06±0.11			0.0116±0.0008	198.49±1.18	57.75±0.72		
	75	1.68±0.66	1.36±0.03	0.41±0.01			0.0864±0.0037	26.65±0.92	8.02±0.57		
Pyrogallol	60	0.02±0.00	113.43±2.80	34.14±1.85	7.61±0.38	290.95±0.63	0.0003±0.0001	7675.284±1.459	2310.491±1.141	5.76 ±2.31	348.53±0.39
	65	0.09±0.02	24.92±1.01	7.50±0.30			0.0035±0.0012	657.881±1.188	198.042±0.776		
	70	0.31±0.05	7.42±0.45	2.23±0.13			0.0233±0.0025	98.823±0.992	29.749±0.772		
	75	2.09±1.0	1.10±0.02	0.332±0.01			0.1243±0.0060	18.524±0.838	5.576±0.155		

**Tableau 42** : Paramètres cinétiques d'inactivation thermique pour la PPO de Ghars.

Substrat	Temperature (°C)	$K_L$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$D_L$ (min)	$t_{1/2}$ (min)	$Z_T$ (°C)	$Ea_L$ (KJ/mol)
Catéchol	60	0.003±0.000 <sup>a</sup>	731.636±8.731	220.207±2.629	10.309±0.010	211,464±0,127
	65	0.009±0.000	231.340±2.380	69.627±0.716		
	70	0.033±0.002	68.007±1.019	20.468±0.306		
	75	0.0668±0.003	34.438±0,130	10.365±0.039		
	80	0.323±0.000 <sup>a</sup>	7,126±0.019	2.144±0.005		
Pyrogallol	60	0.001±0.000	1372.547±5,402	413.103±7.577	8.814±0.013	247.532±0.303
	65	0.007±0.000	321,165±4,242	96.663±1.275		
	70	0.020±0.003	110,974±2,117	33.400±0.637		
	75	0.067±0.004	34,199±0.102	10.293±0.030		
	80	0.374±0.016	6,157±0.271	1.853±0.081		

**Tableau 43** : Paramètres cinétiques d'inactivation thermique pour la PPO de Tadela ,

Substrat	Temperature (°C)	$K_L$ ( $min^{-1}$ )	$D_L$ (min)	$t_{1/2}$ (min)	$Z_T$ (°C)	$E_{aL}$ (KJ/mol)
Catéchol	60	0.006±0.000 <sup>a</sup>	371,575±8.565	111,836±2,577	16.17±0.15	135,01±1,59
	65	0.012±0.000	181,029±0,394	54,485±0,118		
	70	0.023±0.001	97,957±1,581	29,482±0,475		
	75	0.048±0.002	47,288±0,716	14,232±0,215		
	80	0.111±0.002	20,677±0,527	6,223±0,158		
Pyrogallol	60	0.005±0.000 <sup>a</sup>	422,39±5.16	127.14±1.55	17.47±0.16	128,64±1,27
	65	0.009±0.000	236,75±0.57	71.25±0.17		
	70	0.020±0.000	111.01±0.62	33.41±0.18		
	75	0.030±0.001	75.07±0.37	22.59±0.11		
	80	0.080±0.003	28.75±0.47	8.65±0.14		

**Tableau 44** : Paramètres cinétiques d'inactivation thermique pour la PPO de Tantbouchet,

Substrat	Temperature (°C)	$K_L$ ( $min^{-1}$ )	$D_L$ (min)	$t_{1/2}$ (min)	$Z_T$ (°C)	$E_{aL}$ (KJ/mol)
Catéchol	60	0.006±0.000 <sup>a</sup>	361.414±8.752	108.843±2.664	12.76 ±0.10	176.675±1.474
	65	0.013±0.000	181.351±7.932	56.686±2.384		
	70	0.038±0.002	58.214±1.801	17.537±0.542		
	75	0.070±0.002	32.895±0.183	9.900±0.055		
	80	0.246±0.03	9.332±0.302	2.811±0.090		
Pyrogallol	60	0.006±0.000 <sup>a</sup>	388.205±18.429	117.195±6.449	14.716±0.22	153.01±4.22
	65	0.012±0.000	193.974±8.027	58.481±2.415		
	70	0.031±0.001	69.106±1.581	20.839±0.915		
	75	0.051±0.003	41.883±2.342	12.645±0.704		
	80	0.137±0.007	16.688±0.048	5.022±0.01		

Nous avons observé que le modèle du premier ordre décrit bien le processus d'inactivation thermique avec une corrélation entre l'augmentation de la température et le taux d'inactivation. Les valeurs de  $k$  et  $D$  sont aussi grandes que la température est élevée. L'effet thermique perturbe la stabilité thermique et provoque un changement de conformation rendant l'enzyme inactive. Un tel effet est d'autant plus rapide et irréversible que le temps d'exposition est long à haute température. Dans la littérature une différence de thermostabilité ont été rapporté dont les valeurs de  $D$  et  $t_{1/2}$  de l'inactivation de certaines PPOs à 70°C étaient comme suit: obtenu de champignon de Paris ( $t_{1/2} = 0.73$  min;  $D = 2.4$  min) (Gouzi et al., 2012), fruit de marula (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra) ( $t_{1/2} = 0.8$  min;  $D = 2.5$  min) (Mdluli., 2005), and Myrica rubra ( $t_{1/2} = 3.86$  min;  $D = 12.87$  min) (Cao et al., 2017), PPO de groseille du Cap ( $t_{1/2} = 19$  min;  $D = 63.2$  min) (Bravo et Osorio.,2016), et le raisin de Sultaniye (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana) ( $t_{1/2} = 18.6$  min;  $D = 61.7$  min) (Unal et al., 2007). En utilisant le catéchol comme substrat. A notre connaissance aucune étude n'a rapporté l'inactivation thermique en utilisant le pyrogallol en raison de la difficulté de manipulation et/ou perte du temps liée à sa vitesse d'oxydation plus ou moins lente par rapport à celle de catéchol.

De même, la sensibilité et l'influence de la température sur l'activité enzymatique peuvent être estimées via les valeurs de  $z_t$  et  $E_a$ . Une proportionnalité inverse existe entre les valeurs de  $z_t$ ,  $E_a$  et la stabilité ou la sensibilité des enzymes. (Gouzi, et al.,2013). Lorsque la valeur de l'énergie d'activation « $E_a$ » est élevée, cela implique que la réaction nécessite d'apporter plus d'énergie pour maintenir l'état intermédiaire, ce qui diminue la stabilité de l'enzyme.

Généralement les valeurs de  $Z_t$  sont comprises entre 6 et 14°. Les valeurs de  $z_t$  et  $E_a$  ainsi rapportées dans la littérature de certaines PPOs sont comme suit : (6 ° C et 375Kj / mol) pour la PPO de poire, (Sulaiman et al.,2015), les champignons PPO (10,3 ° C et 214 Kj / mol) et les truffes noires PPO (10,8 ° C et 190 Kj / mol) (Gouzi, et al.,(2013) ,la de murica (13,6 ° C et 153,49 Kj / mol) (Cao et al.,2017), PPO des prunes (15,15 ° C et 150,46 Kj / mol) (Ionita.,2017), PPO à la fraise (14 ° C et 147 Kj / mol) et PPO de pomme (17 ° C et 78 Kj / mol) (Sulaiman et al.,2015).

En analysant les valeurs de la constantes d'inactivation, nous pouvons comprendre l'effet de la température ainsi que le choix de substrat sur les vitesses d'inactivation. On note que les vitesses d'inactivation des PPOs étudiées à 75°C sont plus rapide qu'à 60°C avec des facteurs différents dont 33 fois et 100 fois pour les fractions stables et labiles de PPO de Deglet Nour ,22.6 fois pour la PPO de Ghars ,8 fois pour celle de Tadela et 11.5 fois en utilisant le catéchol comme substrat, tandis qu'en présence de pyrogallol, les valeurs redeviennent 41.8 fois et 144.53 fois ,67 fois ,6 fois et 8.5 fois, respectivement.

La PPO de Tadela semble avoir une vitesse d'inactivation plus lente par rapport au reste impliquant plus de stabilité alors que la PPO de Deglet Nour, notamment pour sa fraction labile révèle plus de rapidité traduisant une perte drastique de l'activité enzymatique.

Afin d'étudier aussi l'effet de substrat sur les vitesses d'inactivation, nous avons calculer les rapports entre les vitesses d'inactivations cités ci-dessus ,entre l'activité triphénolase et l'activité catécholase. Les valeurs ainsi obtenues sont comme suit :

1.26 et 1.44 pour les fraction stable et labiles de PPO de deglet Nour, 2.96 pour la PPO de Ghars, 0.75 pour la PPO de Tadela et 0.72 pour la PPO de Tantbouchet . Nous déduisons à priori que le choix du substrat affecte la vitesse d'inactivation thermique de l'enzyme et que la sensibilité de l'enzyme sous un traitement thermique vis-à-vis de son substrat dépend de sa source .

Nous concluons également que l'activité triphénolase est plus sensible que l'activité catécholase pour la PPO de Deglet Nour et surtout pour celle de Ghars alors que c'est le cas inverse pour les PPOs de Tadela et Tantbouchet.

#### 5.4.5.2 Etude thermodynamique

En ce qui concerne l'aspect thermodynamique de la dénaturation des PPOs des dattes induite par l'augmentation de la température, les paramètres thermodynamiques ; l'enthalpie ( $\Delta H$ ), l'entropie ( $\Delta S$ ) et l'énergie libre ( $\Delta G$ ) ont été estimés et leur valeurs sont regroupées dans le tableau 45.

L'enthalpie est couramment utilisée dans l'étude des changements d'état impliquant l'énergie d'un système dans des processus chimiques, biologiques ou physiques. La valeur de l'enthalpie est proportionnelle au nombre de liaisons brisées pendant le processus, plus la valeur est élevée, plus le taux de déformation est élevé et plus l'instabilité est grande. Une valeur élevée en enthalpie signifie l'instabilité de la structure de l'enzyme.

La variation de l'enthalpie libre ou de l'énergie libre de Gibbs est généralement étudiée pour prédire l'évolution de la transformation et pour avoir une idée de la spontanéité de la réaction, de même, leur valeurs positives confirment l'augmentation de la constante d'inactivation avec l'augmentation de la température. Enfin, l'entropie « $\Delta S$ » mesure la réversibilité d'une transformation et caractérise l'état de désordre et / ou le degré d'homogénéité du système (Cao et al., 2018).

Des valeurs positives de  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  et  $\Delta S$  ont été obtenus pour l'inactivation des PPOs des dattes indiquant que cette réaction est non spontanée, nécessite l'apport d'une énergie thermique externe (endothermique) avec un gain en désordre et un processus d'agrégation significatif (Gouzi et al., 2012).

Les valeurs  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  et  $\Delta S$  peuvent expliquer le mécanisme de dénaturation et d'agrégation des protéines, qui comprend deux phases. Tout d'abord, la dénaturation des protéines se produit, suivie de l'agrégation et de la formation d'un précipité ou d'un gel si la concentration est suffisamment élevée, une de ces phases déterminera le taux de réaction global. Si l'étape de dénaturation est une limitation de la vitesse, on s'attend à ce que les valeurs de ces paramètres soient élevées et positives. (Euston et al., 2009).

Les valeurs élevées sont une conséquence de l'énergie qui doit être injectée dans le système pour surmonter les forces d'interaction qui maintiennent la structure tertiaire de la protéine. Dans ce cas, l'entropie positive indique que la structure de la protéine devient plus désordonnée.

De plus, comme rapporté par Olusesan et al. (2011), des valeurs positives de  $\Delta S$  sont trouvées si la réaction limitant le taux de dépliement des protéines, en raison de valeurs modérément élevées de  $\Delta H$  et de faibles valeurs de  $\Delta G$ .

A notre connaissance il y a peu d'étude précédentes qui ont rapporté l'influence de choix substrat sur les paramètres thermodynamiques (Gouzi et al., 2011 ; Gouzi et al., 2013).

Nous remarquons que ces valeurs se diffèrent en fonction de la source de l'enzyme pour le même substrat et en fonction de substrat utilisé pour la même source.

En effet, les valeurs ces paramètres sont proportionnels aux valeurs d'énergies d'activation ( $E_a$ ), au valeurs de la constante d'inactivation ( $k$ ) et ( $D$ ) mais inversement proportionnelles aux valeurs de ( $z_t$ ).

Quand les valeurs des paramètres thermodynamiques plus faible impliquent des valeurs de  $z_t$  plus grandes et donc plus de stabilité. La PPO de Tadela par exemple a des valeurs de  $\Delta S$  les plus faible équivalentes à 51 et 34 J/mol K<sup>-1</sup> en utilisant le catéchol et le pyrogallol comme substrats présentent les valeurs  $z_t$  les plus grandes (16,17 et 17,47°C), respectivement.

Ces résultats soutiennent nos remarques soulevées dans l'étude de cinétique de l'inactivation thermique suggérant l'ordre décroissant de stabilité suivant :

PPO de Tadela > PPO de Tantbouchet > PPO de Ghars > PPO de Deglet Nour.

De même, nous avons observé que les paramètres thermodynamique de l'activité triphénolase sont supérieures à ceux de l'activité catécholase pour le cas des PPOs de Ghars et Deglet nour alors que c'est le contraire pour les deux autres enzymes. Telles déductions sont complémentaires et en accord avec notre comparaison citée préalablement tenant en compte une comparaison en terme valeur d'énergie d'activation et de  $z_t$ .

**Tableau 45:** Paramètres thermodynamiques d'inactivation thermique des PPOs des dattes

Source	T(°C)	Catéchol			Pyrogallol		
		$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol K <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol K <sup>-1</sup> )
Deglet Nour Fraction stable	60	237,7±2.0	109,4±0,2	385,1±5.0	288,2±2.0	111,7±0,2	529,7±8.0
	65	237,6±2.0	108,6±0,2	382,0±4.0	288,1±2.0	109,2±0,2	529,3±8.0
	70	237,6±2.0	105,3±0,3	385,7±5.0	288,1±2.0	107,4±0,1	526,7±7.0
	75	237,6±2.0	104,1±0,1	383,4±4.0	288,0±2.0	103,5±0,2	530,3±8.0
Deglet Nour Fraction Labile	60	294,2±1.0	120,5±0,3	521,7±5.0	345,7±2.0	123,4±0,1	667,6±9.0
	65	294,2±1.0	119,6±0,1	516,6±4.0	345,7±1.0	118,4±0,1	672,4±8.0
	70	294,2±1.0	116,8±0,2	517,1±4.0	345,7±2.0	114,8±0,2	673,0±8.0
	75	294,1±1.0	112,7±0,1	521,2±4.0	345,6±1.0	111,7±0,1	672,2±7.0
Ghars	60	208.737±1.0	115.138±1.0	285.362±2.0	244.805±3.0	116.908±2.0	389.928±1.0
	65	208.695±2.0	113.747±3.0	285.128±2.0	244.763±2.0	114.673±1.0	390.659±2.0
	70	208.653±1.0	112.056±2.0	285.789±2.0	244.721±3.0	113.405±1.0	388.509±3.0
	75	208.612±2.0	111.816±2.0	282.204±1.0	244.680±2.0	111.792±3.0	387.429±4.0
	80	208.57±2.0	108.930±3.0	286.323±2.0	244.638±3.0	108.566±1.0	387.429±3.0
Tadela	60	132,251±1.0	115,059±1.0	51,628±2.0	125,89±3.0	114,58±0.4	34,26±1.0
	65	132,209±2.0	114,808±3.0	51,483 ±2.0	125,82±2.0	115,78±0.3	29,70±2.0
	70	132,168±2.0	114,797±2.0	50,644±2.0	125,78±2.0	115,25±0.2	30,69±1.0
	75	132,126±1.0	114,405±2.0	50,922±1.0	125,74±2.0	115,80±0.4	28,56±1.0
	80	132,085±1.0	113,633±3.0	52,186±2.0	125,70±1.0	115,35±0.3	30,81±2.0
Tantbouchet	60	173.906 ±2.0	115.051±1.0	176.741±2.0	150.249±1.0	115.0325±3.0	105.756±5.0
	65	173.864±3.0	114.693±3.0	175.063±2.0	150.207±1.0	114.888±2.0	104.494 ±3.0
	70	173.823±3.0	113.339±2.0	176.152±2.0	150.166±2.0	113.930±1.0	105.643±1.0
	75	173.781±2.0	113.339±2.0	173.684±1.0	150.124±2.0	114.220±3.0	103.173±3.0
	80	173.740±2.0	111.235±4.0	177.067±3.0	150.083±2.0	113.042±2.0	104.930±4.0

Dans la littérature, l'étude de l'inactivation se fait généralement en présence de catéchol comme substrat. Des résultats différents ont été rapportés pour les PPOs des fruits et légumes. Les différences de cinétique de l'activation thermique de la PPO à partir de sources différentes peuvent être dues aux différences dans la variété végétale ainsi qu'aux conditions agronomiques et climatiques dans lesquelles elles ont été cultivées.

Gouzi et *al* (2012) ont rapporté les valeurs de paramètres thermodynamiques suivantes pour la PPO de champignon de Paris ( $\Delta H$  : 227 kJ/mol,  $\Delta G$  : 101 kJ/mol &  $\Delta S$  : 380 J/mol).

De même, Gouzi et *al* (2013) ont rapporté une autre étude mais cette fois-ci sur la PPO de truffes noires et les valeurs ainsi obtenues étaient comme suit :  $\Delta H$  : 188 kJ/mol,  $\Delta G$  : 97 kJ/mol &  $\Delta S$  : 287 J/mol.

Batista et *al* (2014) ont étudié l'inactivation thermique de la PPO de Lobéira. Ils ont estimé les valeurs suivantes :  $\Delta H$  : 37 kJ/mol,  $\Delta G$  : 105 kJ/mol &  $\Delta S$  : -220 J/mol.

Singh et Wadhwa (2017) ont trouvés aussi des valeurs de  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  : 105 kJ/mol et  $\Delta S$  équivalentes à 61 kJ/mol, 106 kJ/mol et -136 J/mol pour la PPO de igname comestible.

Tao et *al*. (2018) à leur tour ont étudié le processus de l'inactivation de jacquier en utilisant une gamme de température comprise entre 60 et 90°C. Ils ont trouvé les valeurs suivantes de  $\Delta H$  : 100 kJ/mol,  $\Delta G$  : 115 kJ/mol et  $\Delta S$  : -0.044 J/mol.

## **IV. Conclusion générale et perspectives**



Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de cette thèse s'est focalisé sur la purification et la caractérisation des PPOs à partir de quatre variétés des dattes en faisant appel aux techniques chromatographiques avec une détermination de leur propriétés cinétiques ainsi que les conditions optimales de mesure, d'autre part, un approfondissement des connaissances dans le domaine agroalimentaire via la mise en place des moyens préventifs de brunissement enzymatique des dattes a été pris en considération dont nous avons étudié l'effet de quelques inhibiteurs y compris les sulfites, les fluorures, les acides aminés et les acides organiques, de même, l'effet de traitement thermique et/ou le temps d'incubation à des valeurs élevées de température a été aussi suivi.

Les résultats ainsi obtenus nous ont permis d'aboutir à ces déductions :

1-Le taux de purification ainsi que le rendement correspondant diffèrent d'une variété à une autre.

2-En utilisant SDS-PAGE, des poids moléculaires différents ont été obtenus dont des poids moléculaires équivalents à 30 ;67 et 90kDa pour les PPO de Ghars, Tantbouchet et Tadela, respectivement tandis que nous avons détecté la présence de trois isoformes dans le cas de PPO de Deglet Nour (20, 45 et 64 kDa).

3-Les valeurs de pH et températures optimales ainsi que la stabilité de l'activité enzymatique vis-à-vis de ces deux facteurs semblent être dépendantes de la source de l'enzyme et aussi de type de substrat utilisé.

4-Les PPOs des dattes présentent une meilleure activité dans le domaine acide avec une grande stabilité thermique dans une gamme de température comprise entre 30-60°C et ceci pour les deux activités catécholase et triphénolase.

5-L'estimation des paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_m$ ) a été réalisée en présence de catéchol, pyrogallol et 4-méthylcatéchol comme substrats.

6- La meilleure affinité pour le catéchol a été observée pour la PPO de Tantbouchet alors qu'en utilisant le pyrogallol, la meilleure affinité a été observée en présence des PPOs de Tantbouchet et celle de Ghars. De même, l'oxydation de 4-méthylcatéchol est plus forte en présence des PPO de Deglet Nour et celle de Tantbouchet.

7- L'efficacité catalytique dépend de la source de l'enzyme, le substrat utilisé et la présence ou non des isoenzymes.

8-Aucune activation significative n'a été observée en présence de détergents anioniques et/ou cationiques confirmant l'absence d'une forme enzymatique latente dans les dattes.

9- Les ions métalliques monovalents et divalents ont présentés un effet variable sur les PPOS des dattes aussi bien sur l'activité triphénolase que l'activité o-diphénolase : Les ions  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  et  $\text{Zn}^{+2}$  agissent tant qu'activateur, les ions  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  et  $\text{Al}^{+}$  en rôle d'inhibiteur tandis qu'aucun effet n'a été trouvé en utilisant  $\text{Na}^{+}$  et  $\text{K}^{+}$ .

10- Les effets des sulfites, fluorures, acides organiques ainsi que les acides aminés sur les PPOs des dattes ont été bien étudiés. Les sulfites et les fluorures semblent être les plus puissants et efficaces en raison de leur effet immédiat. D'autre part, la L-cystéine et l'acide ascorbique inhibent efficacement ces enzymes.

11- Le taux d'inhibition et la perte d'activité sont amplifiés en utilisant le pyrogallol par rapport ceux en présence du catéchol.

12- Les valeurs de  $\text{IC}_{50}$ , de  $\text{KI}$  ainsi que les mécanismes de quatre inhibiteurs les plus efficaces (Acide ascorbique, L-cystéine, le métabisulfite de sodium et le fluorure de sodium) ont été aussi rapportés.

13- L'efficacité et le mode d'action de l'inhibiteur différent en fonction de la source d'enzyme, les propriétés structurales de l'inhibiteur lui-même, le degré de purification, la présence ou non des isoformes ainsi que le type de substrat choisi.

14- L'étude d'inhibition faite suggère une indépendance de substrat utilisé dans ce travail (catéchol et/ou pyrogallol) pour le cas des PPOs de Deglet noir et Ghars. Tandis que qu'elle est avec les PPOs de Tadela et Tantbouchet.

15- L'inactivation thermique est le procédé le plus utilisé pour stabiliser les enzymes. En effet, l'inactivation thermique de la PPO des dattes peut être convenablement décrite par un modèle cinétique de premier ordre, dans la gamme des températures comprise entre 65 à 80° pour le cas de PPOs de Ghars, Tadela et Tantbouchet tandis que qu'elle était décrite selon le modèle biphasique pour la PPO de Deglet Nour.

16- Les valeurs de paramètres cinétique ( $k$ ,  $D$ ,  $t_{1/2}$ ,  $Z_t$  et  $E_a$ ) ainsi que celles de paramètres thermodynamiques ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$ , et  $\Delta S$ ) ont été estimées lors de l'inactivation thermiques de quatre PPOs des dattes en présence de catéchol et pyrogallol comme substrats.

17- Les vitesses d'inactivation des PPOs étudiées à 75°C sont plus rapide qu'à 60°C avec des facteurs différents dont 33 fois et 100 fois pour les fractions stables et labiles de PPO de Deglet Nour, 22.6 fois pour la PPO de Ghars, 8 fois pour celle de Tadela et 11.5 fois en utilisant le catéchol comme substrat, tandis qu'en présence de pyrogallol les valeurs redeviennent 41.8 fois et 144.53 fois, 67 fois, 6 fois et 8.5 fois respectivement

18- Des valeurs positives de  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  et  $\Delta S$  ont été obtenus pour l'inactivation des PPOs des dattes indiquant que cette réaction est non spontanée, nécessite l'apport d'une énergie thermique externe (endothermique) avec un gain en désordre et un processus d'agrégation significatif.

19- Les différences de cinétique de l'activation thermique de la PPO à partir de sources différentes peuvent être dues aux différences dans la variété végétale ainsi qu'aux conditions agronomiques et climatiques dans lesquelles elles ont été cultivées.

En perspectives, il serait envisageable de purifier des PPOs d'autres cultivars aussi bien locaux (Algérien) qu'internationaux (Notamment ceux du nord Afrique ;Tunisie, Maroc) pour avoir une idée sur l'effet de la localisation géographique sur les caractéristiques réactionnelles des PPOs des dattes. De même, nous suggérant vivement la mise en place d'une étude moléculaire détaillée impliquant le séquençage des PPOs des dattes, ainsi, la mise en place de la structure cristallographique (X-Ray) de cette enzyme sera également requise.

En revanche, une attention doit être également donnée à la recherche des inhibiteurs naturels des PPO des dattes et/ ou à l'étude de l'inactivation de l'enzyme par les méthodes physiques en particulier la pression, et les ultrasons.

## **V. Références bibliographiques**

- Abbas,F.A.,Ateya A.M.(2011).Estradiol, esteriol, estrone and novel flavonoids from date palm pollen, *Aust. J. Basic Appl. Sci.*5 (8).606–614.
- Abdelmaksoud,T.G., Mohsen,S.M., Duedahl-Olesen,L., El-Nikeety,M.M., Feyissa,A.H.(2018). Effect of Ohmic Heating Parameters on Inactivation of Enzymes and Quality of Not-from-concentrate Mango Juice. *Asian Journal of Scientific Research.*11(3):383-392.
- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S., & Zeng, X. (2014). Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 93-97.
- Agcam, E., Akyıldız, A., & Evrendilek, G. A. (2014). Comparison of phenolic compounds of orange juice processed by pulsed electric fields (PEF) and conventional thermal pasteurisation. *Food Chemistry.*143, 354-361.
- Aguilar-Rosas, S. F., Ballinas-Casarrubias, M. L., Nevarez-Moorillon, G. V.,Martin-Belloso, O., & Ortega-Rivas, E. (2007). Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. *Journal of Food Engineering.*83(1), 41-46.
- Akgün,M.P.,Ünlütürk,S.(2017). Effects of ultraviolet light emitting diodes (LEDs) on microbial and enzyme inactivation of apple juice. *Int J Food Microbiol.*2;260:65-74.
- Al-Alawi ,R.A.,Al-Mashiqri ,J.H., Al-Nadabi, J.S.M., Al-Shihi ,B., Baqi ,Y.(2017). Date Palm Tree (*Phoenix dactylifera L.*): Natural Products and Therapeutic Options. *Front Plant Sci.*23;8:845.
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., and Shahidi, F.(2005).Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera L.*) varieties grown in Oman. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7592–7599.
- Al-Harrasi, A., Rehman, N. U., Hussain, J., Khan, A. L., Al-Rawahi, A., Gilani, S. A. (2014). Nutritional assessment and antioxidant analysis of 22 date palm (*Phoenix dactylifera*) varieties growing in Sultanate of Oman. *Asian Pac. J. Trop.Med.* 7, S591–S598.
- Ali ,H.M, A., El-Gizawy ,M.,El-Bassiouny R. E. I., Saleh,M.A.(2015). Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products. *Food Sci. Technol.*52, 3651–3659
- Alici, E.H., Arabaci, G., 2016. Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis L.*) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 1051–1056.
- Al-Laith, A. A. (2009). Degradation kinetics of the antioxidant activity in date palm (*Phoenix dactylifera L.*) fruit as affected by maturity stages. *Arab Gulf J. Sci. Res.*27, 16–25
- Al-Mssallem, I.S., Hu ,S., Zhang ,X.,Lin ,Q.,Liu,W.,Tan,J.(2013).Genome sequence of the date palm *Phoenix dactylifera L*, *Nat. Commun.* 4:2274.

- Al-Sayyed, H. F., Takruri, H. R., and Shomaf, M. S. (2014). The effect of date palm fruit (*Phoenix dactylifera L.*) on 7, 12-dimethylbenz ( $\alpha$ ) anthracene (DMBA)-induced mammary cancer in rats. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.* 4, 11–18.
- Al-Shahib, W., Marshall, R. J. (2003). The fruit of the date palm: its possible use as the best food for the future? *Int. J. Food Sci. Nutr.* 54(4) 247 – 259.
- Al-Turki, S., Shahba, M. A., and Stushnoff, C. J. (2010). Diversity of antioxidant properties and phenolic content of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) fruits as affected by cultivar and location. *J. Food Agri. Environ.* 8, 253–260.
- Al-Yahya, M., Raish, M., AlSaid, M. S., Ahmad, A., Mothana, R. A., Al-Sohaibani, M. (2015). “Ajwa” dates (*Phoenix dactylifera L.*) extract ameliorates isoproterenol-induced cardiomyopathy through downregulation of oxidative, inflammatory and apoptotic molecules in rodent model. *Phytomedicine*. 23, 1240–1248.
- Amiour, S. D., Hambaba, L. (2016). Effect of pH, temperature and some chemicals on polyphenol oxidase and peroxidase activities in harvested Deglet Nour and Ghars dates. *Postharvest Biology and Technology*. 111, 77–82.
- Amira, E. A., Behija, S. E., Beligh, M., Lamia, L., Manel, I., Mohamed, H. (2012). Effects of the ripening stage on phenolic profile, phytochemical composition and antioxidant activity of date palm fruit. *J. Agric. Food Chem.* (60), 10896–10902.
- Anghileri, A., Lantto, R., Kruus, K., Arosio, C., Freddi, G. (2007). Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates. *J. Biotechnol.* 127:508–19.
- Arslan, O., Erzen, M., Sinan, S., Ozensoy, O. (2004). Purification of mulberry (*Morus alba L.*) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*. 88(3) 479–484.
- Ashie, I. N. A. (1996). Simpson, B. K.; Smith, J. P. Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 1–30
- Ashraf, Z., Esfahani, Z. H. (2011). Date and Date Processing: A Review. *Food Reviews International*. 27:2, 101–133.
- Assai, J. (1995). Method for removing COD in drainage water. *Jpn. Patent. JP* 09-029264. 95.07.17.
- Autio, K., Lille, M., Myllarinen, P. (2007). Milk product and method for its preparation. *WIPO Patent Appl.* 141385 A1.07.06.05.
- Aydemir, T. (2010). Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus officinalis L.* *International Journal of Food Properties*. 13: 475–485.

- Aydemir, T. & Akkanli, G. (2006). Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens* L.) and the investigation of the effects on the enzyme activity of some inhibitors. *J. Food Sci. Tech.* 41, 1090–1098.
- Aydin B, Gulcin I, Alwasel SH. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Hemsin Apple (*Malus communis* L.). *International Journal of Food Properties*, 2015.18:12, 2735-2745.
- Babu, B.R., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S. (2008). Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 47, 83–89.
- Baliga, M. S., Baliga B. R. V., Kandathil, S. M., Bhat, H. P., Vayalil P. K. (2011). A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera* L.), *Food Res. Int.* 44(7)1812–1822.
- Batista, K.A., Batista, G.L.A., Alves, G.L., Fernandes, K.F. (2014). Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 102, 211–217.
- Bayındırlı, A., Alpasa, H., Bozoğlua, F., Hızal, M. (2006). Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control.* 17(1)52-58.
- Beaulieu, M., D'Aprano, G., & Lacroix, M. (2002). Effect of dose rate of gamma irradiation on biochemical quality and browning of mushrooms *Agaricus bisporus*. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 311–315.
- Belmir, S., Boucherit, K., Boucherit-Otmani, Z., and Belhachemi, M.-H. (2016). Effect of aqueous extract of date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.) on therapeutic index of amphotericin B. *Phytothérapie* 14, 97–101.
- Benaceur, F., Gouzi, H., Meddah, B., Neifar, A., Guergouri, A. (2018). Purification and characterization of catechol oxidase from *Tadela (Phoenix dactylifera* L.) date fruit. 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.101
- Benedict, C.V., Picciano, P.T. (1987). Method for making dopa-containing bioadhesive proteins from tyrosine-containing proteins. *Eur. Patent. EP .0242656-A2.87.02.04.*
- Benmeddour, Z., Mehinagic, E., Le Meurlay, D., and Louaileche, H. (2013). Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars: a comparative study. *J. Funct. Food* 5, 346–354.
- Benziouche, S.E. (2010) L'analyse de l'impact des politiques agricoles sur la production des dattes en Algérie par la MAP. *Int Res J Finan Econ* UK 44:68–77.
- Berliner, D.L., Erwin, R.L., Mcgee, D.R. (1997). Therapeutic uses of melanin. *United States Patent. US . 5703051-98.07.07.*

- Bernstein, A., Noreña, C.P.Z.(2016). Kinetics of enzymatic inactivation and loss of anthocyanins and antioxidant activity in red cabbage blanched under different conditions. *J. Food Biochem.* 41 (3).
- Bi, X., Hemar, Y., Balaban, M.O., Liao, X.(2015). The effect of ultrasound on particle size, color, viscosity and polyphenol oxidase activity of diluted avocado puree. *Ultrasonics Sonochemistry* 27, 567-575.
- Biglari, F., Al Karkhi, A. F., and Easa, M. (2007). Antioxidant activity and Phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chem.* 107, 1636–1641.
- Bijelic A, Pretzler M, Molitor C, Zekiri F, Rompel A.(2015).The structure of a plant tyrosinase from walnut leaves reveals the importance of “substrate-guiding residues” for enzymatic specificity. *Angew Chem Int Ed Engl* .54(49):14677–14680.
- Boeck, T.; Winters, A.L.; Webb, K.J.; Kingston-Smith, A.H.(2015) Polyphenol oxidase in leaves; is there any significance to the chloroplastic localization? *J. Exp. Bot.*66, 3571–3579.
- Borochoy-Neori, H., Judeinstein, S., Greenberg, A., Volkova, N., Rosenblat, M., and Aviram, M. (2015). Antioxidant and antiatherogenic properties of phenolic acid and flavon-1 fractions of fruits of “Amari” and “Hallawi” date (*Phoenix dactylifera L.*) varieties. *J. Agric. Food Chem.* 63, 3189–3195.
- Boshoff, A., Edwards, W., Leukes, W.D., Rose, P.D., Burton, S.G.(1998). Immobilisation of polyphenol oxidase on nylon and polyethersulphone membranes: Effect on product formation. *Desalination*.115(3)307-312.
- Bouaziz, M.A., Amara, W.B., Attia H., Blecker, C., Besbes, S.(2010). Effect of the addition of
- Boudries, H., Kefalas, P., and Hornero-Méndez, D. (2007). Carotenoid composition of Algerian date varieties (*Phoenix dactylifera*) at different edible maturation stages. *Food Chem.* 101, 1372–1377.
- Bouguedoura, N., Bennaceur, M., Babahani, S., Benziouche, S.E.(2015) Date Palm Status and Perspective in Algeria. *Date Palm Genetic Resources and Utilization*.125-168.
- Bourquelot M et Bertrand G.(1896 ). Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelque champignon. *C. R. Acad. Sc.*, 123, 463-465.
- Brasquet, C., Subrenat, E., and le Cloirec, P.(1999). Removal of phenolic compounds from aqueous solution by activated carbon cloths. *Water Science and Technology*. 39(10-11)201–205.
- Bravo, K., Osorio, E.(2016). Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana L.*) fruit. *Food Chem.*197,185–190
- Buckow, R., Sikes, A., & Tume, R. (2013). Effect of high pressure on physico-chemical properties of meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,53(7), 770–786.
- Buckow, R., Weiss, U., Knorr, D.(2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10 (4),441 – 44



- Busch, J.L., Hrnčirik, K., Bulukin, E., Boucon, C., Mascini, M. (2006). Biosensor measurements of polyphenolics for the assessment of the bitterness and pungency of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(12)4371–4377.
- Cano, M.P., Hernandez, A., De Ancos, B. (1997). High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products. *Journal of Food Science*. 62(1):85 – 88.
- Cao, X., Cai, C., Wang, Y., Zheng, X. (2018). The inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in bayberry juice during thermal and ultrasound treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 45, 169-178
- Carvalho, J.O., Orlanda, J.F.F. (2017). Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract. *Food Chem*. 233, 159–163.
- Castañera, P.; Steffens, J.C.; Tingey, W.M. (1996). Biological performance of Colorado potato beetle larvae on potato genotypes with differing levels of polyphenol oxidase. *J. Chem. Ecol.* 22, 91–101.
- Castro, A., Teixeira, J.A., Salengke, S., Sastry, S.K., Vicente, A.A. (2004). Ohmic heating of strawberry products: electrical conductivity measurements and ascorbic acid degradation kinetics. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 27-36
- Cervantes-Elizarrarás, A., Piloni-Martini, J., Ramírez-Moreno, E., Alanís-García, E., Güemes-Vera, N., Gómez-Aldapa, C.A., Zafra-Rojas, Q.Y., Cruz-Cansino, N.D. (2017). Enzymatic inactivation and antioxidant properties of blackberry juice after thermoultrasound: Optimization using response surface methodology. *Ultrason Sonochem.* 34:371-379
- Chafi, A., Benabbes, R., Bouakka, M., Hakkou, A., Kouddane, N., Berrichi, A. (2015). Pomological study of some date palm varieties cultivated in Figuig oasis, *J. Mater. Environ. Sci.* (6)1266–1275
- Chaira, N., Smaali, M. I., Martinez-Tomé, M., Mrabet, A., Murcia, M. A., and Ferchichi, A. (2009). Simple phenolic composition, flavonoid contents and antioxidant capacities in water-methanol extracts of Tunisian common date cultivars (*Phoenix dactylifera* L.). *Int. J. Food Sci. Nutr.* 60, 316–329.
- Chakraborty, S., Rao, P.S., Mishra, H.N. (2015). Kinetic modeling of polyphenol oxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure and thermal treatments. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 57 – 68.
- Chao, C. C. T., Krueger, R. R. (2007). The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): overview of biology, uses, and cultivation. *Hortscience*. 42, 1077–1082.
- Charles-Rodríguez, A., Nevárez-Moorillón, G., Zhang, Q., & Ortega-Rivas, E. (2007). Comparison of thermal processing and pulsed electric fields treatment in pasteurization of apple juice. *Food and Bioproducts Processing*, 85(2), 93-97.

- Charles-Rodríguez, A., Nevárez-Moorillón, G., Zhang, Q., & Ortega-Rivas, E. (2007). Comparison of thermal processing and pulsed electric fields treatment in pasteurization of apple juice. *Food and Bioproducts Processing*, 85(2), 93-97.
- Chaves ,I.R., De Souza Ferreira ,E., Da Silva ,M.A., Neves ,V.A. (2011).Polyphenoloxidase from Atemoya fruit (*Annona cherimola* Mill. × *Annona squamosa* L.). *J of Food Biochem.*35:1583–1592
- Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J., Garcia-carmona, F.(1996). Partial Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase in Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L .). *J.Agric.FoodChem.*984–988.
- Cheema, S & Sommerhalter, M.(2015). Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango. *Food Chem.* 171, 382–387
- Chemat ,F., Khan,M.K.(2011).Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *UltrasonSonochem*,18:813–835.
- Chen ,T., Vazquez-Duhalt ,R.,Wu ,C.F.,Bentley ,W.E.,Payne,G.F.(2002).Combinatorial screening for enzyme-mediated coupling. Tyrosinase-catalyzed coupling to create protein-chitosan conjugates. *Biomacromolecules* .2:456–62.
- Cheng, S., Zhang, Y.F., Zeng, Z.Q., Lin, J., Zhang, Y.W., Ni, H., Li, H.H.(2014). Screening, separating, and completely recovering polyphenol oxidases and other biochemicals from sweet potato wastewater in starch production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*99,1745–1753.
- Cheng,X.-f.,Zhang,M.,Adhikari,B.(2013). The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(2),674-679.
- Choi L. H. and.Nielsen,S.S.(2005).The effects of thermal and nonthermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. *Journal of Food quality.*28: 13-29.
- Chutintrasri,B.,Noomhorm,A.(2006).Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple pure. *LWT - Food Science and Technology.*39(5)492-495.
- Considine,K. M.,Kelly, A. L.,Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Sleator, R. D.(2008). High-pressure processing—effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*, 281(1), 1-9.
- Cornish-Bowden,A.,Jamin,M.,Saks,V.(2005). Cinétique enzymatique. Collection: Grenoble Sciences.
- Costa, M.G., Fonteles, T.V., de Jesus, A.L. and Rodrigues, S. (2013) Sonicated Pineapple Juice as Substrate for *L.casei* Cultivation for Probiotic Beverage Development: Process Optimisation and Product Stability.*Food Chemistry.* 139, 261-266.
- Dhokal.,S.,Balasubramaniama ,V. M.,Ayvaza H,Rodriguez-Saonaa,L.E.(2018).Kinetic modeling of ascorbic acid degradation of pineapple juice subjected to combined pressure-thermal treatment. *J Food Eng.*224,62-70.

- Dalmadi, I., Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., Hendrickx, M. (2006). Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. *J.Food Biochem.*30 (1),56–76.
- Damar,S.,Balaban,M.O.(2006). Review of dense phase CO<sub>2</sub> technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *J. Food Sci.*71(1), 1–11.
- defatted date seeds on wheat dough performance and bread quality, *J. TextureStud.* 41 (4) 511–531.
- Delgado-Povedano,M.M.,Luque de Castro,M.D.(2015). A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship.*Anal Chim Acta.*19;889:1-21.
- Della-Cioppa GR, Garger, SJ, Holtz RB, McCulloch MJ, Sverlow GG.(1996).Method formaking stable, extracellular tyrosinase and synthesis of polyphenolic polymers there from. *United States Patent US .5486351.* 96.01.23.
- Demirdöven, A., & Baysal, T.(2014). Optimization of ohmic heating applications for pectin methyl-esterase inactivation in orange juice. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1817–1826.
- Demirdöven,A.,Baysal,T.(2009).Ohmic heating applications on fruit and vegetable products. *International Conference on Bio and Food Electrotechnologies .*294–300.
- Derardja,A.,Pretzler ,M.,Kampatsikas,I.,Barkat,M.,Rompel,A.(2017). Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase from Apricot (*Prunus armeniaca L.*).*J Agric Food Chem.*65, 8203–8212.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., Guner, S.(2002).Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica L., Rosaceae*). *Food Chemistry*, 77, 1-7.
- Doğan, S., Diken, M.E., Turhan, Y., Alan, Ü., Doğan, M., Alkan, M. (2011). Characterization and inhibition of *Rosmarinus officinalis L.* polyphenoloxidase. *Europeen Food Research Technology*, 233:293-301.
- Doğan,S. and Doğan, M. (2004).Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus (Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. chaubardii)*.*Food Chem.*88, 69–77.
- Doğan S, Turan P, Doğan M (2006).Some kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymbra spicata L. var. spicata*. *Process Biochem* 41:2379-2385.
- Doğru,Y,Z and.,Erat,M.(2012). Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum*, Apiaceae) *Food Research international*,49, 411-415
- Duan, Z., Xing, Z., Shao, Y., & Zhao, X. (2010). Effect of electron-beam irradiation on postharvest quality and selected enzyme activities of the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58,9617–9621.
- Eicken, C., Krebs, B .,Sacchettini,J.C.(1999).Catechol oxidase:structure and activi-ty.Catalysis and regulation.*Current Opinion in Structural Biology.* 9: 677-683.

- El Sohaimy,S., Abdelwahab, A., Brennan, C., and Aboul-enein, A. (2015). Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian date palm (*Phoenix dactylifera L.*) fruits. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 9, 141–147.
- Ellis ,J., Cornell ,D.L.(2003). Treating proteinaceous materials – precision processes textiles limited. *Int.Patent.WO.069051.03.02.10.*
- Eoin, L. N. (2016). Systematics: blind dating. *Nat. Plants* 2:16069.
- Erat,M.,Nuri,Y.Gülşah,S,A.,Demirkol,A.(2010). Partial characterization of polyphenol oxidase from a hybridized wheat (*Triticum aestivum L.*).*European Food Research and Technology.*23,6,899-905.
- Ercan,S.S.,Soysal,C.(2011). Effect of ultrasound and temperature on tomato peroxidase. *Ultrasonics Sonochemistry.*18,689–695.
- Ercili Cura ,D., Lille,M.,Partanen, R.,Kruus,K.,Buchert,J.,Lantto,R.(2010).Effect of Tri-choderma reesei tyrosinase on rheology and microstructure of acidified milk gels.*Int Dairy J.*20:830–7.
- Ertugay, M.F., Başlar, M., Ortakci, F.,(2013). Effect of pulsed electric field treatment on polyphenol oxidase, total phenolic compounds, and microbial growth of apple juice. *Turk. J. Agric. For.* 37 (6), 772-780.
- Escobedo-Avel laneda, Z., Pérez -Simón, I., Lavilla-Martín, M., Baranda-González, A., Welti-Chanes, J.(2016). Enzymatic and phytochemical stabilization of orange-strawberry-banana beverages by high hydrostatic pressure and mild heat. *Food Sci. Technol. Int.* 23 (2), 185 – 19.
- Eshtiaghi, M., & Knorr, D. (2002). High electric field pulse pretreatment: potential for sugar beet processing. *Journal of Food Engineering*, 52(3), 265-272.
- Espin de Gea ,J.C., De Tomas Barberan, F.A., Garcia Viguera ,M.C., Ferreres De Arce,F.,Soler Rivas ,C., Wichers ,H.(2011). Enzymatic synthesis of antioxidant hydroxytyrosol.*United States Patent. Appl.*20030180833-A1.03.02.11.
- Euston, S. R., Al-Bakkush, A. A., and Campbell, L.(2009). Comparing the heat stability of soya protein and milk whey protein emulsions. *Food Hydrocolloids.*23, 2485–2492.
- Eze S .O.O.,Chilaka F.C .,Nwanguma B.C.(2010).Studies on Thermodynamics and Kinetics of Thermal Inactivation of Some Quality-Related Enzymes in White Yam (*Dioscorea rotundata*).*J Thermodyn Catal.*1( 1)1000104.
- Fan,X., Sokorai, K.J.B.(2005). Assessment of radiation sensitivity of fresh-cut vegetables using electrolyte leakage measurement . *Postharvest Biology And Technology* .36(2)191-197.
- Fante, L., & Noreña,Z.C. P. (2012). Enzyme inactivation kinetics and colour changes in Garlic (*Allium sativum L.*) blanched under different conditions.*Journal of Food Engineering*, 108(3), 436-4

- Fernandes,A., Antonio,A.L., Oliveira,M.P.P.O.,Martins,A., I.C.F.R Ferreira .(2012). Effect of gamma and electron beam irradiation on the physico-chemical and nutritional properties of mushrooms: A review. *Food Chemistry*.135,641–650.
- Flurkey,W.H.,Jen,J.J.(1980). Purification and characterization of polyphenol oxidase in redhaven peaches.*Biochimie und Physiologie der Pflanzen*175(7)637-642.
- Fonteles,T.V., Costa,M.G.M., de Jesus,A.L.T., De Miranda ,M.R.A.,Fernandes, F.A.N., Rodrigues,S. (2012). Power ultrasound processing of cantaloupe melon juice: Effects on quality parameters. *Food Research International*,48(1),41-48.
- Frost, B., Hemberg, M., Lewis, J., and Feany, M. B. (2014). Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nat. Neurosci.* 17, 357–366.
- Gao, Z.-J., Han, X.-H., Xiao, X.-G.(2009).Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard ( *Beta vulgaris subspecies cicla* ) leaves. *Food Chem.* 117, 342-348.
- Gao,Z., Liu ,J.,Xiao,X.(2011). Purification and characterisation of polyphenol oxidase from leaves of *Cleome gynandra* L. *Food Chem.*129,1012–1018.
- Garba, M. D., and Galadima, A. (2012). Anti-diarrhoea and phytochemical evaluation of *Phonix dactylifera* L. extracts. *Appl. Chem.* 49, 9808–9812.
- Garcia,L.F., Benjamin,S.R., Antunes,R.S., Lopes,F.M., Somerset,V.S., Gil,E.S.(2016). Solanum melongena polyphenol oxidase biosensor for the electrochemical analysis of paracetamol.*Prep Bi-ochem Biotechnol.*46(8),850-855.
- Garcia-Palazon,A.,Suthanthangjai,W.,Kajda,P.,Zabetakis,I.(2004). The effects of high hydrostatic pressure on ??-glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria??ananassa*). *Food Chemistry*.88(1)7-10.
- García-Parra, J., González- Cebrino, F., Delgado-Adámez , J., Cava, R., Martín-Belloso,O.,Elez-Ma rtínez, P., Ramírez, R.(2018). High pressure assisted therma l processing of pumpkin purée: effect on microbial counts, color, bioactive compounds and polyphenoloxidase enzyme. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*45, 53 – 61.
- Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U., Baraniak, B.(2007). Characterization of polyphenol oxidase from broccoli ( *Brassica oleracea var.botrytis italica*) florets. *Food Chem.*105, 1047-1053.
- Gerard ,K.A., and Roberts ,J.S.(2004).Microwave Heating of Apple Mash to Improve Juice Yield and Quality, *Lebensm-Wiss Technol.*37, 551-557.
- Ghnimi ,S.,Umer ,S.,Karim ,A., Kamal-Eldin,A.(2017). Date fruit (*Phoenix dactylifera* L.): An underutilized food seeking industrial valorization. *NFS Journal* , 1–10.
- Giner,J.,Ortega,M.,Mesegué,M.,Gimeno,V.,Barbosa-Cánovas,G., & Martín,O. (2002). Inactivation of peach polyphenoloxidase by exposure to pulsed electric fields. *Journal of Food Science*.67(4),1467-1472.

- Gomes ,M..R..A., Ledward,D,A.(1996). Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidase. *Food Chemistry* 56(1):1-5
- Gong, Z., Li, D., Liu, C., Cheng, A., Wang, W.(2015). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 1095–1099.
- Gonzalez-cortes, p.yanez-sedeno,andj.m.pingarron.(2005). Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes:application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines,"*AnalyticaChimica Acta*.528(1)1–8.
- Gorrini, C., Harris, I. S., and Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 931–947.
- Gouzi H.,Depagne C., Benmansour, A., Coradin .(2013). First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis Tul.*) and its thermal behavior. *Eur Food Res Technol.* 237(5)721–729.
- Gouzi, H., Depagne, C.,Coradin, T.(2012). Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from *Agaricus bisporus*. *J of Agric Food Chemy.* 60, 500–506 .
- Gouzi,H.,Flurkey,W.H., Abdelhafid,B.(2007). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus*. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 5(1)1542-6580.1445.
- Goyeneche,R.,Di Scala,K.,& Roura,S.(2013). Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish (*Raphanus sativus var. sativus*). *Lwt-Food Sci Technol.* 54,57-62.
- Grimi, N., Praporscic, I., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2007). Selective extraction from carrot slices by pressing and washing enhanced by pulsed electric fields. *Separation and Purification.Technology*, 58(2), 267-273
- Guerrero-Beltran, J.A., G.V. Barbosa-Canovas. (2004). Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Science and Technology International* 10(3):137-147.
- Guerrouj, K., Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R. M., & Marín-Iniesta, F. (2016).Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food and Bioproducts Processing*, 99, 20-28.
- Gui,F.,Wu, J.,Chen, F., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., Wang, Z.(2006).Change of polyphenol oxidase activity, color, and browning degree during storage of cloudy apple juice treated by supercritical carbon dioxide. *Eur. Food Res. Technol.* 223 (3), 427–432.
- Guid,A., V.,Ferraria,G.,Pataroa,G., Chambery,A.,Di Maroc,A.Parente,A.(2013). The effects of ohmic and conventional blanching on the nutritional, bioactive compounds and quality parameters of artichoke heads. *LWT - Food Science and Technology*.53( 2) 569-579.

- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., and Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr. Res.* 23, 1719–1726.
- Guray, M.Z., Sanlı-Mohamed, G.(2013). A new thermophilic polyphenol oxidase from *Bacillus* sp. partial purification and biochemical characterisation. *J. proteins proteomics* 4, 11–20.
- Gurgu, L., Aprodu, I., St, N., Ionit, E., Bahrim, G., Râpeanu, G.(2017). Characterization, purification, and temperature / pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*) 56, 177–185.
- Hamad, I., AbdElgawad, H., Al Jaouni, S., Zinta, G., Asard, H., Hassan,S.(2015). Metabolic analysis of various date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia to assess their nutritional quality. *Molecules*.(20),13620–13641.
- Hasegawa, S. and Maier, V. P. (1980). Polyphenol oxidase of dates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 891-893.
- Hazzouri, K. M., Flowers, J. M., Visser, H. J., Khierallah, H. S., Rosas, U., Pham, G. M., (2015). Whole genome re-sequencing of date palms yields insights into diversification of a fruit tree crop. *Nat. Commun.* 6:8824.
- Herlihy, W.C.(2002).Skin tanning composition and method.*United States Patent*.US .4515773.07.05.1985.
- Holzwarth, M., Korhummel, S., Kammerer, D.R, and Carle, R. (2012) Thermal inactivation of strawberry polyphenoloxidase and its impact on anthocyanin and color retention in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) purees. *European Food Research and Technology*.235: 1171–1180.
- Hong, Y. J., Tomas-Barberan, F. A., Kader, A. A., and Mitchell, A. E. (2006). The flavonoid glycosides and procyanidin composition of deglet noor dates (*Phoenix dactylifera*). *J. Agric. Food Chem.* 54, 2405–2411.
- Huang, W., Bi, X., Zhang, X., Liao, X., Hu, X., & Wu, J. (2013). Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 74-82.
- Icier, F., Yildiz, H., Baysal, T.(2008). Polyphenoloxidase deactivation kinetics during ohmic heating of grape juice. *J. Food Eng.*, 85,410-417.
- Ionita, E., Gurgu, L., Aprodu, I.N., Stanciuc, N., Dalmad, I., Bahrim, G., Răpeanu, G.(2017). Characterization, purification, and temperature/pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*).*Process Biochem.*56, 177-185.
- Islam, M.N.I., Zhang, M., Adhikari, B., Xinfeng, C., Xu, B-G.(2014).The effect of ultrasound-assisted immersion freezing on selected physicochemical properties of mushrooms. *International Journal of Refrigeration*. 42,121-133.

- Iyidogan, N.F., Bayındırlı, A.(2004). Effect of l-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. *J. Food Eng.*62, 299 -304.
- Jadhav.J.P, Kalyani.D.C, A. A. Telke, S. S. Phugare, and S. P.Govindwar.(2010).Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent.*Bioresource Technology*,101(1),165–173.
- James, W.O.(1953). The terminal oxidases of plant respiration. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.*28, 245-260.
- Jang,T.B.,Schindler,D.,Kaji.A,H.(2011). Bedside ultrasonography for the detection of small bowel obstruction in the emergency department.*Emerg Med J.*28(8):676-8.
- Jiang,Y.,Duan,X., Zheng,S., and Qu,H.(2016). Browning: Enzymatic Browning. Encyclo pedia of Food and Health.508-514.
- John R.,Whitaker ,J and Lee,C,Y.(1995). Chapitre 1 :Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. 6002–7.
- Juarez-Enriquez, E., Salmerón, I., Gutierrez-Mendez, N., & Ortega-Rivas, E. (2016). Ultraviolet Irradiation Effect on Apple Juice Bioactive Compounds during Shelf Storage. *Food*.5(1), 10.
- Jukanti,A.(2017).Chapter 6 :Polyphenol Oxidase(s): Importance in Food Industry. Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants.93-106.
- Julia, V., Macia, L., and Dombrowicz, D. (2015). The impact of diet on asthma and allergic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 308–322.
- Jus ,S.,Kokol,V., Guebitz ,G.(2009).Tyrosinase-catalysed coating of wool fibreswith different protein-based biomaterials.*J BiomaterSciPolym Ed.*20(2):253–69
- Kertész,D.(1951).Tyrosinase and polyphenoloxidase.The role of metallic ions in melanogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta.*9,170-179
- Kertes,D.,Zito.R.(1965). Mushroom polyphenol oxidase I. Purification and general pro-perties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Nucleic Acids and Protein Synthesis.*96,447-462
- Khan,M.K.,Ahmad,K.,Hassan,S.,Imran,M., Ahmad,N., Xu,C.(2017). Effect of novel technologies on polyphenols during food processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 45,361-381.
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., and Yoon, S. (2015). The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp. Neurobiol.* 24, 325–340..
- Klabunde,T.,Eicken,C.,Sacchettini,Jc,Krebs,B.(1998.)Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center.*NatStructBiol*;5:1084–90.
- Knirsch KC, Alves dos Santos CA, de Oliveira Martins, Soares Vicente,A.,Penna,T.C.V.(2010). Ohmic heating e a review. *Trends Food Sci Technol* 21:436–441.



- Koorapati, A., Foley, D., Pilling, R., & Prakash, A. (2004). Electron-beam irradiation preserves the quality of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) slices. *Journal of Food Science*, 6, 25–29.
- Koyanagi, T., Katayama, K., Suzuki, H., Nakazawa, H., K. Yokozeki, and H. Kumagai. (2005). Effective production of 3,4-dihydroxyphenyll(1-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR. *Journal of Biotechnology*. 115(3) 303–306.
- Kubowitz, F. (1938). Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung*. 299: 32-57.
- Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T. C., Murugan. K. (2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra L.*). *Food Chemistry*. 110:328-333
- Lacroix, M., and Ouattara, B. (2000). Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products e a review. *Food Research International* 33:719-724.
- Lamikanra O, Kirby S, Musingo M (1992) Muscadine grape polyphenoloxidase: partial purification by high pressure liquid chromatography and some properties. *J Food Sci* 57:686–695.
- Lantto, R., Puolanne, E., Kruus, K., Buchert, J., Auutio, K. (2007). Tyrosinase-aided protein cross-linking: effects on gel formation of chicken breast myofibrils and texture and water-holding of chicken breast meat homogenate gels. *J Agric Food Chem*. 55, 1248–55.
- Lax A.R and Vaughn K.C. (1991). Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol*. 96: 26-31
- Lebovka, N. I., Shynkaryk, M., & Vorobiev, E. (2007). Moderate electric field treatment of sugarbeet tissues. *Biosystems Engineering*, 96(1), 47-56.
- Lemine, M., Mint, F., Mohamed Ahmed, M. V. O., Ben Mohamed Maoulainine, L., Bouna, Z. E. A. O. (2014). Antioxidant activity of various Mauritanian date palm (*Phoenix dactylifera L.*) fruits at two edible ripening stages. *Food Sci. Nutr.* 2, 700–705.
- Lemos M.A., Coliveira, J. A., Saraiva, J. (2000). Influence of pH on the Thermal Inactivation Kinetics of Horseradish Peroxidase in Aqueous Solution. *LWT - Food Sci. Biotech.* 21.33, 362-368
- Lerch, K. (1995). Tyrosinase: molecular and active-site structure. *ACS Symp. Ser.* 600, 64–80
- Li, Y., Wang Y, Jiang H, Deng J. (2009). Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(40), 17002–17006.
- Li, Y.F., Liu, Z.M., Liu, Y.L., Yang, Y.H., Shen, G.L., and Yu, R.Q. (2006). A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles. *Analytical Biochemistry*, vol. 349, no. 1, pp. 33–40.
- Liang, Y.S., Chen, N.L., Ke, L.S. (2012). Influence of dipping in sodium metabisulfite on pericarp browning of litchi cv. *Yu Her Pau* (Feizixiao) *Post harvest Biology and Technology*. 68:72–77.

- Lima, M. (2007). Ohmic heating: Quality improvements. *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering* 1:1–3.
- Lin, H., Wee, A., Ng, R., Wong, C.W. (2016). Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Chinese Parsley (*Coriandrum sativum*). *Food Sci. Biotechnol.* 25, 91–96.
- Lindet, M. (1895). Sur l'oxydation du tannin de la pomme à cidre. *Contpt. rend.* 120, 370-372.
- Liu, N., Liu, W., Wang, D., Zhou, Y., Lin, X., Wang, X., Li, S. (2013). Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica Thunb.* *Food Chem.* 138, 478–483
- Liu, F., Zhao, J., Wen, X., Ni, Y. (2015,a). Purification and structural analysis of membrane-bound polyphenol oxidase from Fuji apple. *Food Chem.* 183, 72–77.
- Liu, L., Cao, S., Yang, H., Qi, X. (2015,b). Pectin plays an important role on the kinetics properties of polyphenol oxidase from honeydew peach. *Food Chem.* 168, 14–20.
- Liu, K., Chen, S., Chen, H., Tong, P., Gao, J. (2018). Cross-linked ovalbumin catalyzed by polyphenol oxidase: Preparation, structure and potential allergenicity. *International Journal of Biological Macromolecules.* 107, 2057-2064.
- Liu, N. N., Liu, W., Wang, D. J., Zhou, Y. B., Lin, X. J., Wang, X., Li, S. B. (2013). Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica Thunb.* *Food Chem.* 2013, 138, 478–483.
- Liu, Z., Liu, B., Kong, J., and Deng, J. (2000). Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel-derived tyrosinase biosensor. *Analytical Chemistry.* 72(19)4707–4712.
- Lu, Z., Yu, Z., Gao, X., Lu, F., Likui, Z. (2005). Preservation effects of gamma irradiation on fresh-cut celery. *Journal of Food Engineering.* 67(3), 347-351.
- MacDonald, L., Schaschke, C.J. (2000). Combined effect of high pressure, temperature and holding time on polyphenoloxidase and peroxidase activity in banana (*Musa acuminata*). *J Sci Food Agric.* 1;80(6):719-724.
- Makroo, H., Rastogi, N.K., Srivastava, B. (2017). Enzyme Inactivation of Tomato Juice by Ohmic Heating and Its Effects on Physico-Chemical Characteristics of Concentrated Tomato Paste. *Journal of Food Process Engineering.* 40(3)12464
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., and Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.* 89, 411–420.
- Maraeia, R.W., Elsayyid, K.M. (2017). Chemical quality and nutrient composition of strawberry fruits treated by  $\gamma$ -irradiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences.* 10(1), 80-87.
- Marino, S.M., Fogal, M., Bisaglia, et al. (2011). Investigation of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase reactivity toward chlorophenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 505(1)67–74.

- Markhand ,G.S., Abul-Soad, A.A.,Mirbahar A.A., Kanhar N.A.(2010). Fruit characterization of Pakistani dates, *Pak. J. Bot.* 42 (6) 3715–3722.
- Martín-Sánchez, A. M., Cherif, S., Ben-Abda, J., Barber-Vallés, X., Pérez-Álvarez, J. Á., and Sayas-Barberá, E. (2014). Phytochemicals in date co-products and their antioxidant activity. *Food Chem.* 158, 513–520.
- Mason, H.S., Fowlks, W.L., Peterson, E.(1955). Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J. Am. Chem. Soc.* 77,2914-2915.
- Masuda T, Momoji K, Hirata T, Mikami B.(2014).The crystal structure of a crustacean prophenoloxidase provides a clue to understanding the functionality of the type 3 copper proteins. *FEBS J.*281(11):2659–2673.
- Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A , Yoshitsu H, Sugiyama,M.(2006).Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis.*J Biol Chem.*281(13):8981– 8990.
- Matsui,K.N.,Granadob,L.M.,de Oliveirac,P.V.,Tadini,C.C.(2007). Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions. *LWT - Food Sci Technol.* 40 852–859.
- Mauracher SG, Molitor C, Al-Oweini R, Kortz U, Rompel A.(2014).Latent and active abPPO4 mushroom tyrosinase cocrystallized with hexatungstotellurate(VI) in a single crystal. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*70(Pt 9):2301–2315.
- Mcevely, A.J., Iyengar, R. And Otwell, W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*,32(3):253-73.
- Mdluli, K. M. (2005). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*). *Food Chemistry*, 92, 311–323.
- Mena,P.,Vegara ,S., Marti,N., García-Viguera ,C., Saura,D.,Valero,M.(2013).Changes on Indigenous Microbiota, Colour, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Pasteurised Pomegranate Juice. *Food Chem.*141(3):2122–2129.
- Mendonca S.C & Guerra,N. B. (2003). Metodos fisicos e quimicos empregados no controle do escurecimento enzimatico de vegetais. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 37(2), 113–118.
- Mesquita,V,L,V.,Queiroz,C.(2013).Chapter 10 ;Enzymatic Browning. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*,387-418.
- Mimouni,Y., Siboukeur .O. (2011). Etude des propriétés nutritives et diététiques de sirops de dattes extraites par diffusion en comparaison avec des sirops à haute teneur en fructose (isoglucose) issus de l'industrie de l'amidon. *Ann Sci Tech* 3:1–11.

- Mishra, B.B., Gautam, S., & Sharma, A. (2012). Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chem.* 134, 1855–1861.
- Misra, N., Tiwari, B., Raghavarao, K., Cullen, P.J. (2011). Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Eng. Rev.* 3(3–4), 159–170.
- Mogol, B.A., Yıldırım, A., Gökmen, V. (2010). Inhibition of enzymatic browning in actual food systems by the Maillard reaction products. *Journal Of Science Of Food And Agriculture.* 90(15)2556-2562.
- Molitor, C., Mauracher, S.G., Rompel, A. (2016). Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 29;113(13):E1806-15.
- Molitor C, Mauracher SG, Rompel A. (2015). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of latent, active and recombinantly expressed aurone synthase, a polyphenol oxidase, from *Coreopsis grandiflora*. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications.* 71(6):746-751.
- Montero, P., A´valos, A., Perez-Mateosa, M. (2001). Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chem.* 75,317-324.
- Morrissey, M. T., & Almonacid, S. (2005). Rethinking technology transfer. *Journal of Food Engineering.* 67(1),135-145.
- Moss, J. W. E., and Ramji, D. P. (2016). Nutraceutical therapies for atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 13, 513–532.
- Mrabet, A., Jiménez-Araujo, A., Fernández-Bola-os, J., Rubio-Senent, F., Lama-Mu-oz, A., Sindic, M. (2016). Antioxidant phenolic extracts obtained from secondary Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera L.*) by hydrothermal treatments. *Food Chem.* 196, 917–924.
- Mukherjee, S., Basak, B., Bhunia, B., Dey, A., Mondal, B. (2013). Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.* 12(1)61–73.
- Naci, D., Akpınar, M., Ali, A. (2001). Novel Concentration Method for Concentrating Solutions of Protein Extracts Based on Dialysis Techniques. *Analytical Biochemistry.* 297, 192- 194.
- Nadar, S.S., Pawar, R.G., Rathod, V.K., 2017. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. *Int. J. Biol. Macromol.* 101, 931–957.
- Nath, P., Kale, S.J., Chauhan, O.P., Gupta, R.K. (2016). High pressure processing induced changes in bioactive compounds, antioxidant activity, microbial safety and color attributes of coriander paste. *Agric. Res.* 5 (2), 182–192.

- Ngazee, E.; Icishahayo, D.; Coutinho, T.A.; Van der Waals, J.E.(2012). Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to softrot. *Plant Dis.*96, 186–192.
- Niemira, B.A.(2012). Cold plasma decontamination of foods. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 3, 125–142.
- Niphadkar, S.S., Rathod, V.K.(2015). Ultrasound-Assisted Three-Phase Partitioning of Polyphenol Oxidase from Potato Peel (*Solanum tuberosum*). *Biotechnol. Prog* 31, 1340–1347.
- Niphadkar, S.S., Vetal, M.D., Rathod, V.K.(2015). Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Waste Potato Peel by Aqueous Two-Phase Extraction. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 45, 632–649.
- Nirmal, N.P., Benjakul, S.(2009). Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Food Chem.* 116, 323-331.
- Nisar, R., Baba, W. N., & Masoodi, F. A. (2015). Effect of chemical and thermal treatments on quality parameters and antioxidant activity of apple (pulp) grown in high Himalayan regions. *Cogent.Food & Agriculture*, 1(1), 1063797.
- Nixon, R.W.(1951).The date palm:tree of life in the subtropical deserts, *Econ. Bot.* 5 (3).274–301
- Noci F.,Riener, J., Walkling-Ribeiro, M., Cronin, D., Morgan, D., & Lyng, J. (2008). Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (PEF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice. *Journal of Food Engineering*, 85(1), 141-146.
- Nunez-Delicado, E., Sojo, M.M., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A.(2003). Partial Purification of Latent Persimmon Fruit Polyphenol 2058–2063
- Oktay, M., Küfrevioglu, I., Kocacaliskan, I. and Sakiroglu, H.(1995). Polyphenol oxidase from Amasya apple. *J. Food Sci.* 60, 495–499.
- Onsa, G.H., Saari, N. b., S., J., Bakar, J.(2000). Latent Polyphenol Oxidases from Sago Log (*Metroxylon sagu*): Partial Purification, Activation, and Some Properties. *J. Agric. Food Chem.*48, 5041–5045.
- Onslow, M.W. (1920). Oxidising Enzymes. III: The Oxidising Enzymes of some Common Fruits.*Biochem. J.*, 14, 541
- Orenes-Pinero, E., Garcia- Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A.(2006). Latent polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): purification, . *J. Sci. Food Agric.* 2178, 2172–2178.
- Ortega,F. E.,Dominguez, E., Burestedt, J. Emneus, L.,Gorton,and Marko-Varga,G.(1994). “Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds,”*Journal of Chromatography A*,vol.675,no.1-2,pp.65–78.

- Ortuño, C., Duong, T., Balaban, M., Benedito, J.(2013). Combined high hydrostatic pressure and carbon dioxide inactivation of pectin methylesterase, polyphenol oxidase and peroxidase in feijoa puree. *J. Supercrit. Fluids*.82, 56–62
- Otles ,S.,Ozgoz, S.(2014).Health effects of dietary fiber, *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 13(2 )191–202.
- Ould El Hadj ,M.D., Cheick ,M., Hamdi ,W .(2012) .Etude comparative de la production d'éthanol brut à partir de trois variétés de dattes communes (Degla Beida, Tachrewit et Hamraya) réparties dans les différentes classes de dattes (molle, demi molle et sèche) de la cuvette de Ouargla (Sahara septentrional est algérien). Algérien. *J Arid Envir* 2:78–87.
- Olusesan A.T., Azura L.K., Forghani B., Bakar F.A., Mohamed A.K.S., Radu S., Manap M.Y.A., Saari N. (2011). Purification, characterization and thermal inactivation kinetics of a nonregioselective thermostable lipase from a genotypically identified extremophilic *Bacillus subtilis* NS 8. *New Biotechnol*, 28: 738-745.
- Oxidasa, P., Physalis, D.E.U., Por, Y.A., Bifásicos, S.(2011). Development of an extraction method of golden berry (*Physalis peruviana L.*) polyphenol oxidase and isolation by aqueous two phase system. *Vitae* 18, 124–132.
- Ozoglu,H. and A. Bayindirli.(2002). Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control*, 13: 213-221.
- Pajot,H.F., Fariña,J.I., De Figueroa,L.I.C.(2011). Evidence on manganese peroxidase and tyrosinase expression during decolorization of textile industry dyes by *Trichosporon akiyoshidainum*. *International biodeterioration & biodegradation* 65(8),1199-1207.
- Palma-Orozco,G.,Ortiz-Moreno,A.,Dorantes-Alvarez,L.,Sampedro,J.G., Nájera,H.(2011). Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). *Phytochemistry*.72(1):82-8.
- Panadare, D.C., Rathod, V.K..(2017). Extraction of peroxidase from bitter gourd (*Momordica charantia* ) by three phase partitioning with dimethyl carbonate (DMC) as organic phase. *Process Biochem.* 61, 195–201.
- Pankaj,S.K., Misra, N.N.,Cullen, P.J., (2013).Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 19,153–157.
- phenolics and antioxidant capacity of stored mung bean sprouts. *Food Chem.* 239,1160-1166
- Pinto, M.S.T., Siqueira, F.P., Oliveira, A.E.A., Fernandes, K.V.S., 2008. A wounding-induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Phytochemistry*.69, 2297-2302.
- Piyasena,P., Mohareb.,McKellar,R.C.(2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int J Food Microbiol*.87(3),207-16.

- Porter, B.N. (1993). Sacred Trees, Date Palms, and the Royal Persona of Ashurnasirpal II, *JNear Eastern Stud.* 52 (2) 129–139.
- Praporscic, I., Lebovka, N., Ghnimi, S., & Vorobiev, E. (2006). Ohmically heated, enhanced expression of juice from apple and potato tissues. *Biosystems Engineering*, 93(2), 199–204.
- Queiroz, C., Lopes, M.L.M., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L. (2008). Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Rev. Int.* 24, 361e 375.
- Rapeanu, G., Loey, A.V., Smout, C., Hendrickx, M. (2006). Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera ssp. sativa*). *Food Chem.* 94, 253–261.
- Rastall, R. (2007). *Novel Enzyme Technology for Food Applications*, Woodhead Publishing, Cambridge.
- Rautiainen, S., Manson, J. E., Lichtenstein, A. H., and Sesso, H. D. (2016). Dietary supplements and disease prevention – a global overview. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 407–420
- Raviyan, P., Zhang, Z., Feng, H. (2005). Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: Effect of cavitation intensity and temperature on inactivation. *Journal of Food Engineering* 70, (2), 189–196.
- Rawson, A., Tiwari, B., Patras, A., Brunton, N., Brennan, C., Cullen, P., & O'Donnell, C. (2011). Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International*. 44(5), 1168–1173.
- Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J., & Lyng, J. G. (2008). Combined effect of temperature and pulsed electric fields on apple juice peroxidase and polyphenoloxidase inactivation. *Food Chemistry*, 109(2), 402–407.
- Robert, C., Rouch, C., Cadet, F. (1998). Inhibition of palmito (*Acanthophoenix ru-bra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem.*, 59, 355–60.
- Rocha, A.M.C., Cano, M.P., Galeazzi, M.A.M., Morais, A.M.M.B. (1998). Characterization of “Starking” apple polyphenoloxidase. *J. Sci. Food Agric.* 77, 527–534.
- Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*. 14, 33–43.
- Saafi, E. B., Louedi, M., Elfeki, A., Zakhama, A., Najjar, M. F., Hammami, M., (2011). Protective effect of date palm fruit extract (*Phoenix dactylifera L.*) on dimethoate induced-oxidative stress in rat liver. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63, 433–441.
- Sachde, A.G., Al-Bakir, A.Y., Abdul-Raheem, J.A.K. (1989). Polyphenol oxidase from Barhee and Zahdi dates Purification. *Journal of Food Biochemistry*. 12:227–240.

- Saeeduddin,M.,Abid,M.,Jabbar,S.,Wu,T.,Hashim,M.M.,Awad,F.N.,Hu,B.,Lei,S.,Zeng,X.(2015). Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions. *LWT - Food Sci Technol.*64:452–8.
- Sakiroglu ,H., Kufrevioglu ,I.O., Kocacaliskan ,I., Oktay ,M., Onganer ,Y.(1996). Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis Rechst.*) polyphenol oxi-dase. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 2982–2986.
- Sakiroğlu, H., Oztürk ,A.E.,Pepe,A.E.,Erat,M.(2008). Some kinetic properties of polyphenol oxidase obtained from dill (*Anethum graveolens*). *J Enzyme Inhib Med Chem.*23(3):380-5.
- Saeidian,S.(2013). Inhibitory Effect of Cysteine and Glycine Upon Partial Purified Polyphenol Oxidase of *Pyrus communis*. *Advances in Biological Research.*6,216-222.
- Saeidian,S., Keyhani,E., Keyhani ,J.(2007). Effect of ionic detergents, nonionic detergents, and chaotropic agents on polyphenol oxidase activity from dormant saffron (*Crocus sativus L.*) corms. *J Agric Food Chem.* 55,3713-9.
- Saleh, E. A., Tawfik, M. S., and Abu-Tarboush, H. M. (2011). Phenolic contents and antioxidant activity of various date palm (*Phoenix dactylifera L.*) fruits from Saudi Arabia. *Food Nutr. Sci.* 2, 1134–1141.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F.(1988). Characterisation of catecholase and cresolase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 27:319–321.
- Sanchez Ferrer,A.,Rodriguez-Lopez,J.N.,Garcia Canovas,F.,Garcia Carmona,F. (1995) .Tyrosinase:a comprehensive review of its mechanism.*Biochim.Biophys .Acta* 1247 ,1–11.
- Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F., Garcia-Carmona, F.,(1993). Partial Purification of Soluble Potato Polyphenol Oxidase by Partitioning in an Aqueous Two-Phase System. *J. Agric. Food Chem.* 41,1219–1224.
- Sanchez-Vega,R.,Mujica-Paz,H.,Marquez-Melendez,R.,Ngadi,M.O.,Ortega-rivassanz,E.(2009). Enzyme inactivation on apple juice treated by ultrapasteurization and pulsed electric fields technology. *Journal of Food Processing and Preservation.*33(2009) 486–499.
- Saratale.GS, Saratale.G.D,J.S.Chang,andS.P.Govindwar.(2011).Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review,”*Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.*42(1)138–157.
- Schilling, S., Toepfl, S., Ludwig, M., Dietrich, H., Knorr, D., Neidhart, S., Schieber, A., & Carle, R.(2008).Comparative study of juice production by pulsed electric field treatment and enzymatic maceration of apple mash. *European Food Research and Technology.*226(6),1389-1398.
- Schilling,S., Alber, T., Toepfl, S.,Neidhart,S.,Knorr,D.,Schieber,A.,& Carle, R.(2007). Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 127-134.



- Schweitzer ,A.D., Revskaya ,E., Chu ,P., Pazo,V., Friedman,M.,Nosanchuk,J.D, Cahill,S., Frases,S., Casadevall ,A., Dadachova,E. (2010).Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer. *Int JRadiatOncol.* 78,1494–502.
- Shomer ,I., Borochoy-Neori, H., Luzki, B and Merin ,U.(1998).Morphological, structural and membrane changes in frozen tissues of Madjhoul Date (*Phoenix dactylifera L.*) fruits. *Postharvest Biol. Technol.* 14, 207–215.
- Siddiq, M., Dolan, K.D.,(2017). Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*). *Food Chem.* 218, 216–220
- Siddiq, M.,Aleid, S. M., and Kader, A. A.(2013). Dates Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits, 1st Edn. New Delhi: Wiley-Blackwell.
- Sikora,M., Świeca,M.(2018).Effect of ascorbic acid postharvest treatment on enzymatic browning, phenolics and antioxidant capacity of stored mung bean sprouts .*Food chem.*239,1160-1166.
- Silva ,F,V.M.,Sulaiman,A.(2018). Polyphenoloxidase in Fruit and Vegetables: Inactivation by Thermal and Non-thermal Processes. Reference Module in Food Science.
- Simon, H. (1978).The Date Palm Bread of the Desert, first ed. Dodd, Mead,.
- Simões,A.D.N.,Moreira,S.I., Soares,P.R.,Ferreira,N.D.F.,Puschman,R.(2015). The effects of storage temperature on the quality and phenolic metabolism of whole and minimally processed kale leaves. *Acta Scientiarum. Agronomy.*37(1)101-107.
- Singh ,A.,Wadhwa,N.(2017).Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*). *J Food Sci Technol.* 54(7):2085-2093.
- Sknchez-ferrer, A., Bru, R., Garcia-carmona, F.(1990). Partial Purification of a Thylakoid-Bound Enzyme Using Phase Partitioning. *Anal. Biochem.* 282, 279–282.
- Sojo, M.M., Nun, E., Garcı, F.(1998). Partial Purification of a Banana Polyphenol Oxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for Removal of Polyphenols. *J.Agric.FoodChem.* 46, 4924–4930.
- Soria ,A,C.,Villamiel,M.(2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review.*Trends in Food Science & Technology.*21(7):323-331
- Souli, A., Sebai, H., Rtibi, K., Chehimi, L., Sakly, M., Amri, M.(2014).Effects of dates pulp extract and palm sap (*Phoenix dactylifera L.*) on gastrointestinal transit activity in healthy rats. *J. Med. Food*,17, 782–786
- Soysal,C.,Söylemez,Z.(2005). Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. *Journal of Food Engineering*,68(3),349-356.
- Stephanopoulos,G., Santos ,C.N.S.(2011).Methods for identifying bacterial strains that produce l-tyrosine. *United States Patent Appl US.0151496-A1.09.02.26.*

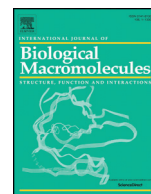
- Streffer, K., Vijgenboom, E., Tepper, A.W.J.W., Makowera, A., Schellera, F.W., Canters, G.W., Wollenberger, U. (2001). Determination of phenolic compounds using recombinant tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *Analytica Chimica Acta*, vol. 42(2) 201–210.
- Sulaiman, A., Silva, F.V.M., 2013. High pressure processing, thermal processing and freezing of 'Camarosa' strawberry for the inactivation of polyphenoloxidase and control of browning. *Food Control*. 33 (2), 424 – 428.
- Sulaiman, A., Farid, M., Silva, F.V. (2017). Strawberry puree processed by thermal, high pressure, or power ultrasound: Process energy requirements and quality modeling during storage. *Food Sci Technol Int*. 23(4):293-309.
- Sulaiman, A., Soo, M.J., Farid, M., Silva, F.V.M. (2015). Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits: Modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 165, 133-140.
- Sun, H. J.; Wang, J.; Tao, X. M.; Shi, J.; Huang, M. Y.; Chen, Z. (2012). Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Rape Flower. *J. Agric. Food. Chem.* 60, 823–829.
- Surowsky, B., Fischer, A., Schlueter, O., Knorr, D. (2013). Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 19, 146–152.
- Tajchakavit, S., Ramaswamy, H.S. (1997). Continuous-flow microwave inactivation kinetics of pectin methyl esterase in orange juice. *Journal of food processing and preservation*. 5, 365-378
- Tao, Y.M., Yao, L.Y., Qin, Q.Y., & Shen, W. (2018). Purification and characterization of polyphenol oxidase from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) bulbs. *J Agric Food Chem*. 61, 2662-12669.
- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M. M., Pavan, S., & Montemurro, C. (2017). Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(2), 377.
- Teng, J., Gong, Z., Deng, Y., Chen, L., Li, Q., Shao, Y., Lin, L., Xia, W. (2017). Purification, characterization and enzymatic synthesis of theaflavins of polyphenol oxidase isozymes from tea leaf (*Camellia sinensis*). *LWT-Food Sci. Technol.* 80, 263-270.
- Terefe, N. S., Gamage, M.; Vilkh, K.; Simons, L.; Mawson, R.; Versteeg, C. (2009). The kinetics of inactivation of pectin methyl esterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. *Food Chemistry*. 117, 20-27.
- Terefe, N.S., Kleintschek, T., Gamage, T., Fanning, K.J., Netzel, G., Versteeg, C., Netzel, M. (2013). Comparative effects of thermal and high pressure processing on phenolic phytochemicals in different strawberry cultivars. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 19, 57 – 65.
- Terefe, N.S., Yang, Y.H., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C. (2010). High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (1), 52 – 60.

- Thipyapong, P.; Melkonian, J.; Wolfe, D.W.; Steffens, J.C.(2004).Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Sci.*167, 693–703.
- Thompson, L. U., Boucher, B. A., Liu, Z., Cotterchio, M., and Kreiger,N. (2006). Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. *Nutr. Cancer* 54, 184–201.
- Tiwari, B., O'Donnell, C., Cullen, P.(2009). Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *J. Food Eng.* 93 (2),166-171.
- Tsivinska, M. V, Antonyuk, V.O., Stoika, R.S.(2015). Isolation and properties of polyphenol oxidase from basidocarps of *Lactarius pergameous Fr.* (Fr.) *Fungi. Ukr. Biochem.* 87, 56–65.
- Tülin,A. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*) heads. *Food Chemistry.*87:59–67.
- Ülker, F.,Yerlitürk,L, oktay,A., sinan,S.,Gencer,N and Özensoy,Ö.G.(2007).characterization of polyphenoloxidase from wild pear (*pyrus elaeagnifolia*), *Journal of Food Biochemistry* 32 ,368–383.
- Ünal, M. Ü.(2007).Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry.*2007. 100, 909-913
- Ünal, M.Ü., Şener, A. and Şen, K. (2007). Characterization of Sultaniye grape (*Vitis vinifera L. cv. Sultana*) polyphenol oxidase. *Int. J. Food Sci. Technol.*42, 1123–1127.
- Vaidya, B.K., Suthar, H.K., Kasture, S., Nene, S.(2006). Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. *Biochem. Eng. J.* 28,161–166.
- Valko,M.,Morris,H.,Cronin,M.T.(2005).Metals,toxicity and oxidative stress.*Curr.Med. Chem.*12,1161-1208.
- Vanitha,S.C.; Niranjana, S.R.; Umesha, S.(2009).Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. *J. Phytopathol.*, 157, 552–557.
- Venkatesh,M.S.,Raghavan,G.S.(2004). An Overview of Microwave Processing and Dielectric Properties of Agri-food Materials. *Biosystems Engineering.*88(1) 1-18.
- Vercet, A., Sa´ nchez, C., Burgos, J., Montanes, L., & Lo´ pez-Buesa, P. (2002). The effects of manothermosonication on tomato pectic enzymes and tomato paste rheological properties. *Journal of Food Engineering*,53, 273–278.
- Vian,M.A., Fernandez, X.,Visinoni, F., & Chemat, F.(2008). Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 1190(1), 14-17.
- Vinson, J. A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., and Proch, J. (2005). Drie fruits: excellent in-vitro and in-vivo antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* 24, 44–50.

- Virador, V.M., Grajeda, J.P.R., Blanco-Labra, L., Mendiola-Olaya, E., Smith, M., G., Moreno, A., Whitaker, J.R. (2010). Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. *Agric. Food Chem.*, 58, 1189–1201.
- Voet, D., Voet, J.G. (2011). *Biochemistry*, 4th Edition. Courier/Kendallville. USA.
- Waliszewski, K.N., Marquez, O., Pardio, V.T. (2009). Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chem.* 117, 196-203.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D., Riener, J., Lyng, J., & Morgan, D. (2008). Reduction of *Staphylococcus aureus* and quality changes in apple juice processed by ultraviolet irradiation, pre-heating and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 89(3), 267-273.
- Warner, J., Stoler, E.J. (2011). Color composition containing an aromatic compound and tyrosinase. *United States Patent. Appl. US* .0113571-10.11.15.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I., Hendrickx, M.E., and Tobback, P.P. (1998). Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *LWT - Food Science and Technology*. 31(1)1998, 44-49.
- Whitaker, J.R. (1994). *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, second ed. Marcel Dekker, New York. 271–556.
- Xu, D., Chen, J., Yang, Z. (2012). Use of cross-linked tyrosinase aggregates as catalyst for synthesis of L-DOPA. *Biochem Eng J*. 63:88–94.
- Yamada K, Aoki T, Ikeda N, Hirata M, Hata Y, Higashida K. (2008). Application Of chitosan solutions gelled by mel tyrosinase to water-resistant adhesives. *J Appl Polym Sci*; 107:2723–31.
- Yapi, J.C., Gnanou, S.N., Ahi, A.P Kouassi-Koffi, D.J And Kouamé, L.P. (2004). Thermal inactivation kinetics and thermodynamic analysis of the first isoform of polyphenoloxidase Purified from edible yam “*Dioscorea cayenensis-rotundata cv Kponan*” . *Sky Journal of Biochemistry Research* .3(8), 72-79.
- Yi, J., Zhang, L., Ding, G., Hu, X., Liao, X., Zhang, Y. (2013). High hydrostatic pressure and thermal treatments for ready-to-eat wine-marinated shrimp: An evaluation of microbiological and physicochemical qualities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 20(2013)16–23.
- Yoon, M.M.L., Silva, F.V.M. (2011). Inactivation of Fruits Polyphenoloxidase Using High Pressure and Thermal Processing. Project CM 48, *Chemical and Materials Engineering*. University of Auckland.
- Yoruk, R & Marshall, M.R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Chem.* 27, 361–422
- Zaidi, K. U., Ali, A. S., Ali, S. A., & Naaz, I. (2014). Microbial Tyrosinases: Promising Enzymes for Pharmaceutical, Food Bioprocessing, and Environmental Industry. *Biochemistry Research International*, 854687.

- Zaini, N.A.M., Osman, A., Hamid, A.A., Ebrahimpour, A., Saari, N.(2013). Purification and characterization of membrane-bound polyphenoloxidase (mPPO) from Snake fruit [ (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss)]. *Food Chem.* 136, 407–414
- Zhang, M., Tang, J., Mujumdar, A., & Wang, S. (2006). Trends in microwave-related drying of fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 17(10), 524-534.
- Zhang, Y., Wang, Y., Zhou, L., Liao, X.(2010). A comparative study of inactivation of peach polyphenol oxidase and carrot polyphenol oxidase induced by high-pressure carbon dioxide. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45 (11), 2297–2305.
- Zhang,L., Dai,S.,Brannan.R.G.(2017). Effect of high pressure processing, browning treatments, and refrigerated storage on sensory analysis, color, and polyphenol oxidase activity in pawpaw (*Asimina triloba* L.) pulp.*LWT - Food Sci. Technol.* 86-49-54.
- Zhao,Y.Y., Yi,J.Y., Bi,J.F., Chen,Q.Q., Zhou,M, & Zhang,B.(2018). Improving of texture and rehydration properties by ultrasound pretreatment for infrared-dried shiitake mushroom slices. *Drying Technology,An International Journal*.<https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1456449>.
- Zhou,X,Xiao,Y,Meng,Y,Liu,B.(2018). Full inhibition of Whangkeumbae pear polyphenol oxidase enzymatic browning reaction by l-cysteine. *Food Chemistry*.266, 1-8.
- Zhu, Z., Zhan, L.(2010). Characterization of polyphenol oxidase from water caltrop (*Trapa acornis* Nakano) fruits. *Journal of Food Biochemistry*, 34 (6), 1125-1140.

# **VI-Article**



## Purification and characterization of catechol oxidase from *Tadela (Phoenix dactylifera L.)* date fruit

Farouk Benaceur<sup>a,b,\*</sup>, Hicham Gouzi<sup>a,\*\*</sup>, Boumediene Meddah<sup>b</sup>, Aref Neifar<sup>c,d</sup>, Ali Guergouri<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of enzymology, Department of biology, Faculty of Sciences of Nature and Life, Amar Thelidji university, Laghouat 03000, Algeria

<sup>b</sup> Laboratory of Bioconversion, Microbiological Engineering and Sanitary Security, Faculty of Sciences of Nature and Life, University of Mascara, Road Mamounia, 29000 Mascara, Algeria

<sup>c</sup> Laboratory of Molecular Biotechnology of Eukaryotes, Biotechnology Center of Sfax, University of Sfax, Tunisia

<sup>d</sup> Laboratory of Aqua, National Institute of Sciences and Technologies of the Sea (INSTM), Sfax, Tunisia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 August 2018

Received in revised form 13 September 2018

Accepted 17 September 2018

Available online 18 September 2018

#### Keywords:

Tadela catechol oxidase

Purification and biochemical characterization

Enzymatic browning

### ABSTRACT

Catechol oxidase (PPO) was extracted and purified from *Tadela (Phoenix dactylifera L.)* date fruit, by a procedure that included  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation followed by dialysis, Q-Sepharose bb ion-exchange chromatography and HPLC gel filtration chromatography. Some of its biochemical characteristics were studied. The purification rate and the yield were 80% and 20%, respectively. The *Tadela* date fruit catechol oxidase exhibited a molecular weight of 90 kDa using SDS-PAGE. The catechol oxidase showed only *o*-diphenolase and triphenolase activities while no monophenolase activity was detected. A better affinity was observed using catechol as substrate ( $K_m = 35 \text{ mM}$ ) with thus, a higher  $V_{\text{max}}/K_m$  ratio ( $80 \text{ U/mM}\cdot\text{mL}$ ). This enzyme is thermostable in the temperature range ( $30\text{--}60^\circ\text{C}$ ) with optimum activity in acidic range of pH. Four inhibitors were used for the control of enzymatic browning, of which sodium metabisulfite was the most potent ( $\text{IC}_{50} = 0, 11 \text{ mM}$ ). The values of  $K_i$  and mechanism of inhibition were also determined. No significant change on enzyme activity was noticed in the presence of metal ion and detergents. Therefore, thermal inactivation was studied in the temperature range between  $60$  and  $80^\circ\text{C}$  using catechol as substrate. Their kinetic ( $K, D, t_{1/2}, Zt, E_a$ ) and thermodynamic ( $\Delta H, \Delta G$  and  $\Delta S$ ) parameters were also estimated.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Dates, fruits of the date palm (*Phoenix dactylifera L.*), is cultivated in harsh semiarid and arid environments. This specie can grow in many regions, such as Arabian Peninsula, Australia, California, China, El Salvador, Fiji, Iran, India, Mauritius, Pakistan, Spain, northern and western Africa [1]. Algeria has remarkable figures of export of dates. Since 2016, Algeria has become the third largest producer of dates in the world after Egypt and Iran with a production in excess of 1 million metric tons [2]. Several varieties are grown in Algeria. They differ in their both shape and taste more or less soft. *Tadela* is one of Algerian date cultivars. It's characterized by its cubic and cylindrical shape and by its attractive soft taste and dark-brown color [3]. Dates are a good source of dietary fiber and sugars, natural antioxidants and secondary metabolites, Protein amino acids and enzymes, and also mineral salts and fatty acids [4]. Enzymes play a very important role during

the development and ripening of fruits including dates. Among these enzymes, polyphenol oxidase (PPO) is a key enzyme causing a change in the color of fruits and vegetables leading to their subsequent maturation [5]. The conversion of phenolic substrates to *o*-quinones by PPOs occurs by means of two oxidation steps in the presence of molecular oxygen: The hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols (monophenolase, cresolase, tyrosinase activities) and the oxidation of *o*-diphenols to *o*-quinones (*o*-diphenolase, catecholase, catechol oxidase activities). The nonenzymatic polymerization of *o*-quinone give rise to the formation of brown, red or black pigment called melanin [6]. Preventing this reaction present a challenge for scientists working on the agri-food industry topics.

Although several researchers have investigated the effect of heat treatment as a standard technique for extending the shelf life of food products through inactivation of enzymes and elimination of microorganisms, articles currently available in the literature on the combined effect of Inhibitors and the thermal inactivation process are rather few [7,8].

Beside, many papers were reported on purification and characterization of PPOs from different fruits and vegetables [9–12], while, the PPO of *Tadela* date cultivars did not receive a similar attention. To our knowledge, no purification or characterization of *Tadela* date fruit PPO was

\* Correspondence to: F. Benaceur, Laboratory of enzymology, Department of biology, Faculty of Sciences of Nature and Life, Amar Thelidji university, Laghouat 03000, Algeria.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [bfarouk800@gmail.com](mailto:bfarouk800@gmail.com) (F. Benaceur), [Stevnjobs03@gmail.com](mailto:Stevnjobs03@gmail.com) (H. Gouzi).

carried out before. Hence, in this paper, the catechol oxidase was extracted and purified from an original source and its biochemical characteristics in terms of optimal conditions, substrate specificity, kinetics parameters were investigated. Whereas, the control of enzymatic browning was also performed using metal ions, detergents and food additives inhibitors. Furthermore, a detailed kinetic and thermodynamic study of thermal inactivation was performed to understand the enzymatic behavior and its stability as a function of the temperature and heating time increase.

The results reported herein could help to minimize the loss of the organoleptic qualities of dates by controlling its enzymatic browning using chemical and physical methods. The combination of thermal inactivation with some inhibitors could give theoretical and practical basis to prevent this phenomenon during storing and food processing.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials and reagents

Algerian date fruit “Tadela” was harvested at full ripeness (Tamar stage) on November from a palm grove in Biskra region and kept at 4 °C in closed jars until use (Fig. 1).

All substrates used in this work and polyvinyl(poly) pyrrolidone (PVPP) were purchased from Sigma Aldrich. All inhibitors, detergents chaotropic agents and metals ions were obtained from Fluka.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (12 $\text{H}_2\text{O}$ ) and acetic acid were purchased from Normapur. The remaining reagents were of analytical grade. Distilled water was used in all experiments.

### 2.2. Purification of catechol oxidase

Dates were pitted, sliced into small disks, weighed (300 g) and homogenized in a blender with 500 mL of cold phosphate buffer at pH 7.0–0.05 M and 3% Polyvinyl (poly) pyrrolidone (PVPP) for 2 min.



**Fig. 1.** Algerian Tadela date fruit cultivar (*Phoenix dactylifera* L.) at full ripeness (Tamar stage). The fruit was harvested on November from a palm grove in Biskra region, located in the north-east of Algeria, about 248 miles from the capital (Algiers).

The PVPP was used to chelate phenolic compounds. A two-stage filtration was made using filter paper followed by double cold centrifugation at 10,000  $\times g$  for 15 min. The supernatant was recovered then was brought to 90% saturation with solid Ammonium sulfate  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The precipitated enzyme was separated by centrifugation at 20000  $\times g$  for 15 min at 10 °C. The supernatant was discarded and the precipitate was dissolved in a small amount of sodium phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0).

The concentrated enzyme solution was dialyzed at 4 °C against sodium phosphate buffer (0.01 M, pH 7.0) with two changes of the buffer during dialysis to remove the residual ammonium sulfate. The PEG-6000 (polyethylene glycol) was applied against dialysis bags as concentration method [13]. Furthermore, the concentrated PPO obtained was applied to the top of a Q-Sepharose Big Beats column (1.5  $\times$  18 cm) anion exchange chromatography previously washed and equilibrated with 0.05 M sodium phosphate buffer to remove unbound proteins. A linear NaCl gradient varying from 0.5 to 0 M in equilibrium with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) was used with a constant flow rate of 0.5 ml/min. Fractions with enzymatic and protein activities (measured at 280 nm) were collected and pooled for further purification. The amicon ultra-15 centrifugal filter unit (10 kDa molecular weight cutoff) was used to concentrate the enzyme extract. Finally, the gel filtration HPLC (C18 column Zorbax, 3–300 kDa, Agilent 1260 Infinity) was used for the determination of the molecular weight of the Tadela date PPO. A preliminary equilibration of column with sodium phosphate buffer (0.01 mM, pH 7) was also made.

### 2.3. Gel electrophoresis and molecular weight

In order to detect the enzymatic activity of purified extract, a zymogram was performed using 100 ml of 160 mM catechol in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5). Similarly, to determine the molecular weight, SDS-PAGE was used [14]. Enzyme solutions were denatured by heating at 100 °C for 5 min and addition of  $\beta$ -mercaptoethanol to reduce disulfide bonds. The samples were applied under reducing conditions to 5% stacking and 12% resolving polyacrylamide gel. The determination of the molecular weight was carried out using a molecular weight (MW) marker “PlusOne™ silver staining kit protein (17–1150-02 MW: 14–97 kDa)”.

### 2.4. Enzymatic activity assay and protein determination

Catechol oxidase activity was measured in the presence of catechol as substrate, recording *o*-benzoquinone production at 410 nm using Shimadzu UV spectrophotometer (UV-1800). It was ascertained that the auto-oxidation of catechol did not interfere in the activity measurement. Catechol oxidase activity was determined at 30 °C in a medium containing 0.1 ml of 0.8 M catechol solution prepared in 0.5 mM orthophosphoric acid, 0.9 ml of 0.05 M acetate buffer (pH 5.5) and 20  $\mu$ l of the enzyme solution. The initial rate ( $v_0$ ) was calculated from the linear portion of the absorbance versus time curve. One unit of PPO activity (U) was defined as the amount of enzyme that caused an increase in absorbance of 0.001 per min [15].

Likewise, in order to select protein-rich fractions as well as to calculate the specific activity, Bradford's method was used with BAS (bovine albumin serum) as standard.

All enzyme activity analyses performed in this work were carried out in triplicate and the average of values was considered. The error bars represent standard deviation (SD).

### 2.5. Optimal pH and temperature of catechol oxidase

The Optimal pH and temperature of catechol oxidase were determined by measuring the enzyme activity as described above. A wide pH range (2–10) was applied using three buffer systems: acetate buffer (50 mM, pH 2–5.5), phosphate buffer (50 mM, pH 6–8) and Tris-HCl



buffer (50 mM, pH 8–10). Likewise, the temperature range of 10–90 (in 10 °C increments) was chosen. The catechol, pyrogallol and 4-methylcatechol were used as substrates.

In addition, the thermal stability defined as the temperature in which the enzyme resides stable after a fixed incubation time was also studied for *Tadela* catechol oxidase in the range of temperature (30–90) using the same three substrates. The purified enzyme was incubated for 10 min at each temperature.

The pH and temperature values corresponding to the optimal activity were considered as optimal conditions and were fixed in all subsequent experiments.

## 2.6. Kinetics parameters and substrate specificity of catechol oxidase

The substrate specificity of purified catechol oxidase was studied using various substrates (catechol, 4-methylcatechol, chlorogenic acid, cresol, pyrogallol, L-DOPA, caffeic acid, and gallic acid at 10 mM). Furthermore, the kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) of catechol oxidase were determined for three substrates showing best activity: catechol (20 mM to 160 mM), 4-methylcatechol (10 to 60) and pyrogallol (10 mM to 120 mM).

Thus, to determine the catalytic efficiency, the ratio  $V_{max}/K_m$  was calculated from the data obtained using double reciprocal plot of Lineweaver-Burk. To initiate the enzymatic reaction, 5  $\mu$ l of purified enzyme was added to each substrate at determined concentration. The experiments were carried out in triplicate and the average values were represented.

## 2.7. Effects of metal ions, detergents and some food additives

The effect of some inhibitors currently used in food engineering (Citric acid, ascorbic acid, benzoic acid, salicylic acid, EDTA, L-cysteine, sodium metabisulfite, sodium azide, caffeic acid), of detergents (Tween 20, tween 80, SDS and triton x-100) and also of metal ions ( $AlCl_3$ ,  $CdSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $ZnSO_4$ , NaCl and KCl) on the activity of purified catechol oxidase was investigated using five different concentrations of each reagent (0.1, 1, 2, 5 and 10 mM).

## 2.8. Determination of $IC_{50}$ values and inhibition mechanism

The values of  $IC_{50}$  defined as concentration of inhibitor required to reduce the enzyme activity by 50% were calculated for L-cysteine, ascorbic acid, sodium metabisulfite and sodium azide using catechol as substrate.

Likewise, the mechanism and  $K_i$  values of purified catechol oxidase were determined using two different concentrations of each inhibitor and five concentrations of catechol (30–80 mM). The Lineweaver-Burk graphs were used to determine the type of inhibition.

## 2.9. Effect of some inhibitors on thermal stability of purified *Tadela* catechol oxidase

The effect of four most potent inhibitors (Sodium metabisulfite, ascorbic acid, L-cysteine and sodium azide) on thermal stability was studied using catechol as substrate. Three different concentrations of each inhibitor were chosen according to their  $IC_{50}$  values.

## 2.10. Heat inactivation and thermodynamic study

The effect of heat inactivation on purified catechol oxidase was studied by varying heating time (0–120 min) in the range of temperature 60–80 °C at atmospheric pressure.

After the incubation of tubes containing each 2 ml of enzyme at determined temperature, they were immersed directly in ice bath to stop the reaction, then 30  $\mu$ l of enzyme was used for activity assay. The catechol was chosen on the base of thermal stability results. The activity of

enzyme untreated was considered as 100%. The first-order reaction model was adopted to describe the kinetic of thermal inactivation.

The kinetics parameters ( $K$ : the inactivation rate constant ( $\text{min}^{-1}$ ),  $D$ : Decimal reduction (min),  $t_{1/2}$ : Half-life,  $Z_t$ : temperature sensitivity parameter and  $E_a$ : the activation energy) were calculated using the following equations [15].

$$\ln \frac{A}{A_0} = -Kt \quad (1)$$

where  $A$  &  $A_0$ : are residual and initial activities

$$D = \frac{2,303}{k} \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3)$$

$$\log \left( \frac{D_1}{D_2} \right) = \left( \frac{T_2 - T_1}{Z_T} \right) \quad (4)$$

$$\ln k = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

where  $A$  is the Arrhenius constant,  $R$ : is the gas constant (8.314 J/mole · K) and  $T$  is the absolute temperature (K).

Likewise, the values of variations in Gibbs free energy ( $\Delta G$ ), enthalpy ( $\Delta H$ ), and entropy ( $\Delta S$ ) were calculated using the equations below [12]:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \frac{K \cdot h_p}{K_B \cdot T} \quad (6)$$

$$\Delta H = E_a - nRT \quad (7)$$

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

where  $K_B$  is the Boltzmann constant ( $1.3806 \cdot 10^{-23}$  m<sup>2</sup> Kg/Ks)  $H_p$  is the Planck constant ( $6.6262 \cdot 10^{-34}$  J s).

## 2.11. Data analysis

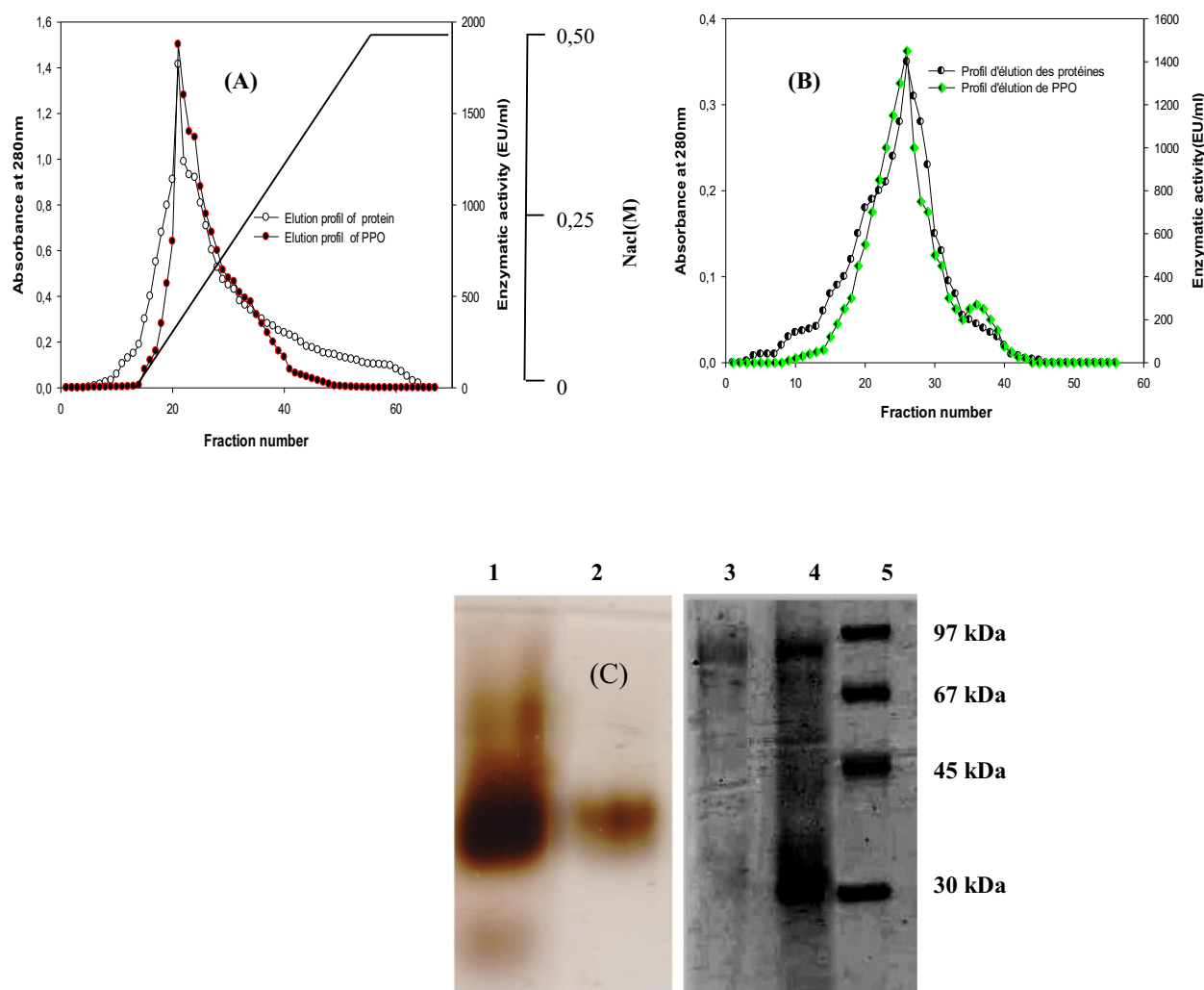
SigmaPlot Version 12.0 (Copyright© 2011 Systat Software, Inc.) was used to fit linear and Nonlinear regressions. Thus, analysis of variance (ANOVA) was carried out to evaluate significant ( $P < 0.005$ ) differences between samples.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Purification of catechol oxidase

The catechol oxidase was extracted from *Tadela* date fruit based on solubility, ionic charge and molecular weight. A summary of purification steps of catechol oxidase from *Tadela* date fruit using ammonium precipitation, Q-Sepharose Big Beads anion exchange chromatography and Zorbax HPLC gel filtration chromatography are shown in Fig. 2A&B and Table 1.

PPO was successfully purified to 79.9-fold with an overall recovery of 20.16% and specific activity of 8118.11 U/mg. The fold purification and specific activity differ from one source to another according to the procedure used as well as the proteins content. The PPO from apricot was purified 23.2 times using the Mono S. HR 5/50 GL column as last step with 51.01% recovery and specific activity of 459 U/mg [24], while the PPO from Borage was purified using TPP method. The fold purification and specific activity were estimated to be 3.59 and 410,090 U/mg [11], respectively. A very high fold purification values were reported for Cape gooseberry fruit PPO using double precipitation by acetone and ATSBs (169.4) with a specified activity



**Fig. 2.** Summary of purification steps of catechol oxidase from Tadela date fruit. (A) Separation on Q-Sepharose Big Beats anion exchange chromatography. (B) Zorbax HPLC gel filtration chromatography. (C) Native-PAGE and SDS-PAGE: Lanes 1 and 2: Zymogram of crude and purified PPO extract; Lanes 3 and 4: Denaturing SDS-PAGE of purified Tadela catechol oxidase and crude extract stained with Coomassie brilliant blue R-250; Lane 5: molecular weight marker. The samples were applied under reducing conditions to 5% stacking and 12% resolving polyacrylamide gel. Tadela date fruit exhibited a molecular weight of 90 kDa.

equal to 204.69 U/mg [22] and also for the eggplant PPO with a value of 259 and 4925 U/mg as fold purification and specific activity, respectively [18].

In addition, a zymogram was performed to reveal the enzymatic activity of the purified extract (Fig. 2C (lanes 1 and 2), while to determine the molecular weight, SDS-PAGE was used. A single characteristic band was obtained with a molecular weight of about 90 kDa (Fig. 2C (lane 4)). A wide range of molecular weight values of PPOs from fruits and vegetables were reported in the range of 32 up to 144 kDa [11,16–19]. Such a difference is related for possible to genetic diversity, the source of enzyme, and the experimental protocol used during purification [20].

### 3.2. Optimum pH and temperature

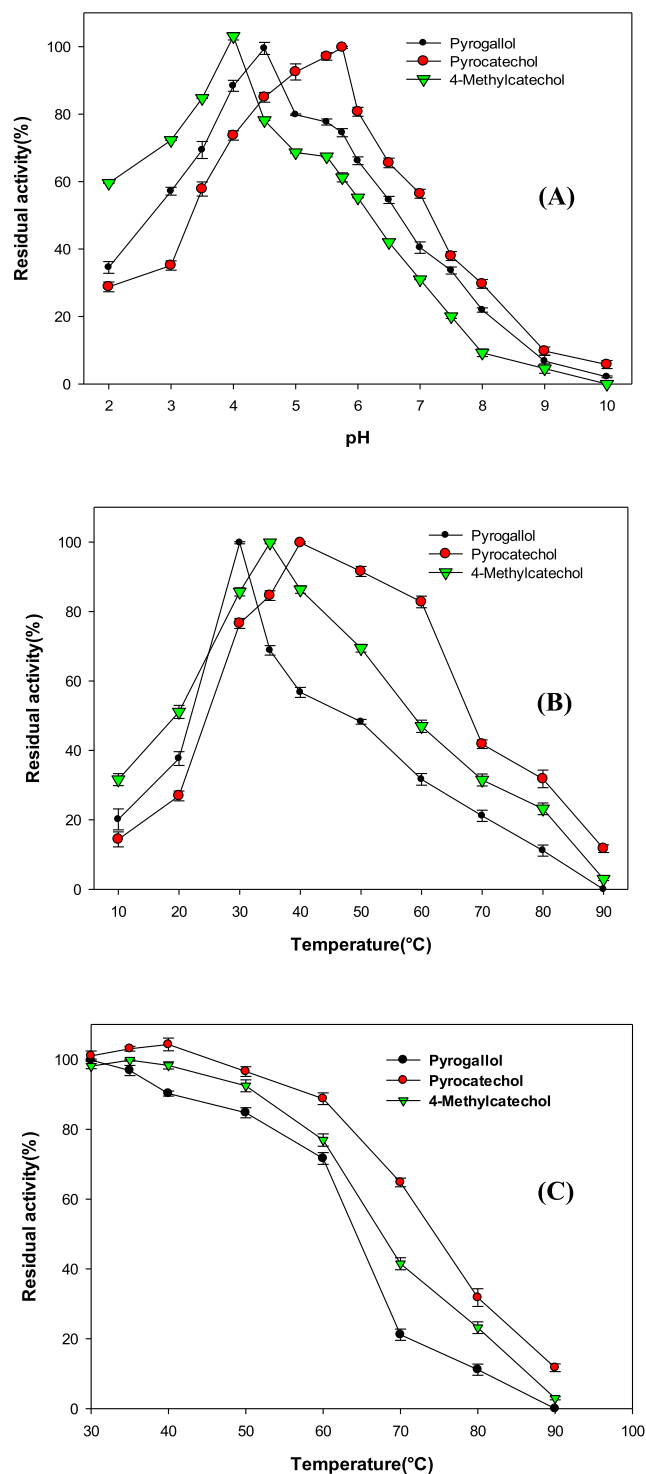
The effect of pH on the enzymatic activity of purified catechol oxidase was investigated using catechol, 4-methylcatechol and pyrogallol as substrates. The results thus obtained are shown in Fig. 3A and Table 3. The values of curve peak corresponding to the optimal activities were pH 4, pH 7 and pH 5.75 for 4-methylcatechol, pyrogallol and catechol, respectively.

The enzyme appears to be more active in the acidic domain than in the alkaline domain. At pH 7, enzyme lost 45%, 60% and 70% using catechol, pyrogallol and 4-methylcatechol, respectively. Such an activity loss may be due to the modification of the surface charge via the change of

**Table 1**

Summary of Purification procedure of Tadela catechol oxidase. The catechol oxidase from Tadela date fruit was purified using three steps. A total enzymatic activity of 5601.50 U with 80 fold-purification was obtained.

Purification steps	Total volume (ml)	Total activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Fold
Crude extract	175	27,778.35	273.2	101.67	100	1
Ammonium sulfate precipitation (80%)	30	15,310.17	119.39	128.23	55.1	1.3
Q-Sepharose Big Beats	8	2488.78	5.62	442.84	9	4.4
HPLC zorbax	20	5601.50	0.69	8118.11	20	79.9



**Fig. 3.** Influence of pH (A), temperature (B) and thermal stability (C) on the activity of purified Tadela catechol oxidase using catechol, pyrogallol, 4-methylcatechol as substrates. In thermal stability study, the enzyme was held at various temperatures (30–90 °C) for 10 min prior to cooling and assay at 30 °C. The Tadela catechol oxidase is stable in acidic range of pH and temperature range from 30 °C to 60 °C. Each data point is the mean of three experiments. Vertical bars represent standard deviations.

ionization state of the amino acids present on enzyme active site and/or the decrease of affinity in presence of a functional group ( $\text{CH}_3$  at meta position for 4-methylcatechol and  $\text{OH}$  at ortho position for pyrogallol) [21]. The optimum pH values of PPOs are usually ranged between 4 and 8 [9–12,16–19]. Most studies report the effect of pH with catechol

as substrate and there are few studies that report the effect of substrates on the optimum pH values [14,17].

For the study of the optimal temperature, the relative activity was measured at several temperature values ranging from 10 to 90 °C using three substrates (Catechol, pyrogallol and 4-methylcatechol) (Fig. 3B, Table 3). A maximum activity in the optimal temperature range 30–40 was observed, on either side, the enzymatic activity decreased due to their inactivation by thermal effect. The optimal temperature of PPO from different plant sources varies between 10 and 60 [16–19,22,23].

In addition, the thermal stability of purified catechol oxidase using catechol, pyrogallol and 4-methylcatechol as substrates was studied in the range of temperature 30–90 °C. (Fig. 3C & Table 3). We deduced that the enzymatic stability is inversely proportional to the increase of temperature. Different stability rates were observed for the three substrates used. Catechol oxidase from Tadela date fruit seems to be more thermostable using catechol as substrate.

The range of thermal stability was between 30 and 60 °C. Beyond this value, there is a considerable loss of activity up to a total inactivation of 90 °C. At 70 °C, the enzyme retained 62%, 40% and 20% of its activity using catechol, 4-methylcatechol and pyrogallol respectively. The values of both optimum pH and temperature seem to be dependent on the substrate used.

### 3.3. Substrate specificity and kinetics parameters

The substrate specificity of purified catechol oxidase was studied for eight substrates, different by their functional groups including three *o*-diphenolic substrates (dopamine, catechol and 4-methylcatechol), three monophenolic substrates (phenol, *L*-tyrosine and cresol) and three triphenolic substrates (pyrogallol, chlorogenic acid and gallic acid).

The enzymatic activity in the presence of each substrate was expressed as a percentage relative to the oxidation of catechol. The results thus obtained are summarized in Table 2. We found that Tadela catechol oxidase is able to oxidize only *o*-diphenolic and triphenolic substrates. Such behavior was also noticed for other PPOs [11,24].

Based on substrate specificity results, the kinetics parameters of purified catechol oxidase were calculated using catechol, 4-methylcatechol and pyrogallol as substrates. The double reciprocal plot of Lineweaver-Burk was used to estimate the values of  $V_{\text{max}}$  and  $K_m$ . The values of  $K_m$  (mM) and  $V_{\text{max}}$  obtained compared to the kinetic parameters values of PPO from several plant sources are summarized in Table 3. Among the substrates used, a better affinity was found for catechol with a low value of  $K_m$  and higher  $V_{\text{max}}/K_m$  ratio. Similar results were found for the PPO of wolf apple PPO [23] and Plums PPO [25].

**Table 2**

Substrate specificity for purified catechol oxidase from Tadela date fruit. The Tadela date fruit catechol oxidase oxidize well triphenolic and *o*-diphenolic substrates unlike monophenols. All experiments were performed three times. Data is presented as mean ( $\pm$ ) standard deviation.

Substrate	Wavelength (nm)	Relative activity (%)
<b>Monophenols</b>		
<i>L</i> -Tyrosine	475	0
Phenol	390	0
Cresol	485	0
<b><i>o</i>-Diphenols</b>		
Pyrocatechol	410	100
4-Methylcatechol	400	90.7
Dopamine	395	55.4
<b>Triphenols</b>		
Pyrogallol	475	83.2
Chlorogenic acid	481	67.5
Gallic acid	420	31.4

**Table 3**

Kinetic parameters of PPO from different plants. These parameters depend on the substrate used. *Tadela* catechol oxidase showed a best affinity for *o*-diphenolic substrates.

Source	Substrate	pH	T (°C)	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (U/mL)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (U/mM·mL)
<i>Tadela</i> (Our work)	Pyrocatechol	5	40	35	2801	80
	4-Methylcatechol	4	35	48.5	1353	28
	Pyrogallol	5.5	30	60.2	1082	18
Desert truffle	Pyrocatechol	3.6.7	30	0.14	50	357
	Tyrosine	5–6	30	2.5	87	34.8
Wolf apple	Pyrocatechol	6–6.5	28	6.47	3.42	0.5
	4-Methylcatechol	–	–	0.15	3.01	20
	Pyrogallol	–	–	20.11	3.90	0.19
Chest nut kernel	Pyrocatechol	7	40	92	1.5	0.016
	4-Methylcatechol	–	–	94	1.3	0.014
	Gallic acid	–	–	100	99	0.99
Radish	Catéchol	7	40	28.3	1587	56
	Pyrogallol	7	20	6.3	4328	687
	Chlorogénic acid	–	–	7.2	302	42
	Gallic acid	7–8	60	4.2	233	55.5
	L-Tyrosine	–	–	9.3	495	53.2
Honeydew peach	Caféique acid	–	–	77	1695	22.013
	Catechol	–	–	3.68	94	25.5
	Epicatechin	–	–	0.12	347	2891.6
	Catechin	7	40	0.14	219	1564.3

The values of kinetic parameters vary according to the substrate used but it was also reported that the source of enzyme, extraction and purification methods could affect the kinetic behavior of PPO [20].

#### 3.4. Effects of metal ions, detergents and some food additives

The effect of food additives on purified catechol oxidase was studied (Table 4). We can classified the inhibition efficiency as follow: the Sodium metabisulfite is the most potent inhibitor followed by Ascorbic acid, benzoic acid, sodium fluor, salicylic acid and L-cysteine, while the caffeic acid, citric acid and EDTA appear to be less effective. Our results

**Table 4**

Effect of Metal ions detergents and some food additives on purified *Tadela* catechol oxidase. No significant effect of metal ions and detergents was observed. The inhibition rate is proportional to the concentration increase of inhibitor and is dependent on its structural properties. Data is presented as mean (±) standard deviation.

Reagents	Relative activity (%)				
	0.1 mM	1 mM	2 mM	5 mM	10 mM
<b>a-Inhibitor</b>					
Sodium metabisulfite	50.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Ascorbic acid	60.3	10.7	0.0	0.0	0.0
L-cysteine	75.7	17.2	0.0	0.0	0.0
Sodium azide	80.3	50.5	44.1	0.0	0.0
Benzoic acid	85.7	57.2	46.5	0.0	0.0
Caffeic acid	100	87.1	73.9	59.7	38.6
Salicylic acid	100	97.5	86.6	78.0	65.3
Citric acid	109	100	90.7	90.7	75.0
EDTA	100	98.5	97.2	95.1	92.2
<b>b-Detergents</b>					
SDS	100	94.2	90.3	81.2	72.8
Tween 20	100	99.5	98.5	95.4	93.8
Tween 80	100	99	98.2	97.1	95.3
Triton x-100	100	97.3	96.8	92	89.6
<b>c-Metal ions</b>					
AlCl <sub>3</sub>	100	87.7	78.4	72.8	65.7
CdSO <sub>4</sub> ·8H <sub>2</sub> O	100	90.1	87.0	83.7	78.4
CaCl <sub>2</sub>	100	98.9	96.7	94.5	90.1
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	101	105	110.7	113.6	117.4
FeSO <sub>4</sub>	100	103	108.5	110.2	114.1
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100	101	105.1	108.7	111.3
NaCl	100	100	100	99.9	98.0
KCl	100	100	99.3	98.8	98.1

are similar to those found for blueberry PPO [10] and Mung bean sprouts PPO [26].

Likewise, the effect of anionic and cationic detergents was also studied (Table 4). A low inhibition rate was observed on enzymatic activity using both cationic detergents (Tween 20, 80 and triton 100) and anionic detergent (SDS) at high concentrations (5 mM and 10 mM). Generally, the SDS is added to the reaction medium to activate the latent enzyme form [19,24] which is not the case with *Tadela* catechol oxidase.

Thus, the effect of monovalent and divalent metal ion was analyzed. A positive effect with a slight increase in enzymatic activity was noticed in the presence of Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. Our results are similar to those reported for apricot PPO [24] and Hemşin apple PPO [27]. An inhibition rate of 10%, 20 and 30% was observed in the presence of Ca<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup>. However, no effect was observed on enzyme activity in the presence of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>. The inhibition effect of these metal ions was also reported for the PPO of rape flower [28] and PPO from mamey fruit [29]. Polyphenol oxidase is a metalloenzyme containing copper in its active site, the effect of certain metals can be positive by increasing the stability and reinforcing the enzyme-substrate interactions, while some metals can decrease the oxygen level and modify valence cupric or bivalent state which will disrupt the enzymatic activity [27,30]. Others metals such as Zn may cause in reaction with copper the appearance of thionine which is a very potent inhibitor of PPO [31].

#### 3.5. Determination of IC<sub>50</sub> values and inhibition mechanism

The effect of four inhibitors (L-cysteine, ascorbic acid, sodium metabisulfite and sodium azide) was determined using catechol as substrate. The choice of this list was made based on the results above. The IC<sub>50</sub> and K<sub>i</sub> values (Table 5) are a key parameters to evaluate the inhibition efficiencies. They give an idea about the potency of an inhibitor, the lower it is, the more the inhibitor is considered powerful [8]. A competitive mode of inhibition was obtained using ascorbic acid. A similar mode of action was reported for PPO from different sources [11,32]. The inhibition mechanism by ascorbic acid is related to its ability to reduce *o*-quinones to *o*-diphenol compounds and to its chelating power of copper [33].

A noncompetitive inhibition was observed for L-cysteine. It may be due to its chelating potency of the copper ion from the active site and to the producing stable, colorless compounds [11]. Such behavior was also found for the Heads of lettuce PPO [33] but different from mixed type reported for purslane PPO [34].

Sodium azide, in turn, showed an uncompetitive type, with a decrease in the value of V<sub>max</sub> and K<sub>m</sub>. Its mode of action involves its attachment to the complex enzyme-substrate. Sodium azide can form complexes with several metalloenzymes, causing the inhibition of their activities [34].

Eggplant PPO [18] and Purslane PPO [34] showed an uncompetitive and mixed inhibition in presence of sodium azide, respectively. Furthermore, using sodium metabisulfite, a mixed inhibition type 1 was noticed. It was reported that sulfiting agents are a potent inhibitors of PPO and their mode of action is based on the formation of sulfoquinone compounds which stop the polymerization process of *o*-quinone [35]. A

**Table 5**

Inhibition type, K<sub>i</sub> and IC<sub>50</sub> values of some food additive on purified *Tadela* catechol oxidase activity. The mechanism and efficacy of inhibition depend on the inhibitor used. Metabisulfite and Ascorbic Acid were the best inhibitors. The Data is presented as mean (±) standard deviation.

Inhibitor	Catechol			Inhibition type
	IC <sub>50</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (mM)	R <sup>2</sup>	
Sodium metabisulfite	0.11	0.08	0.99	Mixed type 1
Ascorbic acid	0.22	0.20	0.99	Competitive
L-cysteine	0.33	0.25	0.99	Noncompetitive
Sodium azide	0.98	1.03	0.993	Incompetitive

competitive mode of inhibition was found for nettle PPO in presence of sodium metabisulfite [36]. In fact, it was reported that the inhibition mechanism depends on several factors including the enzyme source, the substrate used and structural or functional proprieties of inhibitor [35].

### 3.6. Effect of some inhibitors on thermal stability

The result of effect of three concentrations of inhibitors on the thermal stability of purified catechol oxidase is shown on Fig. 4A,B,C&D using L-cysteine, Sodium azide, ascorbic acid and sodium metabisulfite, respectively.

We observed an acceleration on the thermal inactivation process. The incubation times with  $IC_{50}$  value for each inhibitor was smaller. At 70 °C, Tadelate catechol oxidase retained 42%, 23%, 19% and 16% using Sodium azide, L-cysteine, ascorbic acid and Sodium metabisulfite, respectively. Such result can be explained by the conformational changes making the enzyme more sensitive to the temperature increase. Few studies reported the effect of some inhibitors on thermal inactivation of PPO as citric acid [7] and ascorbic acid [8] but to our knowledge no study reported the effect of L-cysteine, metabisulfite and sodium azide on thermal stability of PPO activity, yet.

In addition, this effect observed can be explained by banding type either on the free enzyme, on the complex or on both. The competitive inhibitor (ascorbic acid) binds only on the free enzyme and not on the enzyme-substrate complex, while a non-competitive inhibitor (L-cysteine) can bind to the free enzyme and also to the enzyme-substrate (ES) complex and the inhibition results from their independent fixation of substrate on the enzyme site. Sodium azide acts as an uncompetitive inhibitor. Its mode of action involves its binding to the

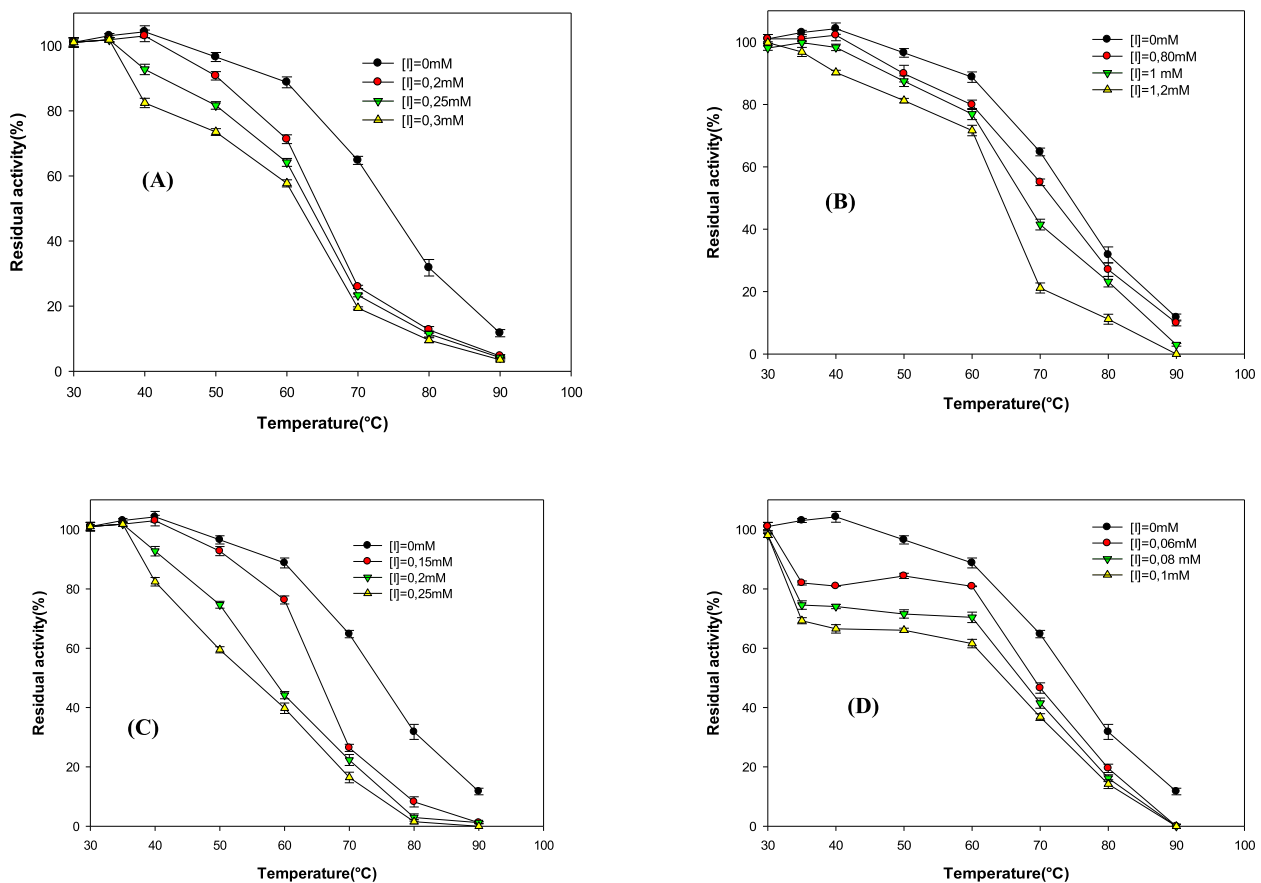
enzyme-substrate complex. In addition, the mixed inhibition (Sodium metabisulfite) seems to be interesting to study with its allosteric inhibition. Such inhibitor can bind to both the free enzymatic form and the enzyme-substrate (ES) complex, but unlike non-competitive inhibitor, this time, binding to the enzyme affects the affinity of the enzyme for its substrate [35].

The *o*-diphenolase activity showed more stability comparing to the triphenolase activity. Finally, the acceleration of inactivation process in presence of those inhibitors may be due to conformational changes of the secondary, tertiary and quaternary structure of the enzyme and to the destruction of its active. The breaking of some fragile bonds can also affect catalytic activity making the enzyme more sensitive to temperature [7,8,13].

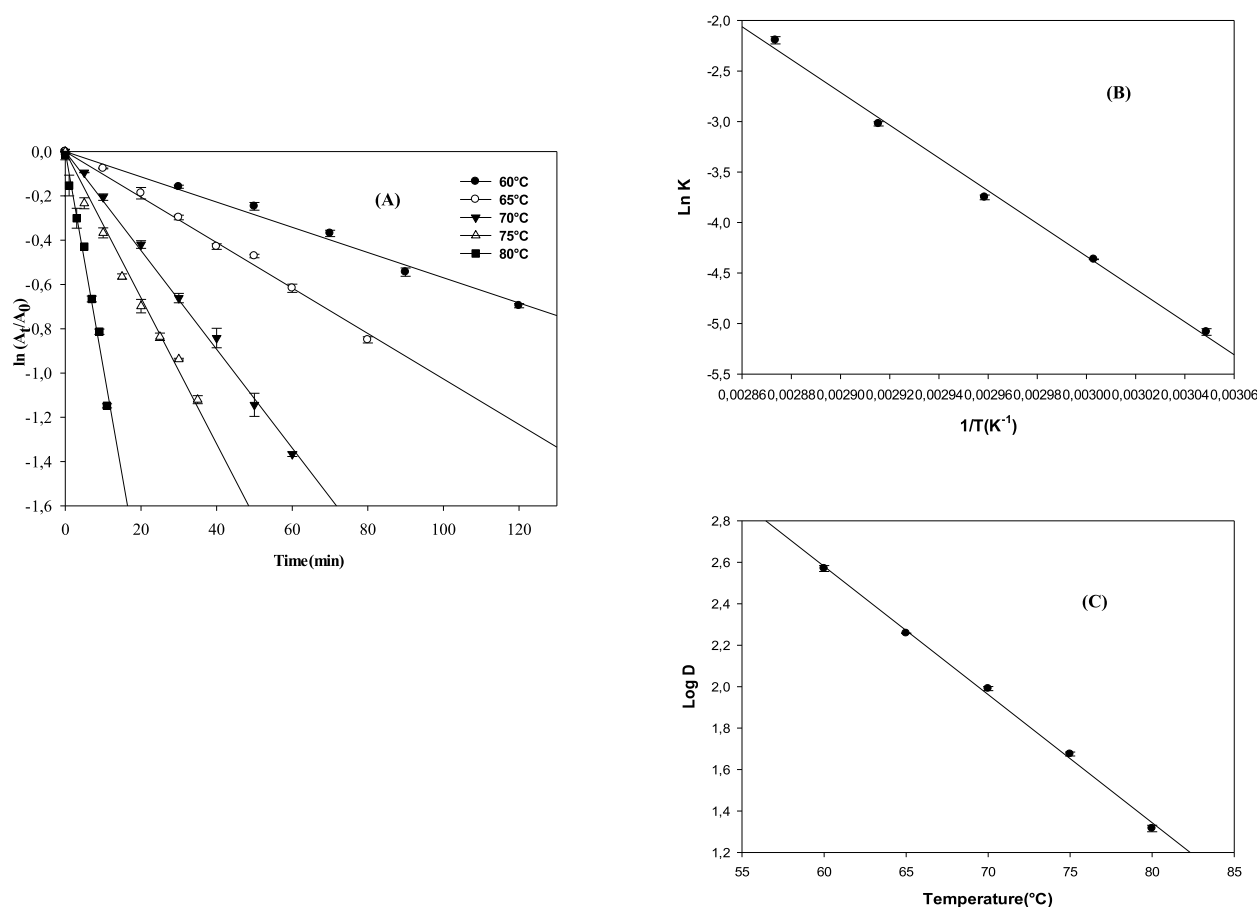
### 3.7. Heat inactivation and thermodynamic study

A first-order reaction was adopted as model to describe thermal inactivation process of purified Tadelate catechol oxidase (Fig. 5A). Such model was also reported for other PPOs [7,8,15,21]. The catechol was used as substrate during thermal inactivation study. The values of kinetics parameters of thermal inactivation are summarized in Table 6. We noticed an acceleration of thermal inactivation process with the increase of temperature. Such deduction was confirmed by the decrease of the both values of half-time ( $t_{1/2}$ ) necessary to reduce half of the enzymatic activity and decimal reduction time «D».

A high value of the activation energy ( $E_a$ ) with a low  $Z_t$  value is two parameters indicating a greater sensitivity of the enzymatic activity. The exploitation of the slopes of  $\ln k$  and  $\log D$  as a function of the temperature makes it possible to estimate their values, respectively (Fig. 5B & C). The values of  $Z_t$  for different PPOs are usually ranged between



**Fig. 4.** Effect of some inhibitors on thermal inactivation of purified Tadelate catechol oxidase. A) L-cysteine, B) Sodium azide, C) Ascorbic acid, D) Sodium metabisulfite. Catechol (80 mM in 50 mM acetate buffer, pH 5.5) was used as substrate. The effect of thermal inactivation is amplified according to the inhibitor used and its concentration. Each data point is the mean of three experiments. Vertical bars represent standard deviations.



**Fig. 5.** Thermal inactivation curves (A), Arrhenius plot (B) and decimal reduction times (C) of purified Tadelia catechol oxidase in the range of temperature 60–80 °C at atmospheric pressure. Catechol (80 mM in 50 mM acetate buffer, pH 5.5) was used as substrate. The activation energy for heat inactivation of PPO was estimated to be 135.01 kJ/mol. Vertical bars represent standard deviations.

(8–14 °C) [11,15,16,37–39]. Beside, an exceptional Zt value (104.2 °C) was reported for pineapple PPO [35].

The thermodynamic parameters [the enthalpy ( $\Delta H$ ), the entropy ( $\Delta S$ ) and the free energy ( $\Delta G$ )] were also calculated and the values thus obtained are grouped in Table 6. A positive values of  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta S$  indicates that this reaction is non-spontaneous, requires the contribution of an external thermal energy (endothermic) with gain in disorder and significant aggregation process [8,15,38,39].

Tadelia catechol oxidase undergoes a considerable change of conformation during the denaturation process. Similar remarks were made for the black truffle PPO [15], elephant foot yam PPO [32], pear, apple and strawberry PPO [37], bayberry juice PPO [38] and for Pineapple PPO [39].

**Table 6**

Thermal inactivation and thermodynamic parameters of purified Tadelia catechol oxidase. The rate of inactivation is proportional to the temperature increase. The enzyme seems to be thermostable. The value of sensitivity parameter “Zt” was estimated to be 16.17 °C inhibitors. The Data is presented as mean ( $\pm$ ) standard deviation.

Temperature (°C)	K (min <sup>-1</sup> )	D (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol K <sup>-1</sup> )
60	0.006 <sup>a</sup>	371.5	111.8	132.25	115.05	51.62
65	0.012	181	54.5	132.20	114.08	51.5
70	0.023	98	29.5	132.16	114.80	50.64
75	0.048	47.2	14.2	132.12	114.40	50.92
80	0.111	20.7	6.2	132.08	113.63	52.18
Z <sub>T</sub> (°C) =	E <sub>a</sub> (kJ/mol) =					
16.17	135.01					

Mean ( $\pm$ SD) for triplicate experiments.

#### 4. Conclusion

Catechol oxidase from Tadelia showed a single band on SDS-PAGE with a molecular weight of 90 kDa. Among the list of substrates used, a better affinity was observed for *o*-diphenolic substrates comparing to triphenolic ones. Enzyme showed its optimum activity on acidic range of pH (4–6) and ambient temperature (30–50 °C). No latent form was found when the SDS and other detergents were applied. The Cu<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> and Zn<sup>+2</sup> act as activators of enzyme activity while an inhibition was detected in presence of Ca<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> and Al<sup>+3</sup>.

A mixed type 1, competitive, noncompetitive and uncompetitive mechanisms were obtained using sodium metabisulfite, ascorbic acid, L-cysteine and sodium azide as inhibitors, respectively.

Based on thermal stability study, the enzyme became more sensitive when the inhibitors were used simultaneously with temperature increase. The values of E<sub>a</sub> and Z<sub>t</sub> estimated support our deduction of the enzyme thermostability. The effect of inhibitor and heat treatment could be combined to control enzymatic browning of date.

#### Acknowledgments

This work was funded by Algerian Ministry in the framework of PRFU with code number “D01N01UN030120180002”.

#### References

- [1] R.A. Al-Alawi, J.H. Al-Mashiqri, J.S.M. Al-Nadabi, B. Al-Shihi, Y. Baqi, Date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.): natural products and therapeutic options, *Front. Plant Sci.* 23 (2017) 845–857.

- [2] FAOSTAT, Agriculture holdings cultivated for the production of crops, Food and Agricultural Organization Corporate Statistical Database, FAO, Rome 2016, pp. 73–88.
- [3] N. Bouguedoura, M. Benaceur, S. Babahani, S.E. Benziouche, Date Palm Status and perspective in Algeria, Date Palm: Genetic Resources and Utilization 2015, pp. 125–168.
- [4] Z. Benmeddour, E. Mehinagic, D. Le Meurlay, H. Louaileche, Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars: a comparative study, J. Funct. Foods 5 (2013) 346–354.
- [5] V.L.V. Mesquita, C. Queiroz, Chapter: 10: enzymatic browning, Biochemistry of Foods, Third edition 2013, pp. 387–418.
- [6] S. Muñoz-Pina, J.V. Ros-Lis, Á. Argüelles, C. Coll, R. Martínez-Mañez, A. Andrés, Full inhibition of enzymatic browning in the presence of thiol-functionalised silica nanomaterial, Food Chem. 15 (2018) 199–205.
- [7] Z. Zhou, W. Liu, R. Stockmann, N.S. Terefe, Effect of citric acid and high pressure thermal processing on enzyme activity and related quality attributes of pear puree, Innovative Food Sci. Emerg. Technol. 45 (2018) 196–207.
- [8] S. Dhakal, V.M. Balasubramaniama, H. Ayvaza, L.E. Rodriguez-Saona, Kinetic modeling of ascorbic acid degradation of pineapple juice subjected to combined pressure-thermal treatment, J. Food Eng. 224 (2018) 62–70.
- [9] Y.K. Ikegami, Y. Suehiro, T. Katayama, K. Jindo, H. Itamura, T. Esumi, Recombinant expression, purification, and characterization of polyphenol oxidase 2 (VvPPO2) from “Shine Muscat” (*Vitis labruscana* Bailey × *Vitis vinifera* L.), Biosci. Biotechnol. Biochem. 81 (2018) 2330–2338.
- [10] M. Siddiq, K.D. Dolan, Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), Food Chem. 218 (2017) 216–220.
- [11] E.H. Alici, G. Arabaci, Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis* L.) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties, Int. Biol. Macromol. 93 (2016) 1051–1056.
- [12] V.B. Kumar Anil, T.C. Mohane Kishor, K. Murugan, Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra* L.), Food Chem. 110 (2008) 328–333.
- [13] D. Naci, M. Akpınar, A. Ali, Novel concentration method for concentrating solutions of protein extracts based on dialysis techniques, Anal. Biochem. 297 (2001) 192–194.
- [14] A. Atasver, H. Ozdemir, I. Gulcin, O. Irfan, I. Kufrevioglu, One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography, Food Chem. 136 (2013) 864–870.
- [15] H. Gouzi, C. Depagne, A. Benmansour, T. Coradin, First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis* Tul.) and its thermal behavior, Eur. Food Res. Technol. 237 (2013) 721–729.
- [16] Z. Gong, D. Li, C. Liu, A. Cheng, W. Wang, Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel, LWT Food Sci. Technol. 60 (2015) 1095–1099.
- [17] J. Carvalho, J.F.F. Orlanda, Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buri (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract, Food Chem. 233 (2017) 159–163.
- [18] B.B. Mishra, S. Gautam, A. Sharma, Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*), Food Chem. 134 (2012) 1855–1861.
- [19] S. Cheema, M. Sommerhalter, Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango, Food Chem. 171 (2015) 382–387.
- [20] D. Panadare, V.K. Rathod, Extraction and purification of polyphenol oxidase: a review, Biocatal. Agric. Biotechnol. 14 (2018) 431–437.
- [21] C. Weemaes, L. Ludikhuyze, I. Broeck, M. Hendrickx, Effect of pH on pressure and thermal inactivation of avocado polyphenol oxidase: a kinetic study, Food Chem. 64 (1999) 2785–2792.
- [22] K. Bravo, E. Osorio, Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit, Food Chem. 197 (2016) 185–190.
- [23] K.A. Batista, G.L.A. Batista, G.L. Alves, K.F. Fernandes, Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits, J. Mol. Catal. B Enzym. 102 (2014) 211–217.
- [24] A. Derardja, M. Pretzler, I. Kampatsikas, M. Barkat, A. Rompel, Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from apricot (*Prunus armeniaca* L.), J. Agric. Food Chem. 65 (2017) 8203–8212.
- [25] E. Ionita, L. Gurgu, I.N. Aprodu, N. Stanciu, I. Dalmaid, G. Bahrim, G. Rapeanu, Characterization, purification, and temperature/pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*), Process Biochem. 56 (2017) 177–185.
- [26] M. Sikora, M. Świeca, Effect of ascorbic acid postharvest treatment on enzymatic browning, phenolics and antioxidant capacity of stored mung bean sprouts, Food Chem. 239 (2018) 1160–1166.
- [27] B. Aydin, I. Gulcin, S.H. Alwaseel, Purification and characterization of polyphenol oxidase from Hemsin apple (*Malus communis* L.), Int. J. Food Prop. 18 (2015) 2735–2745.
- [28] H.J. Sun, J. Wang, X.M. Tao, J. Shi, M.Y. Huang, Z. Chen, Purification and characterization of polyphenol oxidase from rape flower, J. Agric. Food Chem. 60 (2012) 823–829.
- [29] O.G. Palma, M.A. Ortiz, A.L. Dorantes, J.G. Sampedro, H. Najera, Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*), Phytochemistry 72 (2011) 82–88.
- [30] M. Valko, H. Morris, M.T. Cronin, Metals, toxicity and oxidative stress, Curr. Med. Chem. 12 (2005) 1161–1208.
- [31] M. Goetgebeur, S. Kermasha, Inhibition of polyphenol oxidase by copper-metallothionein from *Aspergillus niger*, Phytochemistry 42 (1996) 935–940.
- [32] A. Singh, N. Wadhwa, Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*), J. Food Sci. Technol. 54 (2017) 2085–2093.
- [33] H.M. Ali, A.M. El-Gizawy, R.E.I. El-Bassiouny, M.A. Saleh, Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products, Food Sci. Technol. 52 (2015) 3651–3659.
- [34] R.G. Guven, K. Guven, F.M. Matpan Bekler, D. Acer, H. Alkan, M. Dogru, Purification and characterization of polyphenol oxidase from purslane, Food Sci. Technol. 37 (2017) 356–362.
- [35] I.N. Ashie, B.K. Simpson, J.P. Smith, Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36 (1996) 1–30.
- [36] I. Gülçin, O.I. Kufrevioglu, M. Oktay, Purification and characterization of polyphenol oxidase from nettle (*Urtica dioica* L.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 3 (2005) 297–302.
- [37] A. Sulaiman, M.J. Soo, M. Farid, F.V.M. Silva, Thermosonication for polyphenol oxidase inactivation in fruits: modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures, J. Food Eng. 165 (2015) 133–140.
- [38] X. Cao, C. Cai, Y. Wang, X. Zheng, The inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in bayberry juice during thermal and ultrasound treatments, Innovative Food Sci. Emerg. Technol. 45 (2018) 169–178.
- [39] B. Chutintrasri, A. Noomhorm, Thermal inactivation of polyphenol oxidase in pineapple puree, LWT Food Sci. Technol. 39 (2006) 492–495.

## Résumé

Ce travail rapporte une purification des PPO extraites de quatre variétés des dattes algériennes par une procédure de trois étapes impliquant une précipitation par le sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie échangeuse d'ions Q-Sepharose 6b et une chromatographie HPLC de gel filtration. Le taux de purification et le rendement ainsi estimés étaient de (7.92% et 14.7%), (82% et 23%) (79% et 20%), (80% et 16%), pour les PPOs de Deglet nour, Ghars, Tadelà et Tanttouchet, respectivement. En appliquant SDS-Page, les PPOs de Ghars, Tanttouchet et Tadelà ont révélé des poids moléculaires équivalents à 30,67 et 90 kDa respectivement, tandis que trois isoformes ont été observés pour la PPO de Deglet Nour (20,40 et 64 kDa). Les PPOs des dattes sont pourvus des deux activités o-diphénolase et triphénolase alors qu'aucune activité monophénolase n'a été détectée. L'activité optimale des PPOs des dattes a été enregistrée dans le domaine acide avec stabilité thermique entre 30-60°C et ceci en utilisant le catéchol, le pyrogallol et le 4-méthylcatéchol comme substrats. Une meilleure efficacité catalytique a été obtenue vis-à-vis de 4-méthylcatéchol pour le cas des PPOs de deglet Nour et Ghars par contre le catéchol présente plus d'affinité pour les PPOs de Tadelà et Tanttouchet. Aucun effet significatif n'a été observé en présence des détergents, et ions métallique ( $Na^+$  et  $K^+$ ) or les ions  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  et  $Zn^{+2}$  agissent entant qu'activateurs et les ions  $Ca^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  et  $Al^+$  entant qu'inhibiteurs. L'effet d'une liste d'inhibiteurs comprenant les sulfites, les fluorures, les acides organiques et les acides aminés sur les PPOs des dattes a été étudié en utilisant le catéchol et le pyrogallol comme substrats. Le métabisulfite de sodium, le fluorure de sodium, la L-cystéine ainsi que l'acide ascorbique ont présentés une inhibition efficace des brunissement enzymatique des dattes. Leur valeurs d' $IC_{50}$ ,  $K_i$  ainsi que leur mécanismes d'inhibition ont été rapportés. L'efficacité d'inhibition dépend de la source d'enzyme et le substrat utilisé. L'inactivation thermique des PPOs des dattes a été réalisé dans l'intervalle de température compris entre 60-80°C. La cinétique d'inactivation a été décrite par le modèle de premier ordre pour les PPOs de Ghars, Tadelà et Tanttouchet et par un modèle biphasique pour le cas de la PPO de Deglet Nour. Les paramètres cinétique ( $K$ ,  $D$ ,  $t_{1/2}$ , et  $Z_t$ ) et thermodynamiques ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  et  $\Delta S$ ) ont été aussi calculés. Les PPOs de Tanttouchet et Tadelà semblent être plus stables par rapport à celles de ghars et Deglet Nour. De même, l'activité triphénolase présente plus de sensibilité vis-à-vis de changement de température en la comparant avec celle de l'activité o-diphénolase.

**Motclés:** Phoenix dactylifera L., Deglet Nour, Ghars, Tadelà, Tanttouchet, polyphénoloxdase, purification, caractérisation, Inhibition, Inactivation thermique, Brunissement enzymatique

## Abstract

This work reports a purification of PPOs extracted from four Algerian date varieties by a three-step procedure involving ammonium sulphate precipitation followed by Q-Sepharose 6b ion exchange chromatography and HPLC gel filtration chromatography. The purification rate and yield thus estimated were (7.92% and 14.7%), (82% and 23%) (79% and 20%), (80% and 16%), for the PPOs of Deglet nour, Ghars, Tadelà and Tanttouchet, respectively. By using SDS-Page, the Ghars, Tanttouchet and Tadelà PPOs exhibited a molecular weights of 30.67 and 90 kDa, respectively, while three isoforms were observed for Deglet Nour's PPO (20,40 and 64 kDa). The dates PPOs showed both o-diphenolase and triphenolase activities while a lack of monophenolase activity was observed. The optimal activity of date PPOs was obtained in the acidic domain with thermal stability between 30-60 °C using catechol, pyrogallol and 4-methylcatechol as substrates. A better catalytic efficiency was estimated using 4-methylcatechol for the PPOs of deglet Nour and Ghars while for the PPOs of Tadelà and Tanttouchet have better affinity for catechol. No significant effect was found in the presence of detergents, and metal ions ( $Na^+$  and  $K^+$ ) Likewise,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  and  $Zn^{+2}$  act as activators and  $Ca^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  and  $Al^+$  as inhibitors. The effect of several inhibitors including sulfites, fluorides, organic acids and amino acids on date PPOs activity was investigated using catechol and pyrogallol as substrates. Sodium metabisulphites, sodium fluoride, L-cysteine and ascorbic acid were excellent PPO inhibitors. Their  $IC_{50}$ ,  $K_i$  values and inhibition mechanisms were also reported. The inhibition efficiency depends on the enzyme source and the substrate used. The thermal inactivation of PPOs dates was performed in the temperature range 60-80 °C. The kinetics of inactivation was described by first order model for the PPOs of Ghars, Tadelà and Tanttouchet and by a biphasic model for Deglet Nour PPO. The kinetic ( $K$ ,  $D$ ,  $t_{1/2}$ , and  $Z_t$ ) and thermodynamic parameters ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  and  $\Delta S$ ) were also calculated. The Tanttouchet and Tadelà PPOs seem to be more stable compared to those of Ghars and Deglet Nour. Similarly, the triphenolase activity shows more sensitivity towards temperature change compared with o-diphenolase activity.

**Keywords:** Phoenix dactylifera L., Deglet Nour, Ghars, Tadelà, Tanttouchet, Polyphenoloxidase, purification, characterization, Inhibition, Thermal inactivation, enzymatic browning

## ملخص

في هذا العمل تمت تنقية أنزيمات من عائلة مؤكسدات المركبات الفينولية بعد استخلاصها من أربعة أنواع من التمور الجزائرية وذلك من خلال ثلاث خطوات تشمل الترسيب باستعمال سولفات الأمونيوم الصلب ثم طريقة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني وكذا كروماتوغرافيا التغلغل (HPLC). كان معدل التنقية و كذا المرود كالآتي: (7.92% و 14.7%)، (82% و 23%) (79% و 20%)، (80% و 16%)، تم الحصول على الأوزان الجزئية الأتية: 30, 67, 90 kDa، على التوالي، في دقلة نور تقنية SDS-Page، تم التأكد من أكسدة ركائز ثنائية و ثلاثية الفينول في حين لا تملك أنزيمات التمر النشاط المؤكسد لأحادي الفينول. تم تسجيل النشاط الأعظمي لهاته الأنزيمات في المجال الحامضي مع استقرار حراري بين 30-60°C باستعمال الكاتيكول، البيروقالول و 4-مثيل كاتيكول كركائز. لم نلاحظ تأثير كبير عند إسمالنا للمنظفات وكذا أيونات المعادن ( $Na^+$ ,  $K^+$ ) في حين أننا وجدنا تنشيط في وجود ( $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ) و تثبيط مع ( $Ca^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Al^+$ ). أيضا تمت دراسة تأثير عدة مثبطات تشمل الكبريتيت والفوراييد، الأحماض العضوية والأحماض الأمينية على نشاط أنزيمات التمر باستخدام الكاتيكول والبيروقالول كركائز. أظهر كل منا ميثاسولفات الصوديوم، فلورييد الصوديوم، حمض السيسيتين وكذا حمض الأسكوربيك نسبة تثبيط كبيرة وقد تم حساب متغيراتها ( $IC_{50}$ ,  $K_i$ ) وكذا آلية تثبيطها في وجود الكاتيكول والبيروقالول كركائز أيضا لاحظنا أن فعالية التثبيط تتعلق بنوع التمر وكذا الركيزة المستعملة من جهة أخرى قمنا بدراسة آليات التعطيل الحراري على هاته الأنزيمات في نطاق درجو حرارة بين 60-80°C. تم استعمال نموذج من الدرجة الأولى بالنسبة للتعطيل الحراري لأنزيمات الغرس، تدلا و تننبوشت بينما تم استعمال النموذج ثنائي الطور لأنزيم دقلة نور قمنا أيضا بحساب التغيرات الحركية (وكذا الديناميكية الحرارية) ووجدنا أن أنزيمات تدلا و تننبوشت أكثر استقرارا حراريا من نظرائها دقلة نور و غرس. أخيرا، لاحظنا أن أكسدة الركائز ثلاثية الفينول أكثر تأثرا بتغيرة درجات الحرارة مقارنة بأكسدة اركائز ثنائية الفينول.

**الكلمات المفتاحية:** فينكس دكتيليفيرا، دقلة نور، غرس، تدلا، تننبوشت، مؤكسد الفينول، تنقية، خصائص، تثبيط، تعطيل حراري، الإسمار الإنزيمي.