

Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique  
Université de Ghardaïa  
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département de Biologie



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme

## MASTER

**Domaine** : Sciences de la nature et de la vie

**Filière** : Sciences Biologiques

**Spécialité** : Biochimie appliquée

Par : **Attia Habiba**

**Kheiter Fatiha**

Thème :

**Etude des propriétés de la Polyphénol Oxydase de dattes de *Phoenix dactylifera*L., variété Deglet Nour, de la région de Metlili- Ghardaïa**

**Soutenu publiquement le : 25/06/2018**

**Devant le jury :**

<b>M.MEHAMEDI A.E.</b>	Maître Assistant A	Université de Ghardaïa	<b>Président</b>
<b>M<sup>me</sup>. BENSANIA W.</b>	Maître Assistant A	Université de Ghardaïa	<b>Promotrice</b>
<b>M<sup>lle</sup>. TELLI. A</b>	Maître de Conférence B	Université de Ghardaïa	<b>Examinatrice</b>

**Année universitaire 2017/2018**



## *Dédicace*



# *Kheiter Fatiha* ☆☆☆☆☆

*Au nom d'Allah, le Tout miséricordieux, le Très Miséricordieux*

*Tout d'abord je tiens à remercier le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour arriver à ce stade afin de réaliser ce travail que je dédie :*

*A ma mère très chère, qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi*

*A mon très cher père pour ses encouragements*

*A ma chère grand-mère*

*A mes frères : le bonheur dans ma vie*

*A ma précieuse sœur wahiba*

*A toute ma grande famille : Kheiter*

*A Ma chère binôme Attia Habiba*

*A tous mes chères : Rawnak, Fozia, Imane, Hamida, Aicha, Timo, Fatom, Fella, Nadia, Hafssa, Hafida, Hanane, Wahiba, Noura, Farah....*

*Et enfin a tous mes connaissances*



# *AttiaHabiba* ☆☆☆☆☆

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je*

*dédie :*

*A Mes chers et respectueux parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*Ma chère binôme « Fatiha Kheiter » et à toute sa famille,*

*A toute ma famille, pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

*A toutes mes chères sœurs :*

*\* Amina \*\* Fouzia \* Fatima \*\*Iman \*\* Manal \*\*Nora\*\*Amel \*Linda\**

*À tous mes chers amis et mes collègues de l'Université de*

*Ghardaïa ; surtout \* Oussama Ladjal\**

*Et à tous ce qui ont enseigné moi au long de ma vie scolaire.*



# Remerciement



*En préambule à ce mémoire nous remercions ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant cette période d'étude.*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.*

*Nous tenons à remercier sincèrement Madame, (BENSANIA Wafa), qui, en tant que Promotrice de mémoire, s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*A monsieur (BEN HAMOUDA Hicham), pour avoir épaulé moralement tous les jours dans la construction de ce mémoire aussi ses conseils et la confiance qu'il nous accorde quotidiennement.*

*Nous voudrions aussi remercier tous les membres de jury avec nos profondes gratitude de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et d'avoir accepté de le juger.*

*A tous les esprits ouverts qui ont contribué, de loin ou de près, à la réalisation de ce*

*Modeste travail.*

*Un grand remerciement A tous les professeurs et les enseignants*

دراسة خصائص انزيم البوليفينول أوكسيديز ال مستخلص من تمر الفينيكس داتيليفيرا ، نوعية دقلة نور ، من منطقة متليلي- غرداية .

## ملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى استخلاص إنزيم البولي فينول أوكسيديز من ثمار نخيل التمر (*Phoenix dactylifera L.*)، صنف دقلة نور المتحصل عليها من منطقة متليلي، ودراسة بعض خصائصه البيوكيميائية. خصصت المرحلة الأولى في الدراسة لاستخلاص إنزيم البولي فينول أوكسيديز (EC: 1.14.18.1) وذلك باستعمال محلول الفوسفات الدارئ (0,1 مولاري، pH 6.7) و بإضافة PVP (0,5%). بعد ذلك تمت التنقية الجزئية لمستخلص الإنزيم الخام عن طريق الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة 80%. تقييم الفعالية الإنزيمية للبولي فينول أوكسيديز أظهرت أن كل من المستخلصين الخام و المنقى جزئيا يمتلكان نشاط إنزيمي إيجابي حيث بلغ 1.86 و 2.77 وحدة على التوالي، باستخدام البيروكاتيكول كركيزة. متابعة تأثير تركيز البيروكاتيكول على النشاط الأنزيمي أظهر اعتماد إنزيم البولي فينول أوكسيديز لنظرية ميشائيليس-منتن مع قيم  $V_{max}$  و  $K_m$  تساوي 0.005 (وحدة/دقيقة.مل) و 0.055 مولاري على التوالي. من خلال دراسة خصوصية الركيزة، تأثير درجة الحموضة و درجة الحرارة على الإنزيم، أثبتت النتائج قدرة البولي فينول أوكسيديز على أكسدة كل من أحادي، ثنائي و ثلاثي الفينول مع تفضيل متباين و كبير لكل من حمض الكافيين و الفينول. كما تم تسجيل فعالية قصوى لنشاط الإنزيم عند درجة حموضة تساوي 7.4 في درجة حرارة 25 درجة مئوية و بوجود البيروكاتيكول كركيزة. كما أثبتت دراسة الاستقرار الحراري للبولي فينول أوكسيديز أنه إنزيم غير مستقر حرارياً، حيث ينخفض نشاطه تدريجياً عند احتضانه لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة أعلى من 30 درجة مئوية. أيضا يمكن أن يفقد فعاليته الإنزيمية تماما عند درجة حرارة 80 درجة مئوية. في المرحلة الأخيرة، تمت دراسة تثبيط عمل إنزيم البولي فينول أوكسيديز باختبار بعض المركبات الكيميائية حيث أظهرت النتائج أن أغلب المركبات لها فعالية تثبيطية جد مهمة و هي ممثلة بالترتيب كمايلي: حمض الأسكوربيك و حامض الستريك و حمض الأكساليك و حمض الأسيتيك. كما تم الحصول على تثبيط من النوع المختلط بـحمض الأسكوربيك وهو مثبط أكثر فعالية ضد PPO.

**الكلمات المفتاحية:** تمر *Phoenix dactylifera L.* ، دقلة نور، البولي فينول أوكسيديز، المستخلص الخام، التثبيط، بيروكاتيكول،

# **Etude des propriétés de la Polyphénol Oxydase de dattes de Phoenix dactyliferaL., variété Deglet Nour, de la région de Metlili- Ghardaïa**

## **Résumé**

La présente étude est consacrée à pour but de l'extraire la polyphénol oxydase (PPO) à partir de dattes de *Phoenix dactylifera* L., variété Deglet Nour, récolté de la région de Metlili et de déterminer certaines quelques propriétés biochimique. La polyphénol oxydase (EC: 1.14.18.1) a été, tout d'abord, extraite utilisant de tampon phosphate (0.1M, pH 6.8) et le PVP (0.5%). L'extrait brut d'enzyme est ensuite partiellement purifié par précipitation en utilisant le sulfate d'ammonium à 80%. les différents extraits enzymatiques brut et partiellement purifié possèdent une activité positive vis-à-vis la PPO qui est de 1.86 et 2.77 UE respectivement, en utilisant le pyrocatechol comme substrat. L'influence de la concentration en pyrocatechol sur l'activité enzymatique fait apparaitre une réponse Michaelienne avec des valeurs Vmax et Km égales 0.005 (UE/min.ml) et 0.055M respectivement. L'étude de la spécificité du substrat, de l'effet du pH et de la température, ont été effectuée. La PPO peut catalyser les mono-, di et triphénols avec une préférence variable. Desquels, l'acide caféique et le phénol ont été oxydés activement par la PPO. Il est remarquable que l'activité enzymatique soit maximale au voisinage de la neutralité, dont le pH optimal a été trouvé de 7.4 à une température 25°C en présence de pyrocatechol. De même, l'étude de la stabilité thermique montre que la PPO est une enzyme qui n'est pas thermostable. Son activité diminue progressivement lorsqu'elle est incubée pendant 30 min aux températures supérieures à 30°C. Ainsi, la PPO est presque complètement inactivée à 80°C. L'inhibition de la PPO a été testée avec quelques composés chimiques. Dont une grande capacité inhibitrice a été montrée par ordre d'inhibition décroissante comme suit: l'acide ascorbique, l'acide citrique, l'acide oxalique et l'acide acétique. Une inhibition de type mixte a été obtenue avec l'acide ascorbique qui est un inhibiteur plus efficace contre la PPO.

**Mots clés:** dattes, *Phoenix dactylifera* L, Deglet Nour, Polyphénol oxydase, l'extrait brut, inhibition, pyrocatechol.

## **Study of the properties of Polyphenol Oxidase of Phoenix dates dactyliferaL., Variety Deglet Nour, from the region of Metlili- Ghardaia**

### **Abstract:**

The purpose is to extract polyphenol oxidase (PPO) from dates of *Phoenix dactylifera* L., variety of Deglet Nour, collected from Metlili region and to determine its biochemical characterizations. Polyphenol oxidase (EC: 1.14.18.1) was first extracted by phosphate buffer (0.1M, pH 6.8) and PVP (0.5%). The enzymatic raw extract was then partially purified by precipitation using ammonium sulphate 80%. We have observed that both crude and partially purified enzyme extracts have a positive activity towards PPO, which is 1.86 and 2.77 EU respectively, using pyrocatechol as substrate. The influence of the pyrocatechol concentration on the enzymatic activity shows a Michaelian response of  $V_{max}$  and  $K_m$  values equal to 0.005 (UE/min.ml) and 0.055M respectively. Substrate specificity, pH and temperature effects were then studied which PPO can catalyse mono-di and triphenols with a variable preference. Of witch caffeic acid and phenol have been actively oxidized by PPO. It is to be noticed that the enzymatic activity is maximum near neutrality, the optimal pH was found to be 7.4 at 25°C in the presence of pyrocatechol. Similarly, the study of thermal stability shows that PPO is not thermostable. Its activity decreases gradually when incubated for 30 min at temperatures above 30°C. Thus, the PPO is almost completely inactive at 80°C. PPO inhibition has been tested with some chemical compounds. A high inhibitory capacity has been shown in decreasing order of inhibition as follow: ascorbic acid, citric acid, oxalic acid and acetic acid. Mixed type inhibition has been achieved with ascorbic acid, which is the most effective inhibitor against PPO.

**Keywords:** *Phoenix dactylifera* L. dates, Deglet Nour, Polyphenoloxidase, crude extract, inhibition, pyrocatechol.

## *Liste des abréviations*

<b>PPO</b>	:	Polyphénol Oxydase
<b>TPS</b>	:	Tampon de phosphate de sodium
<b>PVP</b>	:	Polyvinylpyrrolidone
<b>Qx</b>	:	Quintaux
<b>T</b>	:	Température
<b>Ki</b>	:	Constante d'inhibition
<b>Km</b>	:	Constante Michaélienne
<b>Vmax</b>	:	Vitesse maximale

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 01 :</b> Production des principales variétés de dattes en Ghardaïa par la compagnie agricole (2015/2016). .....	8
<b>Tableau 02 :</b> Tableau récapitulatif de l'activité enzymatique de la PPO de dattes Deglet Nour, dans l'extrait brut et partiellement purifié par le sulfate d'ammonium. ....	19
<b>Tableau 03 :</b> Les paramètres cinétiques et l'efficacité catalytique de substrat vis-à-vis de l'activité enzymatique de la PPO de dattes Deglet Nour .....	23
<b>Tableau 04 :</b> Résultat de la spécificité de substrat de la PPO extraite de dattes de Deglet Nour .....	27
<b>Tableau 05 :</b> Type d'inhibition, $K_i$ , $K_m$ et $V_{max}$ de la PPO de dattes Deglet Nour avec l'acide ascorbique comme inhibiteur. ....	36

## *Liste des figures*

<b>Figure 01 :</b> Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et <i>al.</i> , (1951). .....	133
<b>Figure 02:</b> Représentation graphique de Lineweaver-Burk de la cinétique enzymatique de la PPO de dattes Deglet Nour. ....	21
<b>Figure 03 :</b> La variation de l'activité enzymatique de la PPO en fonction du pH. ....	24
<b>Figure 04 :</b> Effet de la température sur la stabilité de la PPO de datte Deglet Nour.....	29
<b>Figure 05 :</b> Le pourcentage d'inhibition de quelques composés chimiques vis-à-vis l'activité de la PPO de datte Deglet Nour. ....	323
<b>Figure 06 :</b> Le graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de dattes Deglet Nour par l'acide ascorbique.....	36

## *Table des matières*

ملخص.....	I
Résume.....	II
Abstract.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures.....	VI
Table des matières.....	VIII
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 01. Les palmiers dattiers</b>	
1.  Palmier dattier.....	6
2.  Principales caractéristiques des dattes.....	6
3.  Production des dattes.....	8
<b>Chapitre 02. Matériel et Méthodes</b>	
I. Matériel végétal.....	9
I. 1.  Choix de la variété.....	9
I. 2.  Prélèvement des échantillons.....	9
II.Méthodologie :.....	10
II.1.  Préparation des échantillons.....	10

II.2. Procédés d'extraction de la PPO .....	10
II.3. Mesure l'activité de PPO .....	11
II.4. Dosage des protéines par la méthode de Lowry .....	12
II.5. Détermination des paramètres cinétiques de la PPO .....	13
II.6. Influence du pH du milieu réactionnel sur l'activité de la PPO .....	13
II.7. Etude de la spécificité de substrat .....	144
II.8. Etude de la stabilité thermique de la PPO .....	14
II.9. Effet des inhibiteurs sur l'activité de la PPO .....	15
 <b>Chapitre 03. Résultats et Discussion</b>	
I. Rendement d'extraction et l'activité de PPO .....	18
II. Propriétés biochimique de la PPO.....	21
II.1. Paramètres cinétiques .....	21
II.2. Effet de pH .....	23
II.3. Spécificité de substrat .....	26
II.4. Stabilité thermique .....	29
III. Inhibition de l'activité de la PPO.....	32
III.1. Cinétique de l'inhibition de la PPO de dattes Deglet Nour par l'acide ascorbique .....	36
<b>Conclusion</b> .....	39
Référence bibliographie .....	42
 Annexes	

# Introduction Générale

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) était primitivement cultivé dans les zones arides et semi arides chaudes de l'Ancien monde (Munier, 1973). La culture du palmier dattier constitue jusqu'à aujourd'hui une source de vie principale pour les populations des régions sahariennes. Il représente à la fois, la base de l'activité agricole et une source d'alimentation (Sawaya et *al.*, 1983 ; Biglari et *al.*, 2008 ; Elleuche et *al.*, 2008). En plus de leur utilisation dans l'alimentation, les dattes sont utilisées traditionnellement dans le domaine médical (Benchelah et Maka, 2008).

Les palmeraies étaient constituées de plusieurs dizaines de cultivars différents, offrant une diversité extraordinaire dans la forme, la couleur, la précocité et le goût de la datte, ainsi que l'aptitude de l'arbre à résister la salinité et aux maladies aussi dangereuses que le Bayoud (Munier, 1973).

En Algérie, le palmier dattier occupe une superficie évaluée à 167.000 hectares, localisées au Nord-est du Sahara au niveau des oasis où les conditions hydriques et thermiques sont favorables (Ghazi et Sahraoui, 2005). La diversité génétique du phœnicicole algérien permet d'enregistrer plus de 800 variétés, qui sont distribués en plus de 18 millions d'unités (Lounes et Boualem, 2015).

Selon la FAO en 2017, l'Algérie est classée au quatrième rang mondial en termes de production de dattes. Elle produit environ 14% de l'ensemble de la production mondiale de dattes qui atteint presque 1 100 000 tonnes. Cependant, les exportations de dattes sont relativement petites une fois comparées à la production totale : l'Algérie exporte moins de 3% de sa production totale. Indépendamment des problèmes de vente, le niveau bas des exportations est également dû à un manque de structures industrielles, en particulier pour le traitement et conditionnement des dattes (Boubekri, 2010).

Les importateurs (européens) de dattes repartissent celles-ci en deux catégories selon des critères très arbitraires (Dowson et Aten, 1963 ; Toutain, 1972) : les dattes fines ou exportables dont le type Deglet Nour et les dattes communes (Ghars, Degla-beida, Mech-degla, Tazerait, Tantboucht,...), qui sont en général de faible valeur marchande et très difficiles à conserver (Barreveld, 1993).

Les statistiques actuelles prouvent que l'Algérie est le principal producteur et exportateur de la datte Deglet-Nour. Ce cultivar est caractérisé par sa consistance demi molle, sa couleur claire et son aspect transparente, ce qui lui offre une valeur marchande élevée (Barreveld, 1993).

Du point de vue biochimique, les dattes sont une source alimentaire très appréciée pour leur propriétés médicinales et leur richesse en sucres, protéines, fibres, lipides, vitamines, sels minéraux et en composés phénoliques (Packer, 2001 ; Hurst, 2008).

La présence des composés phénoliques dans les dattes augmente leur propriétés médicinales, particulièrement la protection contre les maladies cardiovasculaires (Mansouri et *al.*, 2005 ; Biglari et *al.*, 2008). La concentration de ces composés est très variable d'une variété à autre et diminue régulièrement durant la maturation ainsi que la période de récolte et le stockage par différentes voies du brunissement (Macheix et *al.*, 1990). A priori, ceci est lié à des variations quantitatives mais aussi qualitatives des teneurs en composés phénoliques (Amiot *etal.*, 1992; Aubert et *al.*, 1992; Nicolas et *al.*, 1994).

La pratique de conservation et stockage de ce fruit était déjà présente, sous diverses formes, dans les traditions étant donné que la récolte assurée une fois par an. Cependant, la détérioration des dattes au cours de stockage est un problème majeur et entraîne des modifications indésirables de l'apparence, du goût et de la valeur nutritive du fruit (Khali et Selselet-Attou, 2007).

Les réactions de brunissement sont largement rencontrées dans les produits alimentaires et constituées avec d'autres propriétés organoleptiques, la base de l'acceptabilité de l'aliment. Ces réactions sont l'une des altérations les plus soulignées au cours le stockage des dattes et jouent un rôle majeur dans la commercialisation des dattes au niveau local et international (Macheix *et al.*, 1990).

Les phénomènes de brunissement dans les produits alimentaires à base de fruits et légumes sont fréquemment observés, notamment lors des traitements mécaniques (pelage, broyage) ou thermiques (chauffage, congélation-décongélation). L'apparition de pigments bruns, entraîne des modifications importantes des produits transformés, diminue fortement leurs attractivités organoleptiques et leurs richesses en composés d'intérêts nutritionnels (composés phénoliques) (Arsian et Dogan, 2005; Kolcuoglu *et al.*, 2006). Ce phénomène pourrait être attribué à des réactions enzymatiques ou non enzymatiques (Khali et Selselet-Attou, 2007).

Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte la couleur des aliments et touche plus les tissus qui sont endommagés par la coupe, le tranchage ou le broyage. Il résulte principalement de l'activité enzymatique des polyphénols oxydases (PPO) (EC 1.14.18.1). Ce sont des métallo-enzymes à cuivre largement réponde dans le monde végétal (pomme, poire, avocat, banane, pomme de terre, champignon, artichaut, laitue, papaye, pêche, datte,...) (Martinez et Whitaker, 1995).

La PPO catalyse deux réactions bien distinctes : l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols appelée activité crésolase et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones désignée sous le nom d'activité catécholase, avec consommation de l'oxygène moléculaire (Al-Jassabiet *al.*, 2013; Espin *et al.*, 1998). Par la suite, ces quinones se polymérisent et donnent des composés bruns. Chez les végétaux supérieurs, ces enzymes catalysent principalement des réactions de type catécholoxydase (Rodriguez-Lopez *et al.*, 1992).

La PPO est présente la même structure et des caractéristiques fonctionnelles semblable pour les différentes sources biologiques de cette enzyme. Elle est majoritairement présentes dans les plastides des plantes, mais il y en a également abondamment dans le cytoplasme des fruits murs (Vaughn et Duke, 1984). Ainsi, elle présente dans les différents organes des végétaux supérieurs (racine, graine, feuille, peau et cortex du fruit) (Macheixet *al.*, 1990).

En raison de sa participation majeure aux effets indésirables du brunissement enzymatique, la PPO est devenue l'objet de toutes les attentions des chercheurs traitant de de la conservation des produits alimentaires. Par des procédés de traitements thermiques tels que la pasteurisation ou la stérilisation, il est possible d'obtenir une dénaturation très rapide de la PPO (donc réduisent voire évitent l'oxydation enzymatique); mais ne répondent pas à la demande actuelle des consommateurs qui ont des tendances croissantes dans la sélection des aliments considérés non seulement de valeur nutritive élevée, mais aussi de haute qualité (Vámos-Vigyázó, 1981).

Notre étude sera consacrée par conséquent à la recherche d'une meilleure compréhension de cette enzyme extraite à partir de dattes de *Phoenix dactylifera* L., variété de Deglet Nour, récolté de la région de Metlili - Ghardaïa. Dans ce cadre, l'objectif principale de notre travaille c'est souligner l'importance de l'activité enzymatique du polyphénoloxydase et son implication directe dans le brunissement par l'analyse de quelques paramètres influençant leur PPO. Afin de souligner l'importance de cette enzyme, nous atteindrons les objectifs suivants :

- La détermination de l'activité enzymatique d'extrait brut et les paramètres cinétiques de l'enzyme ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ).
- Etude de l'effet du pH sur l'activité enzymatique de PPO.
- Etude de l'effet de la température sur l'activité enzymatique de PPO.
- Etude de la spécificité du substrat.

- Etude de l'effet inhibiteur de différentes substances sur l'activité enzymatique de PPO.

Dans ce manuscrit nous avons choisi de structurer le développement de notre étude selon un enchaînement constitué : d'une introduction générale présente brièvement la production de dattes en Algérie et le problème de brunissement enzymatique, particulièrement par l'enzyme PPO ; de deux chapitres et d'une conclusion.

Dans le premier chapitre nous avons exposé les procédures expérimentales. Le deuxième chapitre représente une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce travail.

En fin dans une conclusion générale nous avons souligné les résultats issus des différentes études menées au cours de ce mémoire et les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO.

# Chapitre 01.

## Les palmiers dattier

## **Chapitre 01. Les palmiers dattiers**

### **1. Palmier dattier :**

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1753. *Phoenix* dérivé de *Phoinix*, nom du dattier chez les grecs de l'antiquité qui le considéraient comme arbre des phéniciens ; *dactylifera* vient du latin *dactylus*, dérivant du grec *dactylos*, signifiant doigt (en raison de la forme du fruit), associé au mot latin *fero*, porté en référence aux fruits (Ben Abbes., 2011).

Au niveau de la taxonomie, le palmier dattier est une plante de grande taille, monocotylédone, spadiceflore appartenant à la famille de Palmaceae, Sous famille de Coryphoideae, le genre *Phoenix* et l'espèce *dactylifera* (Lasram et al., 2002 ; Riedacker et al., 1990). Le genre *Phoenix* comporte au moins douze espèces, dont la plus connue est *dactylifera* et dont les fruits " dattes " font l'objet d'un commerce international important (Espiard., 2002).

Le palmier dattier revêt une importance capitale dans la stabilité socio-économique du Sahara algérien qui représente les (4/5) du territoire national (Dubost, 1991). Plusieurs bassins phoenicicoles y sont nés : Aurès, Ziban, Souf, Oued Righ, Pays du Ouargla, M'zab, Touat/Gourara, Tidikelt/Tassili, la vallée de la Saoura. Le Bas Sahara constitue l'aire privilégiée et représentative de la palmeraie algérienne pour la culture de la variété Deglet-Nour, hautement prisée tant sur le marché national qu'international (Dakhia., et al., 2013).

### **2. Principales caractéristiques des dattes :**

Les dattes, fruits du palmier dattier (*Phoenix Dactylifera* L.) ont été historiquement et sont encore considérées parmi les meilleurs aliments énergétiques de l'être humain. La composition à prédominance de sucres, riche en minéraux avec présence de quelques protéines et vitamines

offrent à la datte une assimilabilité facile par le corps humain et la qualifient pour un aliment énergétique appréciable.

Les dattes sont composées d'un mésocarpe charnu protégé par un fin péricarpe. L'endocarpe se présente sous la forme d'une membrane très fine entourant la graine, appelée communément noyau. La couleur de la datte est variable selon les espèces : jaune plus ou moins clair, jaune ambré- brun plus ou moins prononcé, rouge ou noir. Sa consistance est également variable, elle peut être molle, demi molle, ou sèche (Munier, 1973).

Les différentes classes de dattes qui existent, reposent sur leur qualité commerciale et leur consistance (Djerbi, 1994). Celle-ci dépend du stade de maturation du fruit (Annexe 1) et de la teneur en eau de la pulpe (Munier, 1963). La stabilité de la datte dépend de la proportion de sucres par rapport à la teneur en eau, qui permet ainsi d'apprécier l'aptitude à la conservation des dattes (Bouabidi, 1996). On peut ainsi, distinguer trois catégories de dattes :

- Les dattes molles : sont des fruits pâteux et visqueux dont la chaire manque de consistance (Toutain, 1972). Ces dattes passent par le stade Routab et demeurent molles au stade tamar. Il s'agit de la plus part des dattes à sucres réducteurs (Dowson et Aten, 1963).
- Les dattes demi molles : ces dattes passent par le stade Routab, mais sont un peu sèches au stade tamar et à de texture élastique et visqueuse. Elles contiennent une proportion presque égale en sucres réducteurs et en saccharose (Toutain, 1972). Les sucres sont le plus souvent réducteurs. (Dowson et Aten, 1963). Exemple : Deglet Nour, Kenta, Tazerzeit.
- Les dattes sèches : elles ne passent pas par le stade Routab et à une consistance solide et dure. Elles sont pour la plus part à saccharose (Munier, 1963).

### 3. Production des dattes :

La datte est l'un des fruits les plus importants dans le monde et spécialement dans les pays islamiques qui consomment beaucoup de dattes surtout au mois de Ramadan. 70 % de la production des dattes dans le monde est produit par l'Egypte, l'Iraq, l'Arabie Saoudite, Iran, Pakistan et l'Algérie (Nezam EL Din, 2000).

L'Algérie ont un prix à l'exportation le plus cher, car ils exportent les variétés de bonne qualité : Deglet Nour (Botes et Zaid, 1999).

En Ghardaïa, le secteur dattier occupe une place importante dans l'économie de la wilaya. Selon les statistiques, la production de dattes en 2016 est estimée à 54712,00 quintaux. Le tableau (01) indique la production de dattes dans la wilaya de Ghardaïa pour quelques variétés très commerciales telles que Deglet –Nour, Ghars, DeglaBeida.

**Tableau 01 :** Production des principales variétés de dattes en Ghardaïa par la compagne agricole (2015/2016).

	<b>DegletNour (Dattes fines)</b>	<b>Ghars et Analogues (Dattes molles)</b>	<b>Deglet Beida et Analogues (Dattes sèches)</b>	<b>TOTAL (qx)</b>
<b>TOTAL des Exploitations</b>	21015,00	4 987,00	28 710,00	54 712,00

# Chapitre 02.

## Matériel et Méthodes

## Chapitre 2. Matériel et Méthodes

### I. Matériel végétal :

#### I. 1. Choix de la variété :

Dans la présente étude, la variété de dattes choisie est Deglet Nour de consistance demi-molle. C'est une variété commerciale par excellence et particulièrement appréciée sur les marchés locaux et Européens. Elle constitue 53,9% de la production nationale (Ben Abbes, 2011).

La variété Deglet Nour s'agirait d'une datte demi-sèche, non sirupeuse, non collante au toucher. Les travaux publiés à ce sujet s'entendent sur un abaissement significatif de la teneur en eau, une augmentation du taux de sucres totaux avec diminution de teneur en saccharose. A maturité, la datte est d'une couleur brune ambrée avec un épicarpe lisse légèrement plissé et brillant, le mésocarpe présente une texture fine légèrement fibreuse (Bouddar, et *al.*, 1997 ; Kendri, 1999).

Cette variété est très répandue dans les palmeraies de régions, d'Ouargla, de Biskra et de Touggourt.

#### I. 2. Prélèvement des échantillons :

Les dattes sont prélevées au stade de maturation complète (stade tamar). Trois palmiers de la variété Deglet Nour sont utilisés pour cette opération. Ils appartiennent à une palmeraie de la région de Metlili - Ghardaïa. 200 g de dattes est prélevé par palmier à partir de différents régimes et acheminées au laboratoire et placées à - 20°C. Les principales caractéristiques morphologiques des échantillons de dattes sont :

- poids moyen de 12 g environ ; diamètre moyen de 1,8 cm ;
- Son graine est lisse, de petite taille 0,8-3cm, pointu aux deux extrémités ;

- Utilisation de la datte : fraîche et conservée ;
- Appréciation : datte excellente à bonne.

## **II. Méthodologie :**

### **II.1. Préparation des échantillons :**

Avant de procéder à l'extraction, nous avons effectué un tri et un lavage des dattes :

- un tri : Le but de cette opération est d'éliminer toutes les dates qui sont immatures, les dattes écrasées, les dattes attaquées par les oiseaux et les insectes.
- un lavage : permet d'éliminer les particules de terre, des grains de sable, des poussières, des débris végétaux. Il se fait à l'eau de robinet.

### **II.2. Procédés d'extraction de la PPO :**

#### **A/ Préparation de l'extrait brut :**

Les conditions d'extraction de la PPO ont été établies afin d'obtenir un extrait enzymatique stable sous forme congelée à - 20°C pendant plusieurs semaines. La méthode d'extraction est décrite par Al-Jassabi et *al.* (2010) avec quelque modification.

Pour cela 30 g de dattes de Deglet Nour, dénoyautées et découpées en fragments, sont broyées dans 100ml d'une solution de tampon phosphate de sodium (0,1M, pH 6,8) contenant du polyvinylpyrrolidone PVP (0,5 % P/V). Le broyage fait manuellement à l'aide d'un mortier-pilon jusqu'à l'obtention d'un broyat bien homogénéisé. Le broyat subit ensuite une agitation pendant une heure puis filtré par l'appareil de filtration.

Après, la solution est centrifugée pendant une heure à 4000 g et à 4°C, à l'aide d'une centrifugeuse Beckman (modèle J2-21). Le surnageant obtenu constitue l'extrait enzymatique brut.

### **B/ Précipitation par le sulfate d'ammonium à 80% de saturation :**

En deuxième étape l'extrait brut de PPO est partiellement purifié par le sulfate d'ammonium. La méthode de précipitation est décrite par Ghouzi (2011) avec quelque modification.

Une quantité de sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est ajoutée au surnageant à fin d'obtenir une saturation de 80%. Après deux heures d'agitation, le mélange est centrifugé pendant 80 min à 4000 g et à 4°C. Les protéines précipitées sont ensuite dissoutes par agitation dans 5ml de tampon phosphate (0,1M, pH 6.8). La solution constitue l'extrait enzymatique partiellement purifiée par le sulfate d'ammonium.

Les extraits enzymatiques ainsi obtenus sont divisés en petites parties dans des tubes Eppendorf et conservés à -20° C

### **II.3. Mesure l'activité de PPO :**

Plusieurs méthodes aient été inventées pour déterminer l'activité de polyphénol oxydase, il est avantageux de mesurer directement, par spectrophotométrie, la formation des o-quinones (Waite, 1976). Dans cette étude, le dosage de l'activité enzymatique s'effectue à 20°C, par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 405 nm pour le pyrocatechol comme substrat (Fan et Flurkey, 2004). La solution mère de pyrocatechol à 0.1M, est préparée dans un tampon phosphate (0,1M, pH 6,8). Alors, l'activité enzymatique de la PPO a été suivi pour un milieu réactionnel contient 2 ml de pyrocatechol et 0,1 ml de tampon phosphate. L'oxydation est suivie après l'addition de 0,1 ml d'extrait enzymatique. (Ghouzi, 2011)

La vitesse initiale (V<sub>0</sub>) est calculée à partir de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps (Annexe 2. C).

La cuve de référence pour la mesure UV-visible contient tous les constituants sauf le substrat. Comme indiqué précédemment, l'extrait enzymatique est le constituant à ajouter le dernier dans le milieu réactionnel.

Dans notre étude, une unité d'activité enzymatique est définie par le changement d'une unité d'absorbance par minute (UE) et par millilitre d'enzyme (UE/ ml) (Fan et Flurkey, 2004).

#### **II.4. Dosage des protéines par la méthode de Lowry :**

##### **a) Principe de la méthode :**

Afin de pouvoir établir le taux et le rendement de purification au cours des étapes d'extraction et de purification partielle des activités enzymatiques, la quantité des protéines contenue dans chaque extrait enzymatique est estimée par la méthode de Lowry et *al.*, (1951). Cette méthode est basée sur le fait que le réactif de Folin Ciocalteu (acide phospho molybdique et phospho tungstique) mis en présence d'une protéine est réduit en un complexe bleu (de molybdène).

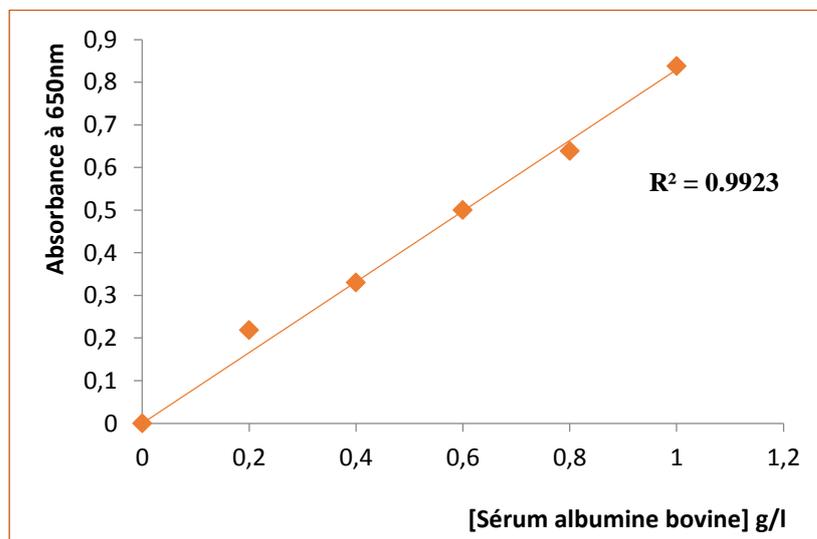
Cette réaction est due aux groupements oxydés des acides aminés constitutifs, principalement des groupements phénoliques du tryptophane et de la tyrosine. Le principe de cette méthode, est la production d'ions cuivreux qui réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu. La réaction dépend aussi du pH et il est essentiel de travailler dans une gamme de pH compris entre 10.0 à 10.5 (Wilson et Walker, 1996). Les concentrations protéiques ont été calculées par interpolation linéaire, à partir d'une gamme étalon contenant de l'albumine sérique bovine.

##### **b) Mode opératoire**

Dans des tubes à essais, on ajoute 100 µl d'échantillon à 0.5 ml de réactif (A) (0.05 % sulfate de cuivre anhydre, 0.1 % Tartrate de potassium, 10% Carbonate de sodium, 2% Soude caustique).

On mélange les tubes et on laisse incuber 10 minutes à température ambiante. Après, on ajoute 2ml de réactif B (5.55% de réactif de Folin) dans chaque tube. Les tubes sont placés au bain-marie réglé à 50°C pendant 5 minutes puis refroidis rapidement sous l'eau froide.

La lecture de la densité optique est effectuée à 650 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage établie à partir de diverses dilutions d'une solution mère d'albumine sérique bovine à 1 g/l, permet de déterminer la concentration en protéines (Figure 01).



**Figure 01** : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et al., (1951).

## II.5. Détermination des paramètres cinétiques de la PPO :

La détermination de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) et la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) de l'enzyme et l'efficacité catalytique (le rapport  $V_{max}/K_m$ ) ont été déterminés avec le pyrocatechol (20-100 mM) comme substrat à pH 6.8 (tampon phosphate de sodium à 0.1M) et à 25°C. (Ghouzi, 2011)

Les paramètres cinétiques ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk (1934).

## II.6. Influence du pH du milieu réactionnel sur l'activité de la PPO :

Des études d'effet du pH ont été effectuées dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M, dans une gamme de pH comprise entre 5.8 et 7.8 en présence du pyrocatechol à 0.1M comme substrat. (Ghouzi, 2011)

L'enzyme, a été ajoutée directement dans la cuve, contenant la solution tampon et le substrat pour chaque valeur spécifique de pH avant la mesure de l'absorbance en fonction du temps.

### **II.7. Etude de la spécificité de substrat :**

La spécificité de substrat a été déterminée par l'étude des activités mono, di et triphénolase de l'extrait brut. Pour cette raison, quatre différents substrats mono-, di-, et triphénols de la PPO d'un grade commercial ont été testés qui sont : le phénol, le pyrocatechol, l'acide caféique et l'acide gallique. Les activités enzymatiques ont été mesurées pour une même concentration des différents substrats testés (0.1M), à pH 6.8(tampon phosphate de sodium 0.1M) et à 25°C. (Ghouzi, 2011) La vitesse initiale de la réaction a été mesurée à partir de la partie droite de la courbe de l'augmentation de l'absorbance en fonction du temps due à la formation des o-quinones à partir de chaque substrat. (Ghouzi, 2011)

Toutes les mesures d'activité enzymatique ont été répétées trois fois et les valeurs moyennes ont été présentées.

### **II.8. Etude de la stabilité thermique de la PPO :**

La cinétique d'inactivation thermique de la PPO a été étudiée par incubation d'extrait enzymatique brut pendant 30 minutes dans un bain marie réglé à différentes températures : 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C et 80°C. Après chauffage, les échantillons sont refroidis rapidement dans l'eau glacée et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à pH 6.8 (tampon phosphate de sodium 0.1 M) et à 25°C, en présence de 0.1M de pyrocatechol comme substrat. (Ghouzi, 2011)

Le pourcentage de l'activité résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'enzyme non traité thermiquement ( $A_0$ ) (Dogan et *al.*,2005) selon l'équation suivante:

$$\text{Activité enzymatique relative : (\%)} = (A_0 / A_T) \times 100$$

Où

$A_0$ : est l'activité enzymatique initiale.

$A_T$ : est l'activité enzymatique à température T.

### **II.9. Effet des inhibiteurs sur l'activité de la PPO :**

**Dans cette étude, nous avons essayé de tester l'effet inhibiteur de quatre composés**

**disponibles tel que : l'acide oxalique, l'acide ascorbique, l'acide citrique et l'acide acétique**

**sur l'activité de la PPO de notre extrait brut.**

Avant de provenir à l'étude de la cinétique de réaction enzymatique catalysée par la PPO en présence des inhibiteurs ; nous avons fait subir ces derniers à un test d'inhibition question de juger leur potentiel inhibiteur vis-à-vis de la PPO, c'est-à-dire l'étude de quel pourcentage d'inhibition ils pouvaient atteindre.

L'activité de la PPO a été mesurée dans le milieu réactionnel standard contient le substrat (pyrocatechol) dans un tampon phosphate (0,1M, pH 6,8), de la solution d'enzyme et 100 $\mu$ l d'inhibiteur avec une concentration fixe et constante pour les quatre composés testés. En plus, un témoin a été préparé de la même façon sans inhibiteur. Les mesures de l'absorbance des différentes solutions ont été enregistrées à 405 nm contre un blanc (Ghouzi, 2011). L'activité inhibitrice de chaque composé est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité inhibitrice (\%)} = ((A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Inhibiteur}}) / A_{\text{contrôle}}) \times 100$$

$A_{\text{Contrôle}}$  : Densité optique du contrôle ou témoin ;

$A_{\text{Inhibiteur}}$  : Densité optique en présence de l'inhibiteur. (Ghouzi, 2011)

Alors, pour une concentration d'acide ascorbique déterminée, nous avons étudié la cinétique enzymatique en fonction cinq concentrations du substrat (pyrocatechol). La procédure expérimentale est la même décrite précédemment pour la cinétique enzymatique avec l'introduction de 100  $\mu\text{l}$  des concentrations variables d'acide ascorbique.

La représentation graphique :  $1/V = f(1/[S])$ , nous informe sur le type d'inhibition et permet de déterminer les paramètres cinétiques en présence et en absence d'inhibiteur.

La constante d'inhibition ( $K_i$ ) a été calculée à partir des graphes secondaires des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur.  $K_i$  représente la constantes de dissociation du complexe Enzyme-Inhibiteur (EI) (Chen et *al.*, 1998).

# Chapitre 03.

Résultats et

## **Chapitre 3. Résultats et discussion**

### **I. Rendement d'extraction et l'activité de PPO :**

La PPO représente moins de 1% des protéines totales dans les fruits et les végétaux. Cette caractéristique devrait être prise en considération avant d'essayer d'extraire de cette enzyme. La recherche vers l'extraction d'une grande quantité de l'enzyme et par un procédé commode est le but de plusieurs travaux (Ghouzi, 2011).

Les plus grandes difficultés à dominer lors de l'extraction de PPO, pour l'obtention d'une préparation soluble, sont la prévention de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques endogènes et la formation des pigments pendant le broyage de la matière végétale. En effet, les pigments peuvent s'associer avec la protéine enzymatique et la rendre insoluble et inactive (Vámos-Vigyázó, 1981).

L'élimination des composés phénoliques endogènes des extraits de plantes peut réduire la formation des quinones, des pigments et des mélanines indésirables dans l'extrait de PPO. Un moyen très efficace de prévention contre l'oxydation et la polymérisation des phénols pendant l'extraction de l'enzyme est leur élimination par fixation à un polymère insoluble. Les pièges à phénol le plus souvent utilisés pendant l'extraction sont la polyvinylpyrrolidone (PVP), les résines échangeuses d'ions ; en raison de leurs capacités fixatrices des composés phénoliques (Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski *et al.*, 1991; Ziyani et Pekyardimci, 2004).

Plusieurs méthodes d'extraction du polyphénol oxydase ont été développées, parmi ces méthodes rencontrées dans la littérature, la plus largement utilisée et qui nécessite des moyens moins coûteux est celle de Al-Jassabi *et al.*, (2013) avec quelques modifications ont été introduites dans la procédure d'extraction.

L'extrait brut obtenu est partiellement purifié par le sulfate d'ammonium (80%). La précipitation par le sulfate d'ammonium est employée pour éliminer les protéines inactives et les sucres de poids moléculaire élevé. De même elle permet de concentrer l'enzyme (Mayer et Harel, 1979 ;Loncle, 1992 ; Xu et *al.*,2004).

Ainsi, les extraits brut et partiellement purifié par le sulfate d'ammonium ont été testés pour leur activité enzymatique de la PPO. Le pyrocatechol est utilisé comme substrat.

L'activité du polyphénol oxydase des extraits est positive en utilisant le pyrocatechol (activité diphénolase ou catécholase); dont l'extrait d'enzyme obtenu après fractionnement par le sulfate d'ammonium révèle l'activité la plus élevée. Les résultats de l'activité enzymatique de la PPO dans les deux extraits sont représentés dans le tableau (02).

**Tableau 02 :** Tableau récapitulatif de l'activité enzymatique de la PPO de dattes Deglet Nour, dans l'extrait brut et partiellement purifié par le sulfate d'ammonium.

Extraits	Volume total (ml)	Activité enzymatique totale (UE)*	Protéines totale (mg)	Activité spécifique (UE/mg)	Rendement des protéines %	Taux de purification
Extrait brut	65	1.86	94.94	0.02	100	1
Extrait partiellement purifié par le sulfate d'ammonium à 80%	5	2.77	17.23	0.16	18.14	8

\*1Unité d'activité enzymatique = l'augmentation d'une unité d'absorbance à 405 nm/min d'enzyme.

D'après les résultats du tableau (02), on a constaté que l'activité de la polyphénol oxydase des extraits est positive en utilisant le pyrocatechol(activité diphénolase). Nos activités enzymatiques pour l'extrait brut et qui purifié par le sulfate d'ammonium à 80% de saturation sont 1.86et 2.77 UE respectivement.

La quantité en protéines totales dans les deux extraits d'enzyme est de 94.94 et 17.23 mg pour l'extrait brut et qui purifié par le sulfate d'ammonium à 80% de saturation respectivement. On a constaté que pendant les étapes du procédé de purification de la PPO par, le sulfate d'ammonium, une grande partie de l'activité enzymatique est perdue. Presque 81.86%des protéines extraites ont été éliminées et cela à cause de l'élimination des autres enzymes.

L'activité enzymatique spécifique est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique volumique (UE/ml) et la concentration totale en protéine de l'extrait enzymatique (mg/ml).L'activité spécifique après le fractionnement au sulfate d'ammonium à 80 %, a été augmentée par rapport l'activité de l'extrait brut, dont elle est égale 0.16 UE/mg. Cette augmentation peut être attribuée à l'élimination des inhibiteurs endogènes (Golbeck et Cammarata, 1981 ; Vámos-Vigyázó, 1981).

Plusieurs auteurs ont trouvé des taux de purification compris entre 1 et 8-fois pour la PPO des différentes sources purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium (Yagaret Sagirogl, 2002 ; Prabhaet Patwardhan, 1982 ; Janovitz-Klappet *al.*, 1989 ; Goulart P.F. et *al.*, 2003).

On peut conclure que plusieurs méthodes de purification de la PPO ont été développées. Elles différent selon la source de l'enzyme et selon le degré de pureté atteint.

## II. Propriétés biochimiques de la PPO :

La détermination des caractéristiques biochimiques de la PPO extraite de dattes de Deglet Nour est effectuée seulement pour l'extrait brut.

### II.1. Paramètres cinétiques :

La mesure de l'activité enzymatique est effectuée par une méthode indirecte en évaluant soit le substrat restant, ou bien le produit obtenu par unité de temps. Dans ce travail, on s'intéresse au dosage du produit libéré lors de l'oxydation de pyrocatechol, par PPO de dattes.

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique de la PPO de dattes Deglet Nour a été étudié en utilisant le pyrocatechol. Les paramètres physico-chimiques sont maintenus constants (tampon phosphate (0.1M, pH 6.8) ; température 25°C et 0.1ml de l'enzyme).

Les paramètres cinétiques de l'enzyme  $V_{max}$  et  $K_m$  ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk.

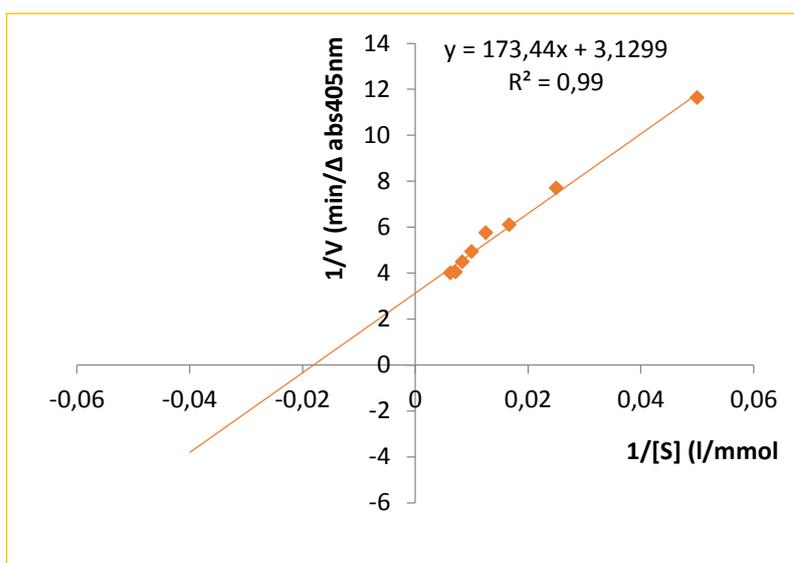


Figure 02 :  
graphique de

Représentation  
Lineweaver-Burk

de la cinétique enzymatique de la PPO de dattes Deglet Nour.

La représentation graphique de Linweaver-Burk (Figure 02), nous avons permis de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme  $V_{max}$  et  $K_m$  :

- $V_{max}$  est la vitesse maximale de la réaction (UE/min.ml);
- $K_m$  est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (mM) ou constante du Michaelis-Menten, mesure l'affinité du substrat pour l'enzyme, c'est-à-dire la stabilité du complexe ES (mM);

D'après le tracé de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat utilisé indique que l'oxydation du pyrocatechol par la PPO de dattes suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten.

Le tableau suivant (Tableau 03) résume les valeurs obtenues de ces paramètres.

**Tableau 03 :** Paramètres cinétiques et l'efficacité catalytique de substrat vis-à-vis de l'activité enzymatique de la PPO de dattes Deglet Nour

<b><math>V_{max}</math></b> (UE/min.ml)	<b><math>K_m</math></b> (M)	<b>Efficacité catalytique</b> ( $V_{max}/K_m$ ) (UE/min.ml.M)
0.005	0.055	5.81

Il est bien connu que les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  de la PPO varient avec le type de substrat, le tampon, la concentration ionique, la température, la source d'enzyme, le degré de pureté de l'enzyme et la méthode utilisée pour son extraction (Arslan et al., 1997 ; Dogan et Dogan,2003).

En termes d'efficacité catalytique ( $V_{max}/K_m$ ), le pyrocatechol semble être le meilleur substrat pour la PPO de dattes Deglet Nour et même pour le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) qui a été étudié par Gouzi (2011).

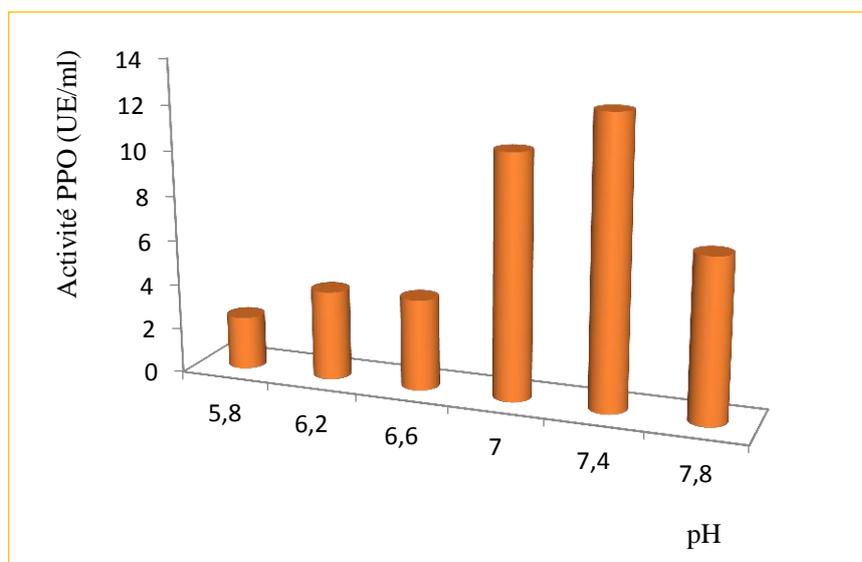
Les valeurs de la constante d'affinité  $K_m$  de la PPO rapportées dans la littérature sont comme suit : Dattes Barhee et Zahdi (3.5 et 8.75mM) (Sachdeet *al.*, 1989), le mangue (3.49 mM) (Prabha et Patwardhan, 1982), le coing (4.54mM) (Yagar et Sagiroglu, 2002) pour le catéchol en tant que substrat expérimental.

La gamme étendue en valeur  $K_m$  de la PPO rapportée dans la littérature peut être due aux différentes méthodes d'extraction et d'analyse utilisées, aux différentes sources végétales et aux différentes valeurs du pH de l'extraction.

## **II.2. Effet de pH :**

L'une des influences les plus directes sur l'activité enzymatique est celui de pH du milieu. Le pH peut changer l'état d'ionisation des acides aminés acides ou basiques dans le site actif des enzymes. Cela conduit à l'altération de l'enzyme ainsi que sa structure tertiaire de substrat. Les changements du pH influencent également la distribution de la charge de l'enzyme, des substrats phénoliques et des produits.

L'activité enzymatique de polyphénol oxydase a été déterminée dans une série d'expériences en mesurant la vitesse initiale de la réaction d'oxydation du pyrocatechol à différents pH du tampon phosphate de sodium à 0.1M compris entre 5,8 à 7,8, tout en maintenant les autres paramètres expérimentaux constants. Lorsque, l'extrait enzymatique brut de dattes a été mélangé avec le substrat, la solution a viré brun qui s'est fortement absorbée à 405nm. Cette absorbance est significative sur une large gamme de pH (Figure 03).



**Figure 03 :** La variation de l'activité enzymatique de la PPO en fonction du pH.

La représentation graphique de l'activité polyphénol oxydase (UE/ml) en fonction du pH montre l'existence d'une cloche avec un maximum d'activité à pH 7.4.

De part et d'autre de pH optimal, l'activité enzymatique diminue à cause du changement du degré d'ionisation des groupements localisés à l'intérieur ou au voisinage du site actif de l'enzyme, qui seront impliqués dans la fixation et/ ou la transformation des substrats (Khatun et *al.*, 2001). Aussi, le changement d'activité de la PPO en fonction de pH du tampon peut être causé par le changement de la conformation et la stabilité de l'enzyme (Gouzi, 2006).

La plage du pH à laquelle une enzyme montre une activité maximale est appelée stabilité du pH. L'augmentation ou la diminution du pH au-dessus ou au-dessous de la plage de stabilité conduit à une diminution de l'activité enzymatique. Généralement, le pH optimal de la PPO varie avec la source végétale et il est situé dans une large gamme de pH 4.0-8.0 (Mayer et Harel, 1979 ;Yoruk et Marshall, 2003).

L'extrait enzymatique de la PPO extraite de dattes Deglet Nour a montré une instabilité du pH acide mais était plus stable près du pH neutre comme le montrent la figure (03). Cette observation concorde avec plusieurs travaux publiés sur des fruits très riches en PPO. Par exemple il a été signalé que les valeurs optimales de la PPO sont 7 pour la pomme (Oktay et *al.*, 1995), 7 pour le Banane (Unal, 2007), 7 pour le Mangue (Wang et *al.* 2007), 7.5 pour le champignon de Paris (Gouzi, 2011), et 7 pour la laitue (Altunkaya et Gökmen, 2008).

le pH optimal de notre extrait enzymatique de dattes est supérieur à celui rapporté par Daas Amiour et Hambaba (2016) qui ont trouvé les valeurs 7.2 et 6.4 en tant que pH optimal de la PPO pour la variété Ghars et Deglet Nour respectivement, par l'utilisation de 4-méthyl catéchol comme substrat ; et par Sidhu (2006) qui a trouvé un pH optimum égal à 6,4 pour les dattes en utilisant le catéchol en tant que substrat (Daas Amiour, 2017).

La plus part des PPOs des végétaux possèdent un maximum d'activité à partir du pH neutre (pH 7) ou juste après. En général, La valeur optimum du pH de la PPO dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Whitaker, 1994 ; Luh et Phithalopol, 1972; Vâmos-Vigyâzô, 1981; Kolcuolu et *al.*, 2006). Ainsi, le type de tampon et la pureté de l'enzyme peut affecter la valeur du pH optimal (Vâmos-Vigyâzô, 1981).

Un pH optimal est le pH auquel une enzyme présente son activité maximale. Il est parmi les facteurs qui affectent la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme. Dont, pour toute enzyme, lorsque la concentration en  $[H^+]$  du milieu réactionnel est supérieure ou inférieure au pH optimal, l'activité a tendance à diminuer. Cette propriété est utilisée dans l'industrie alimentaire pour éviter le brunissement indésirable des produits de fruits en modifiant le pH au-dessous ou au-dessus de l'optimum.

La désactivation de l'enzyme à pH vers 8 peut être attribuée au changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés impliquées dans la réaction catalytique dans les conditions alcalines, le changement de l'état d'ionisation du substrat, la modification de l'équilibre

de la réaction lorsque les protons H<sup>+</sup> ou les hydroxyles OH sont impliqués et/ou les enzymes réagissent plus rapidement avec l'o-quinones (Gouzi, 2011).

Les changements dans l'état d'ionisation des enzymes sont généralement réversibles et la dénaturation irréversible peut toutefois se produire dans des conditions de pH extrême. La stabilité du substrat est également affectée par les changements de pH, comme le catéchol. Ce dernier est un exemple de substrat de la PPO qui est en activité sous sa forme non ionisée ; mais à certain pH, sa protonation aurait se produire et deviendrait moins actif (Gouzi, 2011).

Dans autre cas, les substrats peuvent subir une dégradation chimique dans des conditions extrêmes de pH. Les substrats dégradés se comportent souvent comme des inhibiteurs d'enzymes puisqu'ils partagent les caractéristiques moléculaires du substrat.

### **II.3. Spécificité de substrat :**

La spécificité de PPO vis-à-vis des substrats phénoliques a été largement étudiée. La PPO des végétaux supérieures ont des groupements qui ont la spécificité de pouvoir hydroxylé une large gamme de monophénols et diphénols. Le type et la position des substituants présents sur les monophénols et les diphénols, sont également des causes importantes déterminant la réactivité du substrat (Valero et *al.*, 2002 ; Gouzi, 2006).

Pour les mêmes substrats, de grandes différences dans les paramètres cinétiques (Km et Vm) sont constatées selon la source de l'enzyme (l'espèce, le genre le cultivar et aussi le tissus), la pureté de l'enzyme et les conditions expérimentales (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Vémos-Vigyazo, 1981). L'affinité des PPO va dépendre également des réactions secondaires susceptibles de se produire lors de l'extraction et de la purification telles que la formation de liaisons covalentes avec les quinones (Mayer et Harel, 1991).

Nombreux substances ont été rapportées dans la littérature comme des substrats naturels de PPO. A titre d'exemple : la catéchine, 3,4-dihydroxy phénolalanine (DOPA), tyrosine, les dérivés de

l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique, les flavonoïdes, les tanins et les dérivés du pyrocatechol. Les catéchols agissent généralement en tant que le meilleur substrat pour l'enzyme PPO (Cheriot, 2007).

La spécificité de la PPO de notre extrait brut de dattes a été examinée en employant quatre substrats mono, di et tri phénols à savoir le phénol, le pyrocatechol, l'acide caféique et l'acide gallique. Tous les substrats sont préparés à 0.1M dans un tampon phosphate de sodium (0.1 M, pH 6.8).

Les résultats de la variation des activités enzymatiques de la PPO provenant de différents types de substrats sont montrés dans le tableau (04).

**Tableau 04 :** Résultat de la spécificité de substrat de la PPO extraite de dattes de Deglet Nour

<b>Les substrats</b>	<b>Type de substrat</b>	<b>Activité enzymatique (UE/ml)</b>	<b>AE relative aupyrocatechol (%)</b>
Phénol	Monophénol	0.0034	121.5053763
Pyrocatechol	Diphénol	0.0028	100
Acide caféique	Diphénol	0.0050	173.1182796
Acide gallique	Triphénol	0.0021	75.2688172

Les résultats du tableau (04) ont montrés que l'extrait enzymatique brut de dattes Deglet Nour peut hydroxylé les mono, di et triphénols. Une faible activité de PPO a été observée pour l'acide gallique et une forte activité a été enregistrée pour les trois autres substrats. Tandis que, l'acide caféique a été oxydés activement par la PPO. Ces résultats suggèrent que la PPO, possède les activités mono-et diphénol oxydases.

Nos résultats expérimentaux sont semblables ont à ceux mentionnés dans la littérature. A titre d'exemple, les PPOs de quelques végétaux qui possèdent les deux activités mono-et diphénol oxydases, nous pouvons citer la pomme de terre et le champignon de Paris (Gouzi, 2011). Pour certaines PPOs extraites de différentes sources, la quantité d'activité monophénol oxydase semble être plus faible ou négligeable par rapport à l'activité diphénol oxydase ; par exemple : les PPO des raisins (Lee *et al.*, 1983), des fraises (Wesche-Ebeling et Montgomery, 1990), des graines de haricot (Paul et Gowda, 2000) et des graine de tournesol (Raymond *et al.*, 1993).

La PPO des végétaux peut agir sur une large gamme de composés phénoliques (mono et diphénols) avec degré de variation en fonction la nature de la chaîne latérale, le nombre des groupements hydroxyle et leur position dans l'anneau benzénique du substrat (Harel *et al.*, 1964).

Les spécificités relatives des polyphénol oxydases sur des substrats changent d'une source à l'autre de l'enzyme cela est confirmé par Lee *et al.*,(1983) qui a montré que la spécificité du substrat de la PPO dépend des espèces aussi même des cultivars. Par exemple, dans le cas du PPO du raisin de Chanac, l'acide caféique est oxydé à de taux beaucoup plus rapide que d'autres substances structurellement apparentées. Oba *et al.*, (1992) ont en outre observé que les isoformes de la PPO dans un tissu d'intérêt peuvent également présenter des spécificités différentielles de substrat et des variations dans leurs activités relatives vis-à-vis des monophénols et des o-diphénols (David Morakinyo, 2016).

#### **II.4. Stabilité thermique de la PPO :**

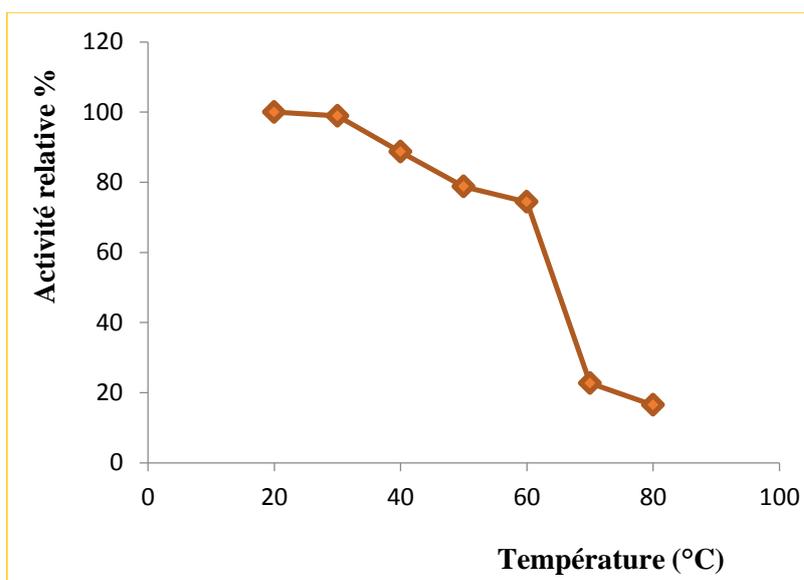
La température est un facteur critique dans le stockage des fruits car elle peut affecter la qualité des fruits pendant le développement. Les polyphénols oxydase végétales en général sont connues pour être des enzymes thermosensibles (Vâmos-Vigyâzô, 1981). Cependant, les caractéristiques de thermo-sensibilité dépend de la spécificité du substrat, du pH optimal et aussi et surtout de la source d'enzyme et du cultivar (Vâmos-Vigyâzô, 1981; Yemenicioglu et Cemeroglu,

2003). L'inactivation thermique de la PPO peut être considérée comme étant une forme d'inhibition de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991).

Pour cette raison, nous avons étudié l'évolution de l'activité de l'extrait brut de PPO à partir des dattes de Deglet Nour pour différents traitements de température allant de 20 à 80 °C pendant 30 min en absence de substrat.

Après traitement thermique des extraits bruts de la PPO, l'activité enzymatique résiduelle a été mesurée dans les conditions optimales suivantes : pyrocatechol 0.1M et pH 6.8 dans tampon phosphate de sodium 0.1 M.

La figure (04) montre l'évolution de l'activité résiduelle de PPO de dattes de Deglet Nour en fonction de la température de chauffage (entre 20 et 80°C).



**Figure 04 :** Effet de la température sur la stabilité de la PPO de datte Deglet Nour.

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique de la PPO de dattes de Deglet Nour, sont représentés dans la figure (04). La représentation graphique de l'activité résiduelle de PPO, exprimée en pourcentage de l'activité enzymatique relative à 20°C pour les différentes températures

testées, indique que l'enzyme est stable thermiquement dans l'intervalle de température compris entre 20 à 30°C puis enregistre une désactivation progressive de l'activité enzymatique.

A partir la température 40°C, la PPO a commencé de perdre son activité légèrement de 10 % pour chaque augmentation de 10°C de température d'inactivation. Aux températures supérieures à 60°C, la vitesse d'inactivation était plus grande avec l'augmentation de la température et l'enzyme perdue plus de 80% de son activité à 80°C.

L'inactivation totale de cette enzyme nécessite une température supérieure à 80°C. Ceci est en accord avec les résultats de Dorantes-Alvarez et Chiralt (2000) et Tomas-Barberan et Espin (2001) qui ont mentionné qu'une température supérieure à 80°C est nécessaire pour assurer l'inactivation de la PPO dans les produits horticoles transformés, comme les jus, les fruits en conserve, les légumes, etc...(Daas Amiour, 2017).

En plus, on peut déduire la température de transition ( $T_m$ ) qui est la température maximale à laquelle l'enzyme maintient 50% de son activité initial après incubation pendant 30 minutes. Ce paramètre permet de comparer nos résultats avec d'autres travaux publiés. La température de transition ( $T_m$ ) déterminée est approximativement égale 65°C, c'est-à-dire presque 40% de l'activité enzymatique est perdue.

Des résultats similaires dans l'étude de la stabilité thermique de la PPO de diverses sources ont été rapportés dans la littérature. Hasegawa et Maier (1980) ont montré que la PPO extraite à partir de dattes Deglet Nour perd 50% de son activité à 67°C. Tandis que, Sachde (1989) a trouvé que la température 55°C est suffisante pour diminuer 50% de l'activité de PPO extraite de dattes Bahree.

Également, l'étude de la stabilité thermique de la PPO de coing et d'écorce de Mangue montre que l'activité de l'enzyme pour les deux espèces a perdu 50% de son activité à 75°C (Yagar et Sagiroglu, 2002 ; Prabha et Patwardhan, 1982).

La diminution rapide de l'activité enzymatique au-dessus de 30°C pourrait être due aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme, à la destruction de son site actif (Gouzi, 2011) et d'autre part à la dissociation de quelques formes oligomères de la PPO vers des monomères moins actifs sous l'influence du chauffage doux (Yemenicioglu, 2002). Ainsi, nous pouvons noter qu'aux températures relativement élevées dans lesquelles plusieurs faibles liaisons qui maintiennent la structure native de l'enzyme sont déstabilisées. Par conséquent l'enzyme devient inactive.

Selon Patnaik (2002), l'inactivation thermique de la PPO dépend non seulement de la température mais, dépend aussi, du temps d'incubation de l'enzyme. En effet, les traitements thermiques de courtes durées aux températures de 70 à 90°C de l'enzyme sont dans la plus part des cas, suffisantes pour la destruction irréversible de sa fonction catalytique (Vâmos-Vigyâzô, 1981). De façon générale, l'enzyme PPO n'est pas extrêmement thermostable (Amiot et *al.*, 1987).

### **III. Inhibition de l'activité de la PPO :**

PPO est distribué dans presque toutes les végétaux supérieurs, y compris la pomme, le pêche, le banane, le mangue, les graines de raisin, les dattes, ... (Rolle et *al.*, 1991; Chen et *al.*, 1997). Parce que ces produits ont un impact économique énorme sur l'industrie alimentaire, le contrôle de l'activité de la PPO est important pour la prévention du brunissement des végétaux et fruits (Jolivet et *al.*, 1998; Qiu et *al.*, 2009).

De nombreux paramètres influencent le brunissement enzymatique dans les fruits et légumes. Il s'agit de la nature et la concentration en composés phénoliques, de la concentration en enzymes, du pH et l'oxygène.

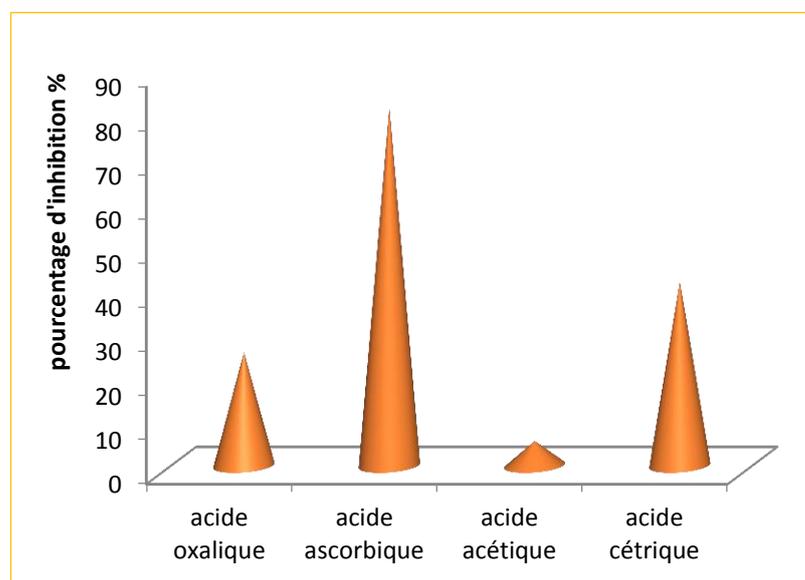
Le brunissement des fruits et des légumes par la PPO peut être empêché par l'inactivation thermique de l'enzyme, par l'élimination de l'un des deux substrats nécessaires pour la réaction (O<sub>2</sub> et/ou les composés phénoliques), par l'abaissement du pH au-dessous du pH optimum ou par l'addition des composés qui inhibent la PPO (Vâmos-Vigyâzô, 1981 ; Whitaker et Lee, 1995).

Des centaines de composés ont été examinés comme des inhibiteurs du brunissement enzymatique (Whitaker et Lee, 1995). Ils ne doivent pas être toxiques, et ne doivent pas modifier le goût, la saveur ou la texture du produit (Vâmos-Vigyâzô, 1981).

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la polyphénol oxydase, parmi lesquels : les agents de chélation pour le cuivre, les inhibiteurs non-compétitifs ou compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique, des agents réducteurs (les sulfites ; l'acide ascorbique, l'acide érythorbiques) (Zawistowskiet *al.*, 1991), les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques, les acides carboxyliques (Mayer et Harel, 1979 ; Nicolas et *al.*, 1994).

L'activité de PPO de dattes Deglet Nour a été mesurée en utilisant quatre inhibiteurs différents (l'acide oxalique, l'acide ascorbique, l'acide citrique et l'acide acétique) à une même concentration (100mM) avec le pyrocatéchol comme substrat.

Les effets de divers composés chimiques sur l'activité de la PPO sont présentés dans la figure (05).



**Figure 05 :** Le pourcentage d'inhibition de quelques composés chimiques vis-à-vis l'activité de la PPO de datte Deglet Nour.

Les résultats de la figure (05) montrent que tous les inhibiteurs testés ont provoqués une diminution significative de l'activité de la PPO. En effet, la PPO a été nettement inhibé par l'acide ascorbique. Également, l'activité de PPO était inhibée par l'acide citrique, l'acide oxalique et l'acide acétique ; mais les effets inhibiteurs ont été moins affectés.

Nous pouvons classer les produits chimiques utilisés dans l'ordre décroissant de leur effet inhibiteur de la PPO comme suit : acide ascorbique (81.37%) > acide citrique (41.83%) > acide oxalique (25.76%) > acide acétique (5.61%).

D'après les résultats obtenus ainsi, il s'est avéré que l'acide ascorbique à un pourcentage d'inhibition le plus élevé égale 81.37%.

L'effet inhibiteur de l'acide ascorbique sur les activités PPO a également été confirmé dans l'étude de Li-Qin et *al.*, (2009), qui ont constaté que l'indice de brunissement des tranches de pêches traitées à 0,2% d'acide ascorbique était très faible après dix jours de stockage.

Les inhibiteurs de la PPO pourraient inhiber la réaction enzymatique en réagissant avec la molécule d'enzyme soit en inhibant directement la PPO, soit en réagissant avec les o-quinones (Mc Evily et *al.*, 1992). L'acide ascorbique est un agent réducteur qui agit en réduisant les quinones générés par la PPO en phénols (Dorantes-Alvarez et Chiralt 2000 ; Tortoe et *al.*, 2007). En effet, il a empêché la formation des polymères bruns dans différentes études de recherches sur les fruits et légumes sans agir directement sur l'enzyme (Bayindirli, 2010). En plus, le produit d'oxydation de l'acide ascorbique peut réagir avec les groupes amine à proximité du site actif de l'enzyme (Yagar et Sagiroglu, 2002).

L'activité de l'enzyme est diminuée en présence de tous les autres produits chimiques utilisés à des degrés divers, ce qui est en accord avec la littérature. Notant que les acides sont utilisés pour inhiber le brunissement enzymatique en augmentant l'acidité. Il s'agit entre autres de l'acide citrique, tartrique et ascorbique (Barett et *al.*, 2005).

L'acide citrique pourrait inactiver la PPO par deux mécanismes : élimination du cuivre du site actif et par la diminution du pH du milieu (Mc Evily et *al.*, 1992). Lorsque l'acide citrique est un agent chélatant, il a formé un complexe avec le cuivre par le biais d'un électron non partagé dans sa structure (Dorantes-Alvarez et Chiralt, 2000 ; Tortoe et *al.*, 2007).

Dans l'étude de Jiang et *al.* (2004) sur la châtaigne d'eau chinoise fraîchement coupée, des faibles concentrations de l'acide citrique ont stimulé l'activité de la PPO ; néanmoins à une concentration égale ou supérieure à 0,1 mol/l, il a nettement inhibé cette activité enzymatique (DaasAmiour, 2017).

López-Nicolás et *al.* (2007) ont trouvé que l'acide ascorbique en combinaison avec l'acide citrique était un inhibiteur plus efficace que l'acide ascorbique seul. Cette inhibition accrue est probablement due à la stabilité accrue de l'acide ascorbique dans un environnement acide ainsi qu'à l'inhibition de l'environnement acide sur l'activité catalytique de l'enzyme (David Morakinyo, 2016).

L'inhibition de la PPO est également provoquée par l'acide oxalique qui outre leur pouvoir chélateur de métaux, est un inhibiteur des PPO (Kahn et Andrawis, 1985 ; Kahn et *al.*, 1995 ; Espin et Wichers, 1999).

Le site actif de la PPO est composé de deux atomes de cuivre à travers lesquels l'enzyme interagit avec ses substrats phénoliques et l'oxygène. Les agents chélatants ont la capacité de réagir avec les métaux par chélation. Ils rendent le cuivre au site actif indisponible, inhibant ainsi la PPO (Morakinyo, 2016).

En général, ces composés diminuent ou inhibent la vitesse de réaction de brunissement en éliminant un (des) élément (s) actif (s) de réaction. La PPO provenant de différentes sources peut réagir de manière similaire avec des composés inhibiteurs. Cependant, l'efficacité des inhibiteurs contre différentes PPO pourrait varier de manière significative et, par conséquent, des mesures

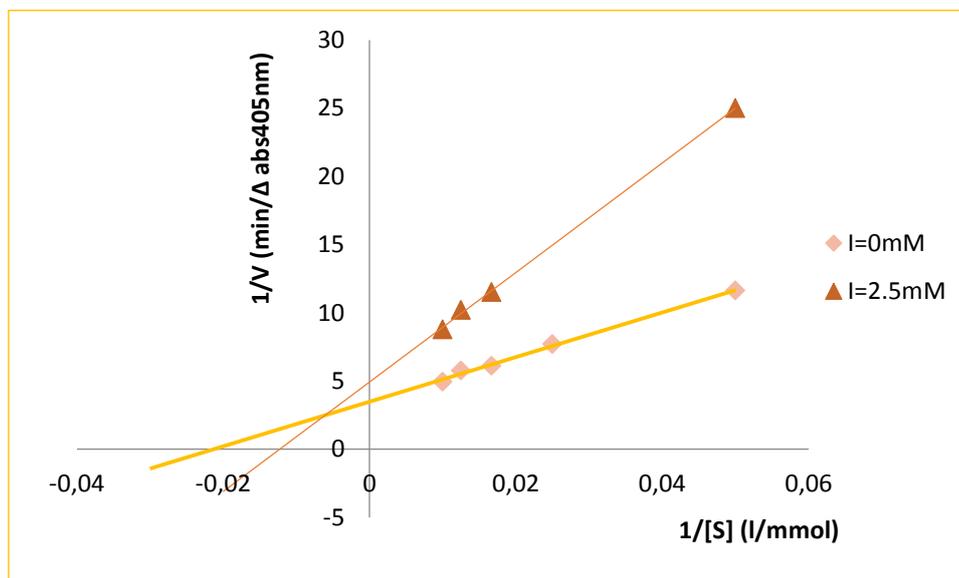
de contrôle spécifiques pour des systèmes individuels seraient également nécessaires (Ferrar et Walker, 1996).

### III.1. Cinétique de l'inhibition de la PPO de dattes Deglet Nour par l'acide ascorbique :

D'après les résultats ainsi obtenus de l'effet inhibiteur de quelques composés contre la PPO, il s'est avéré que l'acide ascorbique a provoqué une diminution significative de l'activité de la PPO avec un pourcentage plus de 80%.

Dans les conditions expérimentales précédemment utilisées, en absence et en présence de l'acide ascorbique, le graphique de l'inverse de la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol à diverses concentrations d'inhibiteur ( $1/V_{max}$ ) en fonction de l'inverse de la concentration de substrat ( $1/S$ ) est un ensemble des lignes droites à différentes pentes qui se croisent l'une sur l'autre.

La figure (06) montre le graphique de Lineweaver-Burkde l'enzyme en présence d'acide ascorbique, qui nous a permis de mieux déduire le type d'inhibition ainsi que les valeurs des paramètres cinétiques de l'enzyme ( $V_{max}$ ,  $K_m$  et  $K_i$ ).



**Figure 06 :** Le graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de dattes Deglet Nour par l'acide ascorbique.

L'effet inhibiteur de l'acide ascorbique sur l'activité de la PPO de dattes Deglet Nour est étudié en utilisant le pyrocatechol comme substrat. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau(05).

**Tableau 05 :** Type d'inhibition,  $K_i$ ,  $K_m$  et  $V_{max}$  de la PPO de dattes Deglet Nour avec l'acide ascorbique comme inhibiteur.

Inhibiteur	[I] (mM)	$K_i$ (mM)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (UE/min.ml)	Type d'inhibition
Acide ascorbique	2.5	3.36	81.96	0.0031	Non compétitive Mixte-type I

La constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre,  $K_i$ , est obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente ( $K_m$ ) en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Comme c'est indiqué dans le Tableau (05), la constante d'inhibition ( $K_i$ ) pour l'acide ascorbique, utilisant le pyrocatechol comme substrat est 3.36mM selon un type d'inhibition non compétitive mixte type I.

La représentation graphique de  $1/V_o$  en fonction de  $1/[S]$ , est une série de courbes droites de pentes différentes, qui se croisent l'une sur l'autre côté abscisses négatives et ordonnées positives, avec une diminution de la valeur de  $V_{max}$  et inversement, une augmentation du  $K_m$ . Ces résultats indiquent que l'acide ascorbique est un inhibiteur mixte-type I de l'activité enzymatique de la PPO de dattes. Dans ce cas, l'inhibition mixte signifie que l'inhibiteur affecte l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat, sans pour autant se fixer sur le site actif du substrat (Macrae et Duggleby, 1968).



# Conclusion

Cette étude de recherche s'intéresse à la mise en évidence d'un effecteur qui intervient dans le phénomène biochimique important, à savoir le brunissement enzymatique, se produisant au sein des dattes Deglet Nour post récolte et qui conduit à leur altération et la perte de leur qualité nutritionnelle et leur valeur marchande. Cet effecteur est l'enzyme de polyphénol oxydase.

Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de cette étude s'est focalisé sur la caractérisation de PPO extraite à partir de dattes de *Phoenix dactylifera* L., variété de Deglet Nour, récolté de la région de Metlili - Ghardaïa. Cette mise en évidence est accompagnée des tests importants de l'inactivation et/ou du ralentissement des réactions d'oxydation des phénols aboutissant au brunissement ; il s'agit du pH et de la température. En plus, l'inhibition par des produits chimiques (acides ascorbique, citrique, oxalique et l'acide acétique) a été testée.

Cette étude nous a permis de souligner l'importance de l'activité enzymatique du polyphénol oxydase extraite des dattes Deglet Nour et son implication directe dans le brunissement par l'analyse de quelques paramètres influençant l'activité de PPO. Notre choix s'est porté sur ce fruit puisqu'il de grande importance socio-économique.

L'extraction et de purification partielle de PPO à partir de dattes Deglet Nour se sont avérées simples à mettre en œuvre et nous ont permis d'obtenir des extraits enzymatiques riches en PPO et également très stables. L'avantage principal de ces méthodes est de préserver l'activité enzymatique de la PPO.

A la lumière des résultats obtenus, les extraits brut et partiellement purifié par le sulfate d'ammonium à 80% de saturation possèdent une activité enzymatique positive vis-à-vis la polyphénol oxydase qui est de 1.86et 2.77 UE respectivement, en utilisant le pyrocatechol comme substrat.

Au cours des étapes du procédé de purification de la PPO par le sulfate d'ammonium, une grande partie de l'activité enzymatique est perdue. Presque 81.86% des protéines extraites ont été éliminées.

L'influence de la concentration en pyrocatechol sur l'activité enzymatique fait apparaître une réponse michaelienne classique avec des valeurs  $V_{max}$  et  $K_m$  égales 0.005 UE/min.ml et 0.055M respectivement.

D'autre part l'enzyme possède une spécificité vis-à-vis de plusieurs substrats phénoliques soit mono, di ou triphénols. Une forte activité a été enregistrée pour le pyrocatechol, l'acide caféique et le phénol. Tandis que, une faible activité de PPO a été observée pour l'acide gallique.

L'effet de quelques paramètres physico-chimiques sur l'activité de la PPO a été montré par l'étude de l'influence de la variation du pH et de la température sur l'activité de la PPO. L'activité de la PPO est plus élevée aux pH voisins de la neutralité. Elle est maximale aux pH 7.4 à une température 25°C en présence de pyrocatechol comme substrat.

Les études de la stabilité thermique de la PPO montrent que l'activité enzymatique de la PPO est stable dans un intervalle compris entre 20°C et 30°C. En outre, l'inactivation thermique de la PPO de dattes Deglet Nour a été notée pour des températures supérieures à 80°C et pourrait être considérée donc comme un moyen efficace pour le contrôle du brunissement enzymatique de dattes.

Le test de l'effet inhibiteur de certains produits chimiques sur l'activité enzymatique du polyphénol oxydase extraite de dattes Deglet Nour a mis en évidence la grande capacité inhibitrice de certains d'entre eux. En particulier et par ordre d'inhibition décroissante : l'acide ascorbique, l'acide citrique, l'acide oxalique et l'acide acétique. En parallèle, l'inhibition de l'activité

enzymatique de la PPO par l'acide ascorbique a été mesurée pour différentes concentration d'inhibiteur. Le type d'inhibition observé est non compétitif mixte 1.

Au terme de ce travail de recherche et par considération de tous les résultats trouvés, il convient de dire que l'inactivation thermique ou par l'action de l'acide ascorbique, sont des rôles prometteur dans l'inhibition du brunissement enzymatique et permet donc de préserver les propriétés organoleptiques de Deglet Nour durant le stockage après récolte.

En perspectives, il serait envisageable d'ajouter des étapes de purification supplémentaires pour pouvoir purifier et concentrer la PPO de dattes par exemple par chromatographie d'affinité et étude par électrophorèse sur gel. Ainsi, l'extraction et l'étude des PPOs issues des autres variétés Algérienne du *Phoenix dactylifera* L. ou autres matières végétales locales riches en PPO ont été requis. La prévention de la réaction de brunissement constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires, donc la découverte des inhibiteurs puissants permet d'inactiver et/ou du ralentir de cette réaction est très important.

Références

Bibliographies

**Références bibliographies**

- Abbes, B. F., (2011). Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes ((Phoenixdactylifera L.)), Mémoire de Magister, en Génie des procédés pharmaceutiques Université Ferhat Abbas-Setif.
- Al-Jassabi S., Saad A., Satyakeerthy T.R. and Abdullah M.S. (2013). Characterization of Polyphenol Oxidase from Zzyphusspina-christifrom Iraq. Middle-East Journal of Scientific Research 14 (2): 155-160.
- Altunkaya, A., &Gökmen, V. (2008). Effect of various inhibitors on enzymatic browning,antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (Lactuca sativa). Food Chemistry, 107(3), 1173-1179.
- Alyward, F. and Haisman, DR. (1969).Oxidation system in fruits and vegetables-their relation to the quality of pressured products. Advances in Food Research, 17: 1-76.
- Amiot, M.J., Tachini, M., Aubert, S. & Nicolas, J. (1992). Phenolic compounds and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity.J. Food Sci., 57, 958-962. and vegetables. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 15:49-127.
- Arsian, O and Dogan, S. (2005). Inhibition cf polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85: 1499-1504.
- Arslan, O., Temur, A., Tozlu, İ. (1997). Polyphenol oxidase from Allium sp. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 2861-2863.
- Aubert S., Amiot M.J., Nicolas J. (1992). Les critères de brunissement des pommes. Sciences des Aliments, 12, 625-647

- Barrett, D.M., Somogyi, L.P., & Ramaswamy, H.S. (2005). Processing fruits (Sciences and Technology). Second ed. CRC Press, Orlando, USA, 841 p.
- Barrett, D.M., Somogyi, L.P., & Ramaswamy, H.S. (2005). Processing fruits (Sciences and Technology). Second ed. CRC Press, Orlando, USA, 841 p.
- Barreveld W.H., 1993. Date palm products, FAO agricultural service bulletin n°101, Rome
- Bayindirli, A. (2010). Enzymes in fruit and vegetable Processing: Chemistry and Engineering Applications. Taylor and Francis Publishing, CRC Press, London, pp. 197–214.
- Ben Abbes F. (2011). Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes « Phoenix dactylifera L. ». Mémoire de Magister en Génie des procédés pharmaceutiques. Université Ferhat Abbas-Setif : 1-11 p .
- Benchelah, A. C., & Maka, M. (2008). Les dattes : intérêt en nutrition. *Phytothérapie*, 6(2), pp 117-121.
- Biglari, F., AlKarkhi, A. F., & Easa, A. M. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food chemistry*, 107(4), 1636-1641.
- Botes, P et Zaid, A. (1999). Climatic requirements of date palm, Date palm cvltivation, FAO, Rome, 58-107.
- Bouabidi, H. ,Reynes, M. , Rouissi, M. B. (1996).. INRAT, 69 :73-87.
- Boubekri, A. (2010). Optimisation des traitements thermiques de la datte Algérienne «Deglet-Nour» (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Université de HADJ-LAKHDAR de Batna, Algérie).
- Bouddar C., Bouzid L. et Nait larbi H. (1997). Etude des fractions minérale et glucidique de la datte Deglet-Nour au cours de la maturation. Mémoire d'Ingénieur, INA. El-Harrach. Alger 60 p.
- Burton, SG. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*, 22: 459-487.

- Cheftel J.C., Cheftel H. (1976). Le brunissement enzymatique. In Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Tec. Doc., Lavoisier, 353-363.
- Chen QX, Lu HY, Zhu CM, Lin liN, Zhou 11M. The effect of N- thiophosphoryl amino acids on the activity of green ciub (*Scylla serrara*) alkaline phosphatase. *BiochemMolBiollut* (1998); 45: 465-73.
- Chen, H.J. & HO., T.C. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2374-2378.
- Chen, J.S., Charest, D.J., Marshall, M.R. and Wei, C.I. (1997). Comparison of two treatment methods on the purification of shrimp polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* 75: 12–18.
- Cheriot S. (2007). Role des produits de la réaction de maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phenols et des lipides. Thèse de doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- DaasAmiour, S. (2017). Mise en évidence et inhibition du brunissement enzymatique post récolte des dattes DegletNour et Ghars (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- Dakhia, N., et al. "Etat phytosanitaire et diversitevarietale du palmier dattier au bas sahara-algerie." (2013).
- David Morakinyo S. Purification partielle et caractérisation de la polyphénol oxydase de deux aubergines couramment consommées (*Solanum mellongena depressum* et *Solanum gilo*) au Nigeria. *Biochimie et biologiémoléculaire* . Vol. 1 , No. 1 , (2016), pp. 1 - 10 . doi: 10.11648 / j.bmb.20160101.11 determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 81, 853–876.
- Djerbi M., (1994)- Précis de phoeniciculteurs. FAO, 192 p.
- Dogan, M., Dogan, S. (2003). Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *Chaubardii* var. *chaubardii*). *J Food Chem*, 39: 1-9.

- Dogan S, Turan Y, Ert0rk H, Arslan O. (2005). Characterization and Puri- fication of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynarascolymus L.*). *J Agric Food Chem*; 53: 776-85.
- Dorantes-Alvarez, L. &Chiralt, A. (2000). Color of minimally processed fruits and vegetables as affected by some chemical and biochemical changes, Dans: Alzamora, S.M., Tapia, M.S. & Lopez-Malo, A. (Eds.), *Minimally Processed Fruits and Vegetables*, Aspen Publications. Gaithersburg MD, pp. 111–126.
- Dowson, V. H. W., &Aten, A. (1963).Récolte et conditionnement des dattes. Collection FAO, Progrès et Mise en Valeur. Agriculture (FAO) fre no. 72.
- Dubost D., (1991) : Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis Algérienne.Thèse Doc. Uni Ouargla p 547.
- Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C., Deroanne, C., Drira, N. E., &Attia, H. (2008). Date flesh: Chemical composition and characteristics of the dietary fibre. *Food chemistry*, 111(3), pp 676-682.
- Espiard E., (2002)- Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc- Lavoisier, 360 p.
- Espin J.C., Garcia-Ruiz P.A., Tudela J., Varon R.,Garcia-Canovas F. (1998). Monophenolase and diphenolase reaction mechanisms of apple and pear polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2968-2975.
- Fan, Y., Flurkey, WH. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabellamushrooms*. *Phytochemistry*, 65: 671-678.
- Ferrar, P. H et Walker, J. R. L. (1996). Inhibition des diphénoxydases; une étude comparative. *Journal of Food Biochemistry*, 20 : 15-30.

- Ghazi, F., Sahraoui, S. (2005). Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantboucht et Hamraïa. Mémoire d'ingénieur. Institut national d'agronomie. Alger. p 45.
- Golbeck, J.H and Cammarata, K.V. (1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67:977-984.
- Goulart P.F., Alves J. D., Magalhaes M. M., Lima L. C., Meyer L. E., (2003). Purification of polyphenoloxidase from coffee fruits. *Food Chemistry* 83, 7–11
- Goupy, P., Macheix, J.J., Nicolas, J. &Varoqaux, P. (1994). Partial purification and characterization of endive (*Cichoriumendivia L.*) polyphénoloxydases. *Sci. Alim.*, 14, 751-762.
- Gouzi, H. (2011). Etude des propriétés de la polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) du champignon de Paris (*Agaricusbisporus J.E Lange Imbach*). Thèse de doctorat. Université Abou BekrBelkaïd-Tlemcen.
- Gouzi, H. (2006). Contribution à l'étude de la polyphénol oxydase d'*Agaricusbisporus*. Conception d'un système à fibre pour le dosage des composés phénoliques en solution. Mémoire de Magister. Université Abou BekrBelkaïd-Tlemcen
- Gouzi, H. (2014). Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- Hannachi S., Khitri D., Benkhalifa A. et Brac de Perrière R.A. (1998). Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. Ed. Anep. Rouiba, Alger. 225 p.
- Harel E., Mayer A.M., Shain, Y. (1964). Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiol. Plant.*, 17, 921-930.

- Hasegawa S. and Maier V. P. (1980). Polyphenol Oxidase of Dates. *Agric. Food Chem.* 28, 891-893
- Hurst W J. (2008). *Methods of analysis for functional food*. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press. Taylor and Francis. London. p 548.
- Janovitz-Klapp A., Richard F. and Nicolas J., (1989). Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*, Vol. 28, No. 11, pp. 2903-2907,
- Janovitz-Klapp, A.H. Richard, F.C., Goupy, P. & Nicolas, J.J. (1990a). Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 926-931.
- Jeanet, R., Croguennec, T., Schuck, P. & Brulé G. (2006). *Sciences des aliments*, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 383 p.
- Jeanet R., Baron F., Nau F., Roignant M., Brulé G. (1999). High intensity pulsed electric fields applied to egg white: effect on *Salmonella enteritidis* inactivation and protein denaturation. *J. Food Protection*, 62, 1381–1386.
- Jiang, Y., Li, J., & Jiang, W. (2005). Effects of chitosan coating on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. *LWT-food Science and Technology*, 38(7), 757-761.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. (1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102: 1459-1483.
- Kahn V., Andrawis A. (1985). Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. *Phytochemistry*, 24, 905-908.
- Kahn V., Lindner P., Zakin V. (1995). Effect of kojic acid on the oxidation of dihydroxyphenols by mushroom tyrosinase. *J. Food Biochem.*, 18, 253-271.

- Kendri S. (1999). Caractéristiques biochimiques de la biomasse "Saccharomyces cerevisiae" produite à partir des dattes "Variété Ghars". Mémoire d'Ingénieria. Département d'agronomie. Batna. 51 p.
- Khali M. et Selselet-AttouG. (2007). Effect of heat treatment on polyphenol oxidase and peroxidase activities in Algerian stored dates. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (6), pp. 790-794.
- Khatun, S., Absar, N., Ashraduzzaman, M. (2001). Purification, Characterization and Effect of PhysicoChemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringaoleifera* L.) Leaves at Mature Stage. Pakistan Journal of Biological Sciences, 4: 1129-1132.
- Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N. (2006). "Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiotamastoidea*). Food Chemistry., Vol. 101, 778-785
- Lasram, M., Mzali, M. T., Rhouma, A. (2002). Le palmier dattier, In : l'arboriculture fruitière en Tunisie, 2 : 202-207.
- Lerch K. (1981). Metal ions In biological systems, Sigel H. (Ed), Marcel Dekker 13, 143-186.
- Li-Qin, Z., Jie, Z., Shu-Hua, Z., Lai-Hui, G., (2009). Inhibition of browning on the surface of peach slices by short-term exposure to nitric oxide and ascorbic acid. Food Chem. 114, 174–179.
- Loncle, D. (1992). Génie enzymatique.
- López-Nicolás, J. M., Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, Á. et García-Carmona, F. (2007): Modèle cinétique de brunissement enzymatique du jus de pomme en présence de cyclodextrines: utilisation de la maltosyl- $\beta$ -cyclodextrine comme antioxydant secondaire. Food Chemistry, 101: 1164-1171.
- Lounes, M., Boualem, B. (2015). Le fonctionnement de la filière dattes dans la région de Touggourt Sud-est Algérien.

- Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J., (1990). Phenolic compounds in fruit processing. In : Fruit phenolics, 295-322. C.R.C. Press, Boca-Raton.
- Macheix, J. J., Sapis, J. C., Fleuriet, A., & Lee, C. Y. (1991). Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 30(4), 441-486.
- Macheix, J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). Phenolic compounds in fruit processing. Dans: Macheix, J., Fleuriet, A. Billot, J. (eds.), *Fruit Phenolics*, , CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 239-312.
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. et Kefalas P. 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Chemistry*, 89(3) : 411-420 p.
- Martinez M.V., Whitaker J.R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 195-200.
- Mayer , A.M and Harel, E.(1979) . Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry* , Vol. 18, pp 193-215.
- McEvily, A.J., Iyengar, R. & Otwell, W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *CRC CritRev Food Sci. Nutr.*, 32, 253-273.
- Munier, P. (1973). *Le palmier dattier Techniques agricole et productions tropicales*. Paris Maison Neuve et Larose, 143-174.
- Nezam El-Dim, A. M. (2000). Date palm post-Harverst Processing technology in Egypt. In : Hamdan, I. Y. (ed), Hegazi, N. A. (ed), *Date palm : Post-Harverst Processing technology*, FAO, Rome, 42-73.

- Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M. J., & Aubert, S. Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(2), 109-157.
- Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö. I., Kocacaliskan, I., Şakiroğlu, H. (1995). Polyphenol oxidase from Amasya apple. *Journal of Food Science*, 60: 495-499.
- Packer L. (2001). *Flavonoids and other polyphenols*. Ed Academic Press, California, 483 p.
- Patnaik, PR. (2002). Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 198-200. polyphenol oxidase. *Turk J Chem*. 28: 547-557. Portabella mushrooms. *Phytochemistry*, 65: 671-678.
- Park E.Y., Luh B.H. (1985). Polyphenol oxidase of kiwi fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 678-684.
- Prabha T. N. And Patwardhan M. V. (1982). Purification and properties of polyphenoloxidase of mango peel (*Mangifera indica*). *J. Biosci.*, Vol. 4, Number 1, March 1982, pp. 69-78.
- Qiu L, Chen QH, Zhuang JX, et al. Inhibitory effects of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chem* 2009; 112: 609-13.
- Raymond, J., Rakariyatham, N. et Azanza, J. L. (1993). Purification et quelques propriétés de la polyphénol oxydase à partir de graines de tournesol. *Phytochemistry*, 34 : 927-931.
- Riedacker A. (1990). *Physiologie des arbres et arbustes en zone aride*, Ed .J. Libbey, Paris. 323-327 p.
- Rodriguez-Lopez J. N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem*. 267: 3801-3810
- Rolle, R.S., Guizani, N., Chen, J.S., Marshall, M.R., Yang, J.S. and Wei, C.I. (1991). Purification and characterization of phenoloxidase isoforms from Taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Biochem*. 15: 17-32.

- Sachde A. G., Al-Bakir' A. Y. and Abdul-Raheem J. A. K. (1989). Polyphenol oxidase from barhee and zahdi dates .ii. Characterization. *Journal of Food Biochemistry* 12, 241-251.
- Sawaya, W. N., Khalil, J. K., Khatchadourian, H. A., Safi, W. M., & Mashadi, A. S. (1983). Sugars, tannins and some vitamins contents of twentyfive date cultivars grown in Saudi Arabia at the khalal (mature color) and tamer (ripe) stages. In *The first symposium on the date palm*. King Fayçal University Al Hassan Kigdom of Saudi Arabia (pp. 468-478).
- Shi, C., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y., and Liu, Q. (2001). The Purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotianatabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 381a-381h.
- Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C., (200). Phenolic compounds and related enzymes as
- Tortoe, C., Orchard, J., & Beezer, A. (2007). Prevention of enzymatic browning of apple cylinders using different solutions. *International journal of food science & technology*, 42(12), 1475-1481.
- Toutain G. (1972). Les maladies du palmier dattier et sa fusariose vasculaire. Ed. F.A.O, Rome : 21 – 28.
- Valero E., Varon R., and Garcia-Carmora F. (2002). Tyrosinase-Mediated Oxidation of Acetaminophen to 4-Acetamido-o-Benzoquinone. *Bio. Chem.* Vol 383, pp 1931-1939.
- Vámos-Vigyázó, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Vandercook, C.E., Hasegawa, S. & Maier, V.P. (1980). Dates. Dans: Nagy, S. & Shaw P.E. (Eds.). *Tropical and Subtropical Fruits*. AVI Publishing Co, Westport, Connecticut, pp.506–541.
- Varoquaux, P. (1978). Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricusbisporus*). Thèse Univ. de Dijon, 134 p.

- Vaughn K. C., Duke S. O. (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112
- Vémos-Vigyâzô, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Wang, J., Jiang, W., Wang, B., Liu, S., Gong, Z., and Luo, Y. (2007). Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tainong") pulp. *Journal of Food Biochemistry.* 31: 45–55.
- Waite J.H. (1976). Calculating Extinction Coefficient for Enzymatically Produced o-Quinones. *Analytical Biochemistry.* 75, 211-218.
- Wesche - Ebeling, P. , et Montgomery , MW (1990). Polyphénol oxydase de fraise: son rôle dans la dégradation des anthocyanines. *J. Food Sci.* 55 : 731-734
- Whitaker J., Lee C. Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention.* J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society: 2-7.
- Wilson, K., Walker, J. (1996). *Practical biochemistry principles and techniques.* Fourth Edition.
- Xu, J; Zheng, T; Meguro, S. (2004). Purification and characterization of polyphenol
- Yagar H., Sagioglu A. (2002). Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince. *Turk J Chem* 26, 97 - 103.
- Yemenicioğlu, A. (2002). Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.
- Yemenicioğlu, A., Cemeroğlu, B. (2003). Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J. Agric. Food chem.* 51: 2371-2379.

- Yoruk, R., Marshall, MR. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*. 27: 361-422.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. (1991). Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- Ziyan, E., Pekyardimci, S. (2004). Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*)

# Annexes

## [Annexe 1]

A. Dénomination des différents stades de maturation des dattes Deglet Nour (Reyenes, 1997).

Stade	I	II	III	IV	V
(a)	Loullou	Kh'lal	Bser	Martouba	Tmar
(b)	Hababouk	Kimri	Kalal	Routab	Tmar
Couleur	Vert	Vert	Jaune orange	Orange brun	Blond
Taille	Petit	Moyenne	Complète	Complète	Complète

(a) Suivant la nomenclature Algérienne

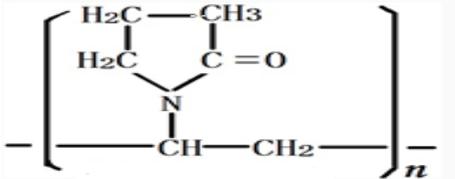
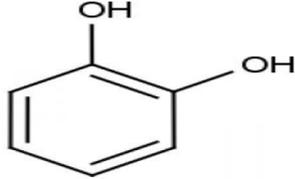
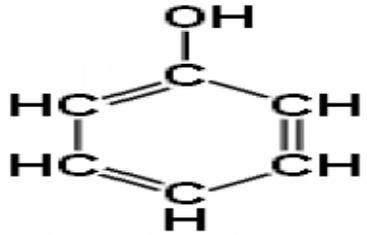
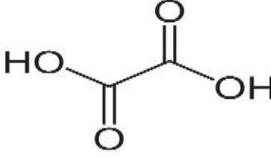
(b) Suivant la nomenclature Irakienne

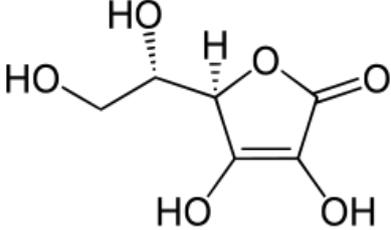
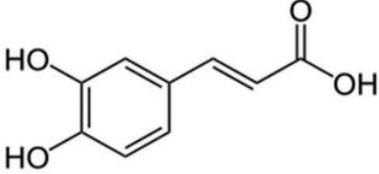
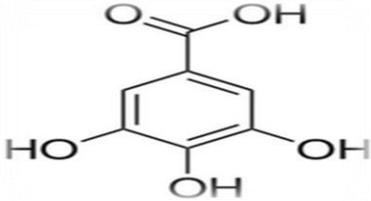
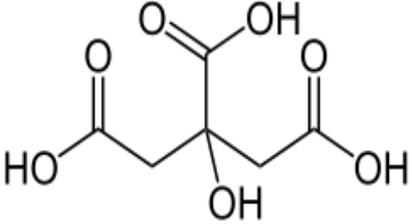
B. Fournisseur et type des appareils utilisés au cours de l'expérimentation

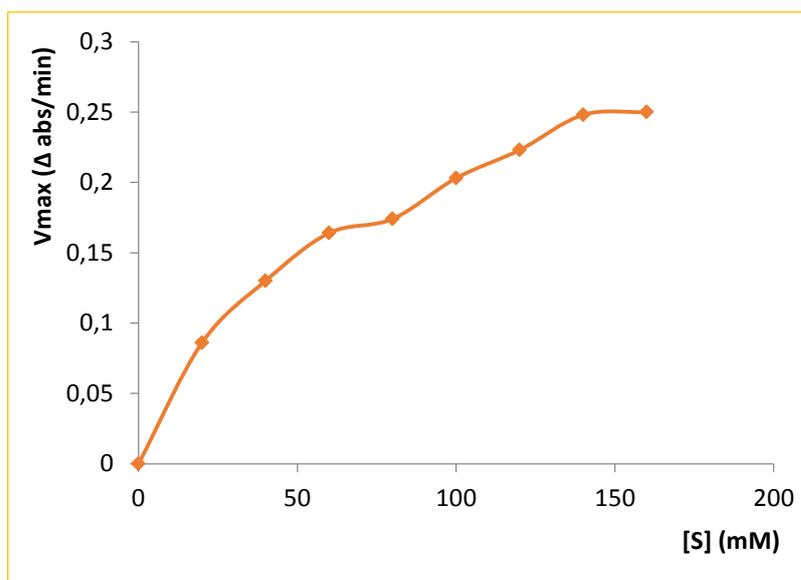
Appareil	Fournisseur	Type
Centrifugeuse	Cenrifugeuse	N° série 215862
Bain Marin	Jisico .J-BAS8	N°série 1005-5
Spectrophotomètre	SpectroScan 40	N° série 12400674

## [Annexe 2]

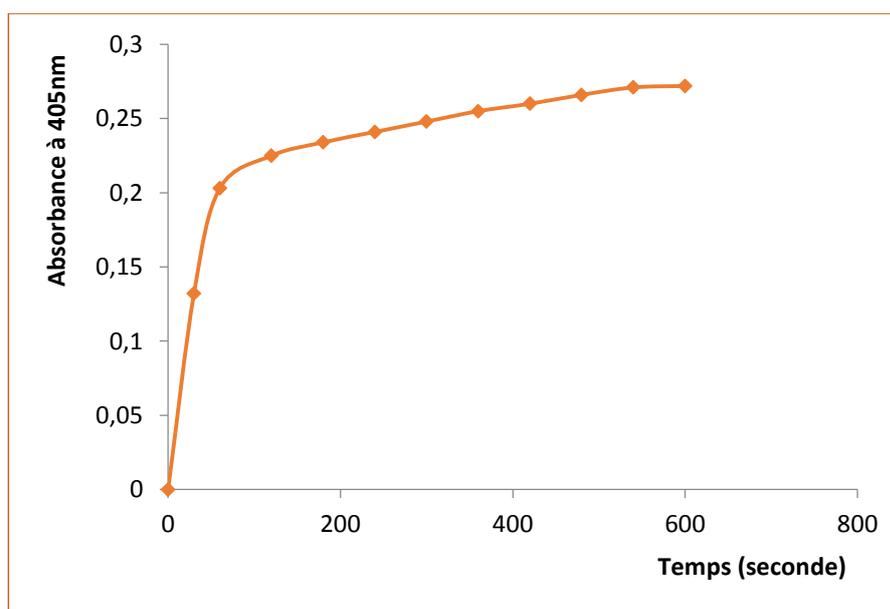
## A. Les composés chimiques et leurs structures

Les composés chimiques	La formule brute	La structure chimique
<b>Polyvinylpyrrolidone</b>  <b>PVP</b>	$(C_6H_9NO)_n$	
<b>Pyrocatéchol</b>	$C_6H_6O_2$	
<b>Phénol</b>	$C_6H_6O$	
<b>Acide oxalique</b>	$C_2H_2O_4$	

<b>Acide ascorbique</b>	$C_6H_8O_6$	
<b>Acide caféique</b>	$C_9H_8O_4$	
<b>Acide gallique</b>	$C_7H_6O_5$	
<b>Acide citrique</b>	$C_6H_8O_7$	



B. La cinétique enzymatique de la PPO de dattes Deglet Nour.



C. Détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol par la PPO.