



**HAL**  
open science

# Recherches sur l'inhibition du brunissement enzymatique : utilisation de préparations enzymatiques, substituts aux sulfites

D. de Rigal

► **To cite this version:**

D. de Rigal. Recherches sur l'inhibition du brunissement enzymatique : utilisation de préparations enzymatiques, substituts aux sulfites. Ingénierie des aliments. Université Paul Cézanne (Aix Marseille 3), 2001. Français. NNT : . tel-02834222

**HAL Id: tel-02834222**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02834222>**

Submitted on 7 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de droit, d'économie et des sciences D'AIX-MARSEILLE III

TITRE :

**RECHERCHES SUR L'INHIBITION DU BRUNISSEMENT  
ENZYMATIQUE : UTILISATION DE PREPARATIONS  
ENZYMATIQUES, SUBSTITUTS AUX SULFITES.**

THESE

Pour obtenir le grade de :

*DOCTEUR de l'université de droit, d'économie et des sciences D'AIX-MARSEILLE III*  
*Discipline : Biochimie*

présentée et soutenue publiquement

par

***David de RIGAL***

le 16 mai 2001

---

***Directeur de thèse Mr Guy Albagnac***

---

**JURY**

Monsieur A. PUIGSERVER

Monsieur J. NICOLAS

Monsieur J.L. CUQ

Monsieur G. ALBAGNAC

Madame F. FORGET-RICHARD

Monsieur P. VAROQUAUX

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

## **REMERCIEMENTS**

*Les recherches exposées dans ce mémoire ont été menées à la Station de Technologie des Produits végétaux de l'INRA de Montfavet, au sein du laboratoire des métabolites secondaires, sous la direction de Monsieur ALBAGNAC, directeur de recherches à l'INRA.*

*J'exprime toute ma gratitude à Monsieur PUIGSERVER, Professeur à l'université d'Aix-Marseille III, de l'honneur qu'il me fait de présider cette thèse.*

*Je remercie Monsieur NICOLAS, Professeur au Conservatoire National des Arts et Métiers et Monsieur CUQ, Directeur de l'ISIM, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire et leur suis particulièrement reconnaissant de l'intérêt qu'ils lui ont accordé.*

*Je remercie également Monsieur Patrick VAROQUAUX, Directeur de Recherches à l'INRA et Madame Florence RICHARD-FORGET, Chargé de Recherches à l'INRA pour leur appui scientifique et l'attention qu'ils m'ont prodigué durant ces quatre années.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur DEBRAUWER, Chargé de Recherches à l'INRA, et à Monsieur GANCET, Directeur de Recherches à ELF ATOCHEM, pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté dans la détermination de structures par spectrométrie de masse et RMN.*

*Je remercie également Mademoiselle LE HESRAN, Responsable Qualité à FRUIDOR S.A. « Les Crudettes », pour avoir mis à ma disposition le matériel végétal nécessaire pour ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à Madame VAROQUAUX et Monsieur GAUILLARD pour leurs conseils, et qui ont accepté de relire ce mémoire.*

*Mes remerciements les plus sincères vont à Monsieur RELING et à Muriel CERNY pour leur précieuse aide technique ainsi qu'à Madame PUEYO.*

*Enfin, un grand merci à tous les membres de la Station qui, par leur sympathie, ont rendu mon séjour à l'INRA de Montfavet des plus agréables.*

## **PUBLICATIONS**

de Rigal D., Cerny M., Richard-Forget F., Varoquaux P., Inhibition of endive (*Cichorium endiva* L.) polyphenoloxidase by carica papaya protein preparation, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2001, sous presse.

de Rigal D., Chevalier T., Mbéguié-A-Mbéguié D., Gaillard F., Richard-Forget F., Fils-Lycaon B., Molecular cloning and characterization of Apricot polyphenol oxidase, *Plant Physiol.*, 1999, Vol.119, pp 1261-1269.

## **POSTER**

de Rigal D. P., Antibrowning efficiency of papaine extracts, Journées Ecole Doctorale, Marseille-Luminy, 10-11 juin 1999.

# TABLE DES MATIERES

## LISTE DES ABREVIATIONS

*Avant-propos* 1

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1. LE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE.</b>	2
1.1. CARACTERES GENERAUX DES POLYPHENOLOXYDASES.	2
<b>1.1.1. Définition.</b>	2
<b>1.1.2. Etudes structurales.</b>	4
<b>1.1.3. Mécanisme réactionnel.</b>	10
<b>1.1.4. Mécanismes de maturation et d'activation des polyphénoloxydases.</b>	10
<b>1.1.5. Spécificité des polyphénoloxydases et phénols substrats naturels.</b>	13
<b>1.1.6. Effet du pH sur l'activité polyphénoloxydasique.</b>	15
<b>1.1.7. Localisation tissulaire et subcellulaire des polyphénoloxydases.</b>	15
<b>1.1.8. Rôle physiologique des polyphénoloxydases</b>	16
<b>1.1.9. Purification de l'activité polyphénoloxydasique.</b>	17
1.2. REACTIONS SECONDAIRES.	19
<b>2. PREVENTION DU BRUNISSEMENT.</b>	19
2.1. CAS DES SULFITES.	20
<b>2.1.1. Efficacité des traitements.</b>	20
<b>2.1.2. Problèmes de toxicité et réglementation.</b>	21
2.2. PRINCIPAUX INHIBITEURS CHIMIQUES DU BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE.	22
<b>2.2.1. Inhibiteurs agissant sur les substrats des polyphénoloxydases.</b>	23
<b>2.2.2. Traitements chimiques agissant sur l'enzyme.</b>	25
<b>2.2.2.1. Composés chélateurs d'ions métalliques.</b>	25
<b>2.2.2.2. Agents acidifiants.</b>	27
<b>2.2.2.3. Inhibiteurs agissant sur le site de fixation du substrat phénolique.</b>	27
<b>2.2.2.4. Inhibiteurs agissant sur des sites autres que le site de fixation du substrat phénolique.</b>	29
<b>2.2.3. Traitements chimiques agissant sur les produits d'oxydation.</b>	31
2.3. INHIBITION DU BRUNISSEMENT PAR DES EXTRAITS D'ORIGINE NATURELLE.	33
2.4. INHIBITION DU BRUNISSEMENT PAR DES PREPARATIONS	

ENZYMATIQUES.	34
<b>2.4.1. Préparations de protéases.</b>	34
2.4.1.1. <i>La ficine.</i>	34
2.4.1.2. <i>La bromélaïne.</i>	35
2.4.1.3. <i>L'actinidine.</i>	35
2.4.1.4. <i>La papaïne.</i>	36
<b>2.4.2. Autres enzymes.</b>	38
2.4.2.1. <i>L'o-méthyl transférase.</i>	38
2.4.2.2. <i>Les quinones isomérases.</i>	38
2.4.2.3. <i>Les dioxygénases.</i>	40
2.4.2.4. <i>L'hydroxycinnamoyl quinate estérase.</i>	40
<b>2.5. NOUVELLES METHODES PHYSIQUES DE PREVENTION DU BRUNISSEMENT.</b>	41

## **MATERIELS ET METHODES**

### **1. PURIFICATION PARTIELLE DES DIFFERENTS SYSTEMES**

<b>ENZYMATIQUES.</b>	44
1.1. MATERIELS.	44
1.2. DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHENOLOXYDASIQUE.	44
1.3. DOSAGE DES PROTEINES.	45
1.4. EXTRACTION DES SYSTEMES POLYPHENOLOXYDASIQUES.	45
1.5. PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.	46
1.5.1. <b>Cas de l'abricot et de la pomme.</b>	46
1.5.2. <b>Cas de la scarole.</b>	46
1.5.3. <b>Cas du champignon de Paris.</b>	47
1.6. CHROMATOGRAPHIES D'INTERACTIONS HYDROPHOBES.	47
1.6.1. <b>Cas de l'abricot.</b>	47
1.6.2. <b>Cas de la pomme.</b>	48
<b>2. INHIBITION DU BRUNISSEMENT PAR UNE PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE.</b>	48
2.1. EFFET SUR LE BRUNISSEMENT DE BROYATS.	48
2.2. PURIFICATION DES COMPOSES INACTIVATEURS DE LA PPO CONTENUS DANS L'EXTRAIT DE PAPAINE.	50

2.2.1. Mesure du pouvoir inactivateur des extraits de papaine.	50
2.2.2. Dosage des composés piègeurs de quinones.	50
2.2.3. Homogénéisation.	51
2.2.4. Chromatographie d'exclusion.	51
2.2.5. Chromatographie d'échange d'anions	51
2.2.6. Séparation sur cartouche Sep-Pak.	52
2.2.7. Séparation sur colonne HPLC semi-préparative.	52
2.3. ANALYSES DES FRACTIONS INACTIVATRICES.	53
2.3.1. Tests chimiques.	53
2.3.1.1. Test à la ninhydrine.	53
2.3.1.2. Test d'Ellman.	53
2.3.1.3. Test au ferricyanure de potassium et chlorure ferrique.	53
2.3.1.4. Test de Schweppe.	53
2.3.2. Analyses HLPC.	54
2.3.3. Analyse Infra-Rouge.	54
2.3.4. Analyses HPLC/MS-MS.	54
2.3.5. Analyse RMN.	55
3. INHIBITION DU BRUNISSEMENT PAR UN EXTRAIT D'HCQE.	55
3.1. DOSAGE DES DIFFERENTES ACTIVITES ENZYMATIQUES.	55
3.1.1. Polygalacturonases et pectine méthyl estérases.	55
3.1.2. HCQE.	56
3.2. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION.	56
3.3. CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTIONS HYDROPHOBES.	56

## RESULTATS ET DISCUSSION

1. PURIFICATION PARTIELLE DES SYSTEMES POLYPHENOLOXYDASIQUES.	58
1.1. CONDITIONS DE DOSAGE DES DIFFERENTS EXTRAITS ENZYMATIQUES.	58
1.2. PREPARATION DES DIFFERENTS EXTRAITS ENZYMATIQUES.	59
1.2.1. PPO d'abricot.	59
1.2.1.1. Extraction.	59
1.2.1.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium.	61
1.2.1.3. Dialyse.	61
1.2.1.4. Chromatographie d'interactions hydrophobes.	61

1.2.1.5. <i>Bilan de purification.</i>	61
1.2.2. <b>PPO de pomme.</b>	63
1.2.3. <b>PPO de scarole.</b>	63
1.2.4. <b>Tyrosinase de champignon.</b>	64
<b>2. INHIBITION DU BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE PAR UNE PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE.</b>	66
2.1. EFFET D'UN EXTRAIT DE PAPAINE SUR LE BRUNISSEMENT DE COUPES DE POMME, DE CHAMPIGNON ET DE SCAROLE.	66
2.2. EFFET D'UN EXTRAIT DE PAPAINE SUR LE BRUNISSEMENT DE BROYATS DE FRUITS ET LEGUMES.	69
2.3. EFFET DE LA PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE SUR LA PPO DE SCAROLE.	73
2.4. EFFET DE DIFFERENTES PREPARATIONS PROTEOLYTIQUES SUR LA PPO DE SCAROLE.	75
2.5. INFLUENCE DE L'EXTRAIT DE PAPAINE SUR DIFFERENTS EXTRAITS POLYPHENOLOXYDASIQUES.	77
2.6. PURIFICATION DES COMPOSES RESPONSABLES DE L'INACTIVATION DE LA PPO PRESENTS DANS LA PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE.	79
2.6.1. <b>Chromatographie d'exclusion.</b>	79
2.6.2. <b>Chromatographie échangeuse d'anions.</b>	81
2.6.3. <b>Bilan de purification.</b>	82
2.6.3.1. <i>Rendement de purification.</i>	82
2.6.3.2. <i>Analyse HPLC des fractions obtenues au cours de la purification.</i>	84
2.6.4. <b>HPLC semi-préparative.</b>	86
2.6.5. <b>Séparation sur cartouche Sep-Pak.</b>	88
2.7. ETUDE DU MECANISME D'INACTIVATION DE LA PPO DE SCAROLE PAR LES COMPOSES PRESENTS DANS LA PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE.	93
2.7.1. <b>Effet inhibiteur vis-à-vis de l'activité polyphénoloxydasique de scarole.</b>	93
2.7.2. <b>Mécanisme de l'inactivation de la polyphénoloxydase de scarole.</b>	97
2.7.2.1 <i>Influence de la concentration en agent inactivateur.</i>	97

2.7.2.2. <i>Influence de la quantité de PPO présente initialement dans le milieu réactionnel.</i>	97
2.7.2.3. <i>Influence du pH du milieu réactionnel.</i>	100
2.7.3. <b>Effet d'un traitement thermique de la préparation sur l'efficacité inactivatrice.</b>	102
2.7.4. <b>Réversibilité de l'inactivation de la PPO de scarole.</b>	102
2.7.4.1. <i>Après dialyse.</i>	102
2.7.4.2. <i>Effet de l'ajout de sulfate de cuivre après inactivation de la PPO de scarole.</i>	104
2.7.4.3. <i>Séparation des composés inactivateurs par chromatographie de chélation de métaux.</i>	105
2.8. <b>IDENTIFICATION DES AGENTS INACTIVATEURS PRESENTS DANS LA PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE.</b>	107
2.8.1. <b>Tests chimiques.</b>	107
2.8.2. <b>Analyse du spectre ultra violet.</b>	109
2.8.3. <b>Analyse du spectre infra-rouge.</b>	109
2.8.4. <b>Analyse LC/MS-MS.</b>	111
2.8.4.1. <i>Détermination des pics à analyser en spectrométrie de masse.</i>	113
2.8.4.2. <i>Analyse en mode positif.</i>	113
2.8.4.3. <i>Analyse en mode négatif.</i>	115
2.8.5. <b>Analyse RMN <sup>1</sup>H.</b>	119
2.8.6. <b>Discussion</b>	122
2.9. <b>LA PAPAIE CONTIENT-ELLE DES SUBSTANCES INACTIVATRICES ?</b>	125
2.9.1. <b>Détermination du pouvoir inactivateur du jus et du latex de papaye.</b>	125
2.9.2. <b>Détermination de la masse moléculaire apparente des agents inactivateurs présents dans le jus et le latex de papaye.</b>	127
3. <b>INHIBITION DE L'ACTIVITE PPO PAR ADDITION D'HCQE DANS LE MILIEU REACTIONNEL.</b>	127
3.1. <b>INHIBITION DE LA PPO PAR L'HCQE.</b>	129
3.2. <b>PURIFICATION DE L'ACTIVITE HCQE.</b>	129
3.2.1. <b>Choix de la source d'HCQE.</b>	129
3.2.2. <b>Optimisation des conditions de dosage de l'activité HCQE.</b>	131
3.2.2.1. <i>Reproductibilité de la méthode HPLC.</i>	132
3.2.2.2. <i>Concentration en acide chlorogénique.</i>	132

3.2.2.3. <i>Température du milieu réactionnel.</i>	134
3.2.2.4. <i>pH du milieu réactionnel.</i>	134
3.2.2.5. <i>Durée de l'incubation.</i>	134
3.2.2.6. <i>Limite de proportionnalité de la méthode de dosage.</i>	136
3.2.3. <b>Chromatographie d'exclusion.</b>	136
3.2.4. <b>Chromatographie d'interactions hydrophobes.</b>	138
3.2.5. <b>Bilan de purification.</b>	138
3.3. INFLUENCE DE L'HCQE SUR L'OXYDATION DE L'ACIDE CHLOROGENIQUE PAR LA PPO D'ABRICOT.	141
3.3.1. <b>Détermination des constantes cinétiques de l'HCQE et de la PPO d'abricot.</b>	143
3.3.1.1. <i>Influence du pH sur les constantes cinétiques de l'HCQE.</i>	143
3.3.1.2. <i>Influence du pH sur les constantes cinétiques de la PPO d'abricot.</i>	146
3.3.2. <b>Oxydation de mélanges d'acides chlorogénique et caféique par la PPO d'abricot.</b>	147
3.3.3. <b>Influence du pH sur l'inhibition de l'activité PPO par l'HCQE.</b>	151
3.3.4. <b>Composition phénolique des milieux réactionnels.</b>	153
3.4. EFFET DE L'ADDITION D'HCQE SUR LE BRUNISSEMENT DE BROYATS D'ABRICOT.	150
 <b>CONCLUSION</b>	 162
 BIBLIOGRAPHIE	 167
LISTE DES TABLEAUX	187
LISTE DES FIGURES	188

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**CF** : acide caféique  
**CG** : acide chlorogénique  
**DEAE** : diéthylaminoéthyl  
**EB** : extrait brut  
**HCQE** : hydroxycinnamoyl quinate estérase  
**HPLC** : chromatographie liquide haute performance  
**PPO** : polyphénoloxydase  
**PVPP** : polyvinylpolypyrrolidone  
**RMN** : résonance magnétique nucléaire  
**UV** : ultra-violet  
**4MC** : 4-méthylcatéchol

## ***Avant-propos.***

*Ce travail s'inscrit dans la recherche d'inhibiteurs du brunissement enzymatique des fruits et légumes frais ou transformés et plus particulièrement dans la recherche de préparations commerciales d'enzymes capables d'inhiber le brunissement. La première préparation étudiée est un extrait de papaïne, dont l'efficacité anti-brunissement a été décrite dans la bibliographie. Il a été montré que cette préparation contient des composés piègeurs de quinones qui ont été précisément caractérisés. La bibliographie indiquait également que cette préparation est responsable d'une inactivation des polyphénoloxydases. Un premier volet de cette étude consistera à vérifier la présence de ce pouvoir inactivateur puis à identifier les composés inactivateurs. Le second extrait étudié est une préparation d'enzymes pectinolytiques riche en hydroxycinnamoyl estérase. Cette dernière activité enzymatique serait capable de limiter l'oxydation phénolique catalysée par les polyphénoloxydases. Le deuxième volet de notre travail consistera donc à séparer cette enzyme des activités pectinolytiques puis à déterminer dans quelles conditions se produit cette inhibition.*

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## **1. LE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE.**

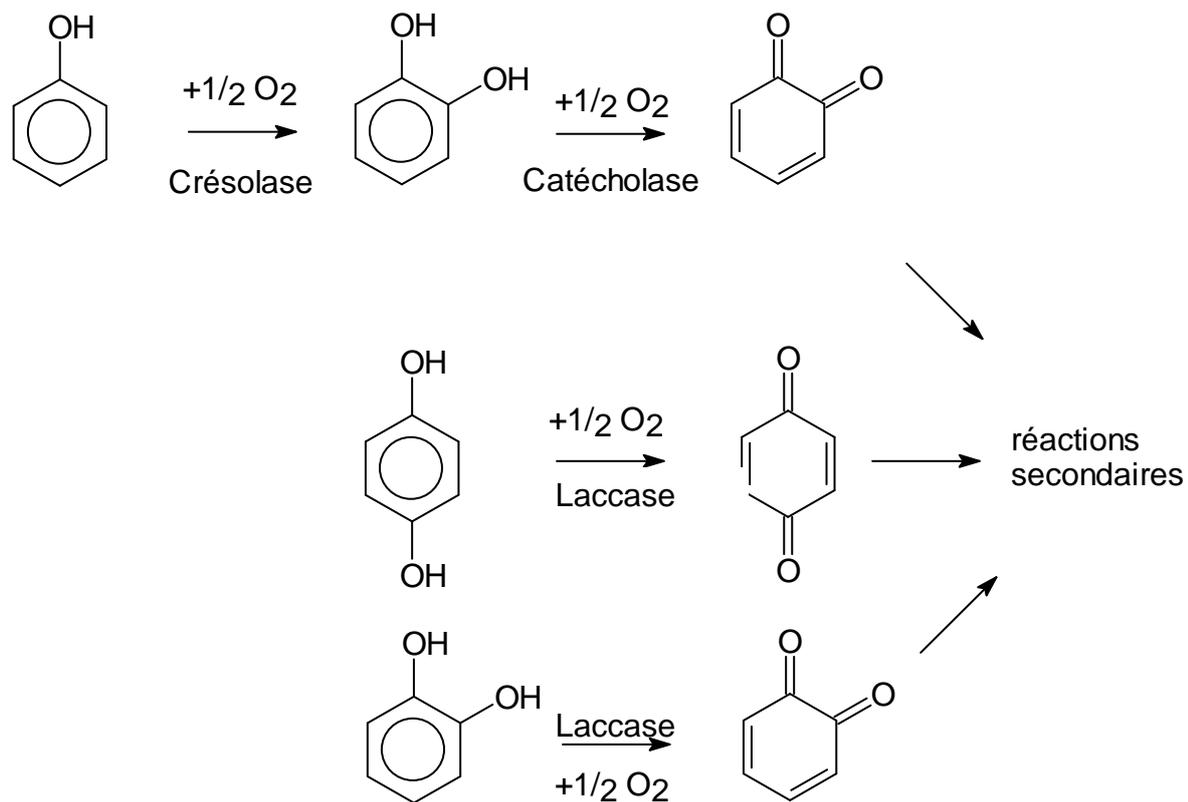
Sous ce terme se regroupent les phénomènes concernant l'apparition de colorations brunes consécutives à des altérations des fruits ou légumes, à la suite de traitements mécaniques (récolte, manutention lors du transport et du stockage, pelage, découpe) ou technologiques (conservation au froid, congélation-décongélation, irradiation), ou encore naturels (infection fongique). Le brunissement enzymatique est dû à une oxydation, catalysée par les polyphénoloxydases, des composés phénoliques endogènes par l'oxygène moléculaire où les premiers produits de réaction sont les quinones. Les peroxydases sont également capables de catalyser la réaction, mais à un degré moindre. Les quinones se condensent ensuite rapidement pour former des polymères bruns ou noirs de haute masse moléculaire. Ces phénomènes n'apparaissent cependant qu'après une décompartmentation cellulaire, permettant alors la mise en contact du substrat phénolique (vacuolaire) et du système enzymatique (lié aux membranes plastidiales).

### **1.1. CARACTERES GENERAUX DES POLYPHENOLOXYDASES.**

#### **1.1.1. Définition.**

Les polyphénoloxydases appartiennent au groupe des oxydoréductases à deux atomes de cuivre. Elles catalysent l'oxydation des composés phénoliques en présence d'oxygène moléculaire (figure 1). Désignée originellement sous le code EC 1.14.18.1 par la Commission Internationale sur les Enzymes, cette classe d'enzymes est divisée depuis peu en deux sous-groupes avec, comme critère de différenciation, la spécificité vis-à-vis des substrats phénoliques (WALKER et FERRAR, 1998).

- Les laccases (EC 1.10.3.2) catalysent l'oxydation aussi bien d'*o*- que de *p*-diphénols. Les laccases sont secrétées en abondance par les champignons au cours de leur croissance (PERRY *et al.*, 1993). Cette activité est absente chez les fruits et légumes, bien qu'elle ait été détectée chez la pêche (HAREL *et al.*, 1970) et l'abricot (DIJKSTRA et WALKER, 1991), vraisemblablement suite à une contamination bactérienne.
- On attribue deux types d'activités aux catécholoxydases. L'activité crésolasique, renommée monophénol monooxygénase (EC 1.14.18.1), est capable d'hydroxyler les monophénols en *o*-diphénols qui sont alors oxydés en *o*-quinones. L'activité crésolasique est depuis longtemps connue chez les champignons (VAROQUAUX, 1978), mais a été détectée plus récemment



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

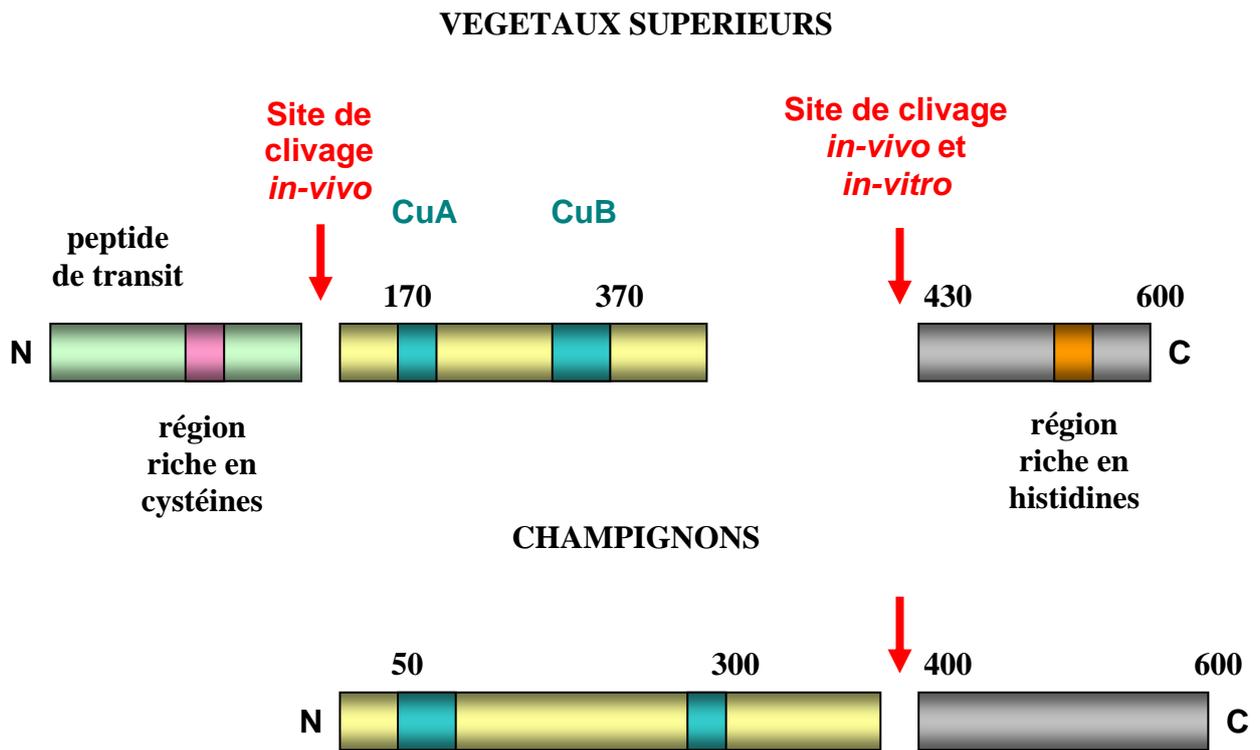
chez la pomme de terre, la pêche, le raisin, la pomme, l'avocat ou la salade (NICOLAS *et al.*, 1994 ; ESPIN *et al.*, 1995 et 1997). Cette activité est souvent perdue au cours de la purification de l'enzyme. L'activité catécholase (EC 1.10.3.1) catalyse l'oxydation d'*o*-diphénols en *o*-quinones.

MATHEW et PARPIA (1971) et NICOLAS *et al.* (1994) donnent à l'activité catécholasique le rôle prédominant dans le brunissement enzymatique des fruits et légumes, la plupart des substrats naturels étant des *o*-diphénols. Dans un souci de simplification, nous utiliserons tout au long de notre exposé la dénomination polyphénoloxydase (PPO) pour l'activité catécholase extraite des végétaux, et la dénomination tyrosinase pour les polyphénoloxydases d'origine fongique qui portent les activités crésolasiques et catécholasiques (VAROQUAUX, 1978).

### **1.1.2. Etudes structurales.**

Les données concernant la taille des polyphénoloxydases sont anciennes et nombreuses, mais elles restent parfois contradictoires du fait de conditions d'extraction diverses (SMITH et MONTGOMERY, 1985). Les masses moléculaires apparentes des polyphénoloxydases, déterminées généralement par des techniques de chromatographie d'exclusion ou d'électrophorèse dénaturante, sont comprises entre 12 et 400 kDa (ZAWISTOWSKI *et al.*, 1991). Ces différences de taille s'expliquent notamment par l'existence de formes polymériques de l'enzyme, pouvant aller du monomère, comme ceci est le cas pour la PPO des graines de tournesol (RAYMOND *et al.*, 1993), à la forme tétramérique comme ceci est le cas pour la tyrosinase de champignon (STROTHKAMP *et al.*, 1976). Les auteurs s'accordent pour donner une masse moléculaire apparente voisine de 40 à 45 kDa pour les formes monomériques.

FUJITA *et al.* (1991) ont estimé la masse moléculaire apparente des PPO de salade à 56 kDa. Depuis lors, plusieurs formes de PPO isolées de salade, réparties inégalement selon les tissus, ont été caractérisées. La laitue renferme majoritairement des formes tétramériques ayant une masse moléculaire allant de 136 à 150 kDa ainsi que des formes monomériques minoritaires (40 et 46 kDa) présentes uniquement dans les tissus vascularisés (HEIMDAL *et al.*, 1994). Les feuilles de scarole contiennent principalement une forme tétramérique de 120 kDa et une forme monomérique de 42 kDa (GOUPY *et al.*, 1994). La masse moléculaire apparente des formes actives des PPO d'abricot varie de 60 à 63 kDa d'une variété à l'autre (FRAIGNIER *et al.*, 1995 ; CHEVALIER *et al.*, 1999). Dans le cas de la pomme, les auteurs distinguent généralement deux formes actives de PPO. La première a une masse moléculaire apparente comprise entre 42 et 46 kDa selon les variétés (GOODENOUGH *et al.*, 1983 ; JANOVITZ-KLAPP *et al.*, 1989 ; MARQUES *et al.*, 1995a et b).



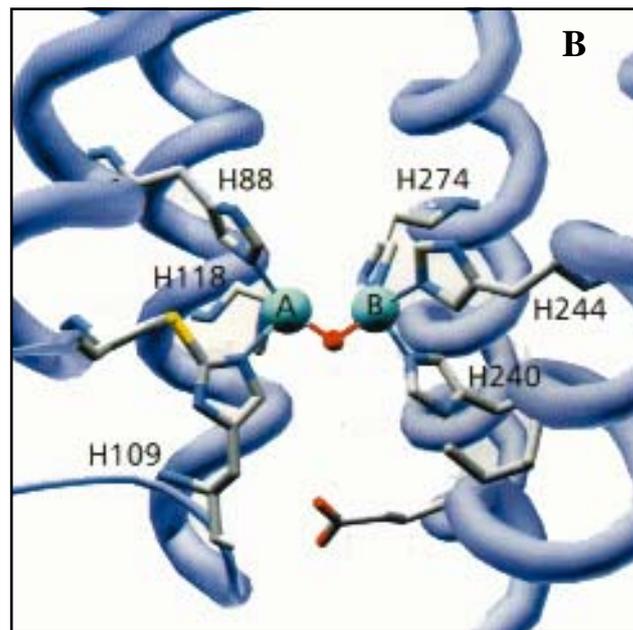
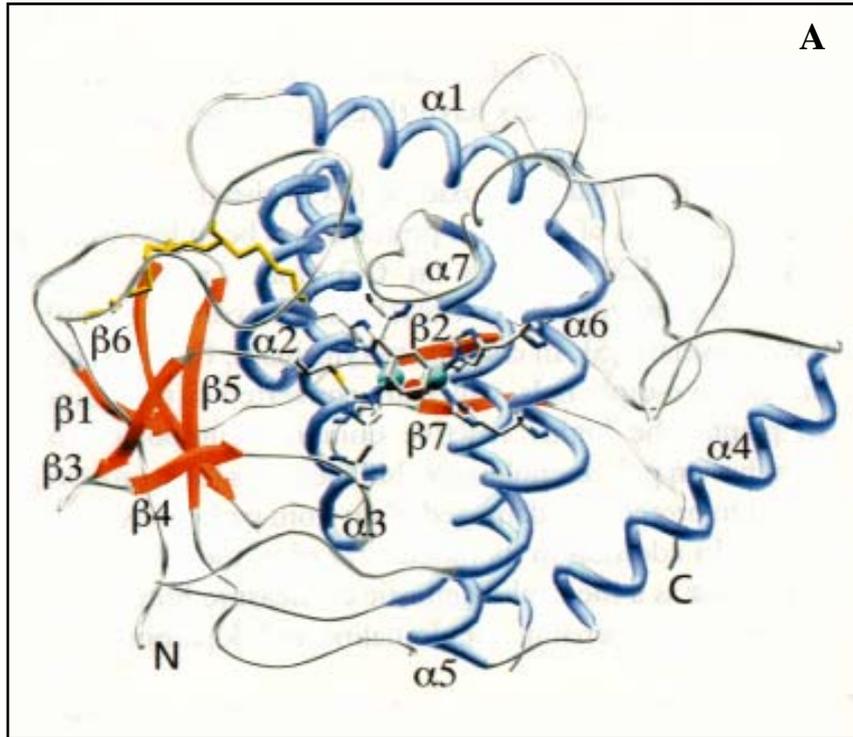
**Figure 2 :** Domaines des polyphénoloxydases des végétaux supérieurs et des tyrosinases de champignons. Leur structure est déduite des séquences des ADN complémentaires (d'après VAN GELDER et al., 1997).

La deuxième forme active signalée a une masse moléculaire apparente comprise entre 23 et 27 kDa. Cette dernière forme serait le résultat d'une protéolyse partielle de la forme mature.

Les points isoélectriques des PPO des quatre espèces qui feront l'objet de notre étude (abricot, pomme, scarole et champignon de Paris) ont été déterminés par isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide ou en veine liquide. Les pommes de variété Red Delicious présentent deux isoformes majeures de pHi 4,8 et 5 et une isoforme mineure de pHi 6,5 (JANOVITZ-KLAPP, 1989). Dans le cas de la scarole, deux isoformes majeures de 120 kDa ont des pHi de 4,5 et 5,5. Une troisième forme (46 kDa) a un pHi de 8 (GOUPY *et al.*, 1994). Chez l'abricot, quatre isoformes ont été mises en évidence au laboratoire ; une majeure ayant un pHi de 4,6 et trois mineures de pHi 3,8, 4,3 et 4,9 (CHEVALIER *et al.*, 1999). Enfin, de nombreux auteurs ont mis en évidence deux isoformes pour la tyrosinase de champignon, ayant des pHi de 4,5 et 5,5 (MOORE et FLURKEY, 1988 ; FLURKEY, 1991 ; GERRISTEN *et al.*, 1994).

Au cours de ces dix dernières années, la mise en œuvre de techniques de biologie moléculaire associées à des analyses cristallographiques a permis de préciser les informations sur la structure des PPO. La structure primaire de l'enzyme peut être déduite de la séquence de l'ARN messager codant pour l'enzyme. Si les séquences d'ADN complémentaires des PPO de feuilles de végétaux, tels que les feuilles de haricot (CARY *et al.*, 1992), de tomate (SHAHAR *et al.*, 1992) et de tubercule de pomme de terre (HUNT *et al.*, 1993) sont connues, peu d'études ont été réalisées sur les PPO de fruits. A ce jour, seuls les ADN complémentaires de PPO de raisin (DRY et ROBINSON, 1994), de pomme (BOSS *et al.*, 1995 ; MURATA, 1997) et d'abricot (CHEVALIER *et al.*, 1999) ont été clonés. L'ADN complémentaire de la tyrosinase d'*Agaricus bisporus* a été cloné dès 1995 par WICHERS *et al.* Ainsi, les auteurs ont observé que le nombre d'acides aminés des formes monomériques des PPO matures variait de 360 (haricot) à 496 (abricot), 569 (champignon de Paris) et 593 résidus (pomme). Les domaines structuraux de polyphénoloxydases des végétaux supérieurs et fongiques sont schématisés figure 2. Les séquences présentent trois domaines chez les végétaux supérieurs (deux chez les champignons) ayant un degré d'homologie plus ou moins élevé entre espèces (VAN GELDER *et al.*, 1997).

Le premier domaine se trouve dans la région N-terminale des PPO de végétaux supérieurs ; il correspond à un peptide de transit (MURATA, 1997 ; CHEVALIER *et al.*, 1999). Ce peptide, de 87 à 247 acides aminés selon les espèces, permettrait de diriger la PPO immature vers les thylacoïdes. Généralement, ce domaine contient trois régions. La première est constituée d'une séquence riche en groupements hydroxyles qui interviendrait directement dans les mécanismes liés au transit. Suit une



**Figure 3 :** Représentation « en ruban » de la polyphénoloxydase de tubercule de pomme de terre obtenue par cristallographie aux rayons X (d'après EICKEN *et al.*, 1999). Les atomes sont colorés en gris pour le carbone, bleu pour l'azote, jaune pour le soufre, rouge pour l'oxygène et bleu turquoise pour le cuivre.

**Figure 3A :** Vue de la protéine entière ; deux ponts dissulfures présents dans la région N-terminale de l'enzyme sont représentés en jaune, les feuilletts  $\beta$  en orange et les hélices  $\alpha$  en bleu.

**Figure 3B :** site actif de l'enzyme ; chaque atome de cuivre est lié à trois résidus histidines numérotés.

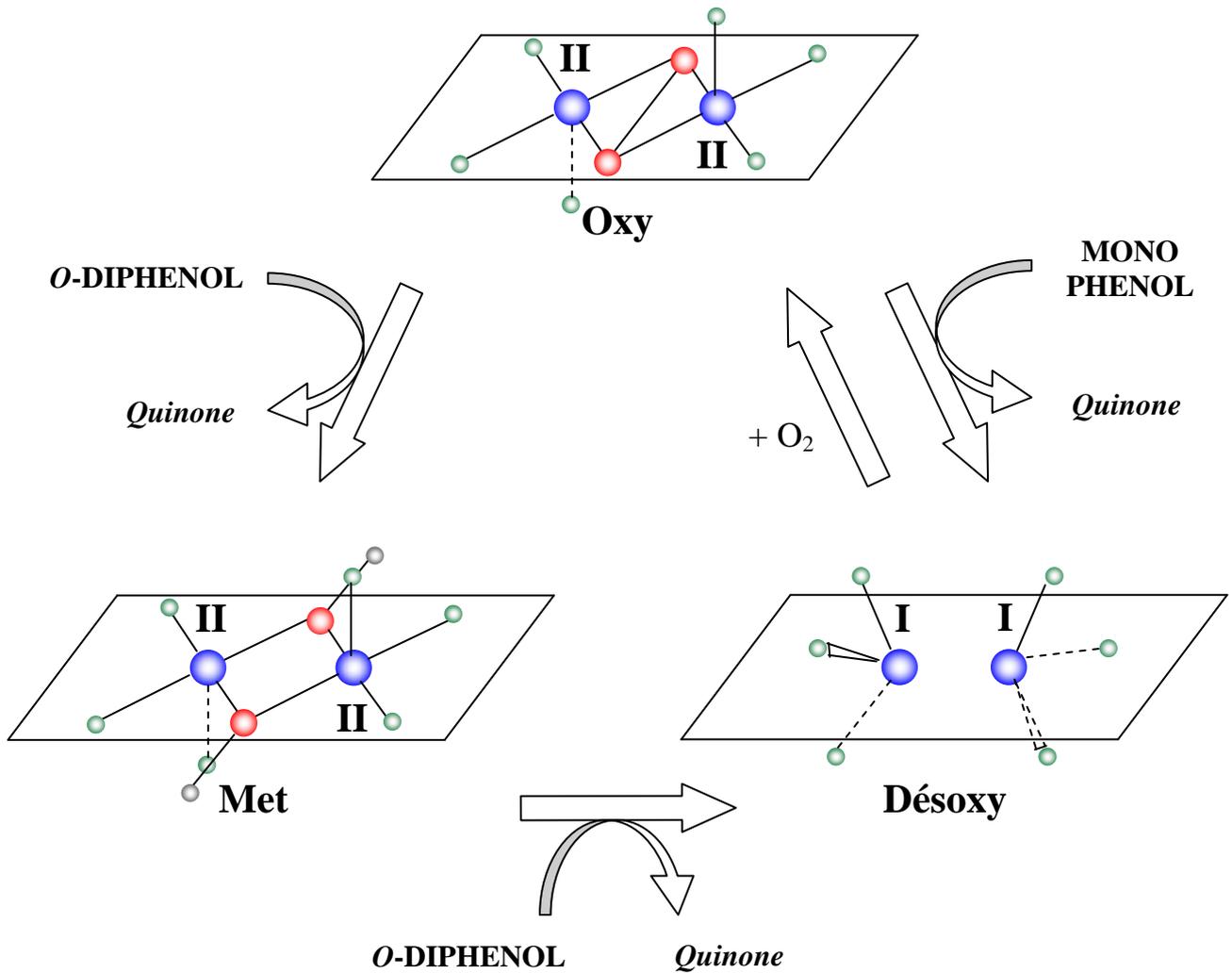
région riche en résidus cystéine, dont le rôle est encore indéterminé. La troisième région, riche en résidus portant des chaînes latérales hydrophobes permet de diriger la PPO immature vers le lumen des thylacoïdes. Récemment, KOUSSEVITZKY *et al.* (1999) ont identifié chez le pois une métalloendopeptidase spécifique des polyphénoloxydases, appartenant à la famille des peptidases spécifiques du thylacoïde (stromal processing peptidase, SPP). Cette protéase, responsable de l'excision du domaine N-terminal des PPO, serait directement impliquée dans les phénomènes de translocation *in vivo* de la PPO dans les chloroplastes.

Le domaine central des PPO est séparé du peptide de transit par une séquence de clivage reconnue par certaines protéases végétales. Ce domaine contient les deux sites de fixation des atomes de cuivre, et correspond aux PPO matures. Les deux séquences de fixation du cuivre sont très conservées entre les PPO des végétaux supérieurs et les tyrosinases, mais aussi chez toutes les espèces procaryotes et eucaryotes étudiées (DECKER et TERWILLIGER, 2000). Selon les hypothèses de VAN GELDER *et al.* (1997), la partie C-terminale du domaine central contiendrait une séquence d'arrimage à la membrane du thylacoïde ou trans-membranaire.

Le domaine C-terminal est séparé du domaine central par un site de clivage sensible à la protéolyse. Ce domaine n'est présent que dans les formes latentes de PPO de haricot, de raisin, de tyrosinase de champignons (VAN GELDER *et al.*, 1997) et vraisemblablement chez la pomme (MARQUES *et al.*, 1995b).

La structure tridimensionnelle de la PPO mature de tubercule de pomme de terre (figure 3A) a été obtenue en complétant la séquence d'acides aminés par une étude de cristallographie aux rayons X (KLABUNDE *et al.*, 1998 ; EICKEN *et al.*, 1999). Cette représentation montre clairement la forme globulaire de cette enzyme de 341 acides aminés et d'une masse totale de 39 kDa. Quatre hélices  $\alpha$  ménagent une cavité globalement hydrophobe ouverte vers la surface de l'enzyme, cavité au cœur de laquelle se trouve le site actif. La figure 3B montre clairement que chacun des deux atomes de cuivre est lié par des liaisons covalentes à plusieurs résidus histidines présents sur deux hélices  $\alpha$  (MURATA, 1997 ; EICKEN *et al.*, 1999 ; CHEVALIER *et al.*, 1999). Selon KLABUNDE *et al.* (1998) et EICKEN *et al.* (1999) les PPO sont composées de deux sous-domaines portant chacun un atome de cuivre et proviendraient de la fusion de deux protéines ancestrales correspondant chacune à un sous-domaine.

Enfin, des analyses en Southern Blot des clones d'ADN complémentaire de PPO de pomme et d'abricot ont révélé que les gènes de PPO appartiendraient à une famille multigénique (MURATA, 1997 ; CHEVALIER *et al.*, 1999).



**Figure 4 :** Interrelations entre les trois états fonctionnels de la tyrosinase (Met, Déoxy et Oxy tyrosinase) d'après VAN GELDER et al. (1997). Les atomes de cuivre sont représentés en bleu, d'oxygène en rouge, d'hydrogène en gris et les azotes des histidines en vert.

### **1.1.3. Mécanisme réactionnel.**

Les tyrosinases peuvent se trouver sous trois états fonctionnels différents, représentés figure 4 d'après VAN GELDER *et al.* (1997). La forme Met représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphénols en quinones. Le site actif passe alors sous forme Désoxy dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite. Ils deviennent alors capables de fixer l'oxygène moléculaire pour passer sous la forme Oxy. Cette dernière forme peut prendre en charge aussi bien les mono que les *o*-diphénols. Le passage d'une forme à l'autre entraîne des modifications de la géométrie spatiale des six atomes d'azote des résidus histidine et le rapprochement des deux atomes de cuivre l'un par rapport à l'autre (forme Désoxy). Ces phénomènes sont liés à de légères modifications de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme au cours de la catalyse (DELLA LONGA *et al.*, 1996 ; EICKEN *et al.*, 1999).

En ce qui concerne l'activité monophénolasique, l'étape préliminaire à la formation des quinones consiste en l'hydroxylation des monophénols (VANNESTE et ZUBERBÜHLER, 1974). Or la forme Oxy est quasi absente dans les extraits enzymatiques et l'ajout d'un faible pourcentage d'*o*-diphénols dans le milieu réactionnel est nécessaire pour modifier l'état fonctionnel des PPO et initier la réaction d'hydroxylation (DUCKWORTH et COLEMAN, 1970 ; SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1995). Pour accélérer cette étape généralement lente, l'ajout d'agents réducteurs tel que l'acide ascorbique (LAVOLLAY *et al.*, 1975 ; ROS *et al.*, 1993) et le dithiothréitol (NAISH-BYFIELD *et al.*, 1994) est préconisé.

Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme Oxy semble beaucoup plus instable que dans le cas des tyrosinases, ce qui réduit fortement l'affinité des PPO pour les mono-phénols (EICKEN *et al.*, 1999). Dans tous les cas, l'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le phénol-substrat, la réaction se produit donc selon un mécanisme séquentiel ordonné, proposé dès 1981 par WINKLER *et al.* puis confirmé par JANOVITZ-KLAPP *et al.* (1989).

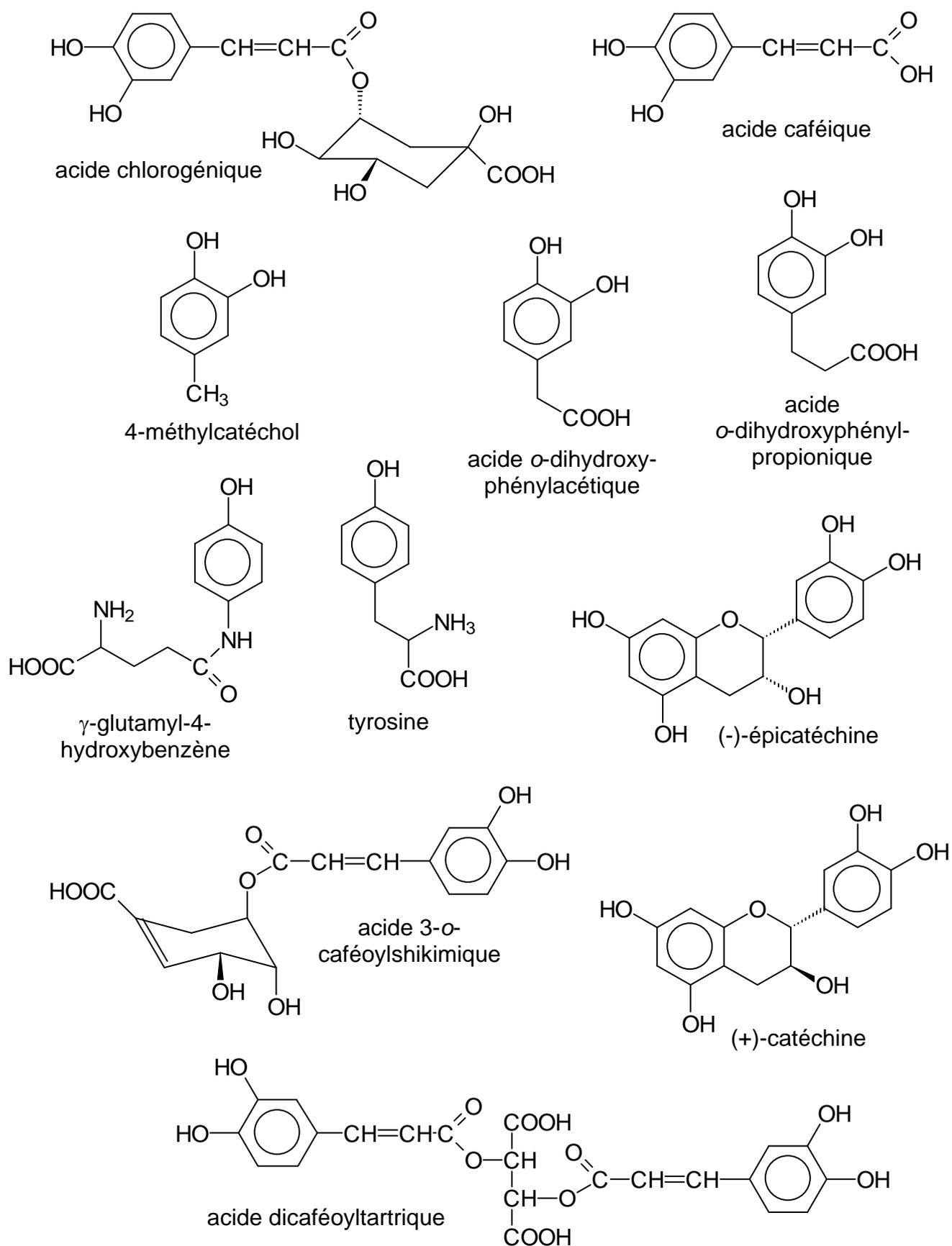
### **1.1.4. Mécanismes de maturation et d'activation des polyphénoloxydases.**

Selon de nombreux auteurs, il existe deux types de mécanismes d'activation des PPO totalement indépendants l'un de l'autre ; à savoir, une activation par protéolyse partielle, d'une part, et une activation en présence de détergents, d'autre part. Le premier mécanisme permet de passer d'une forme dite immature à une forme mature de PPO alors que le second mécanisme permet de

passer d'une forme inactive à une forme active (FLURKEY, 1986 ; FRAIGNIER *et al.*, 1995 ; VAN GELDER *et al.*, 1997 ; ESPIN et WICHERS, 1999).

L'influence de la protéolyse sur l'activité polyphénoloxydasique a été mise en évidence *in vitro*. En effet, lors de l'ajout d'inhibiteurs de protéases au cours de l'extraction de PPO végétales, le nombre d'isoformes observées par électrophorèse chute sans altérer l'activité PPO totale (VAN GELDER *et al.*, 1997 ; NOZUE *et al.*, 1999). Dans tous les cas, la protéolyse s'accompagne de l'apparition de formes actives de PPO ayant une masse moléculaire apparente inférieure à celles des formes natives. Dans certains cas, les formes protéolysées de PPO sont actives sur une gamme de pH plus large que les PPO natives (MARQUES *et al.*, 1995b). D'autre part, il est admis que les sites de clivage protéasiques (figure 2) permettent l'excision du domaine C-terminal des PPO. Si les effets de la protéolyse *in vitro* par la protéinase K et la trypsine sont largement étudiés, les mécanismes de clivage *in vivo* restent mal connus (KING et FLURKEY, 1987 ; YURKOW et LASKIN, 1989 ; MARQUES *et al.*, 1994 ; FRAIGNIER *et al.*, 1995 ; ESPIN *et al.*, 1999b). En outre, KUWABARA et KATOH (1999) affirment que le site actif de la PPO d'épinard est capable d'autoprotéolyse. Ce mécanisme serait activé par l'ajout, dans les extraits, d'acide ascorbique et d'eau oxygénée et inactivé par l'ajout de catalase.

D'autre part, il existe au moins un mécanisme permettant d'activer les formes dites latentes de polyphénoloxydases. Il a été montré *in vitro* que l'ajout de détergents anioniques tels que le dodécyl sulfate de sodium (SDS) entraînait une forte augmentation de l'activité de certains extraits polyphénoloxydasiques, ce qui suggérerait la présence de formes latentes de l'enzyme dans ces extraits (KAHN, 1977 ; FLURKEY, 1986 ; SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1989 ; MAYER et HAREL, 1991 ; CHAZARRA *et al.*, 1996 ; GAUILLARD et RICHARD-FORGET, 1997). Or les formes latentes ne peuvent être détectées que lorsque les PPO sont extraites à l'aide de détergents doux tels que le Triton X-114 (GOLDBECK et CAMMARATA, 1981 ; CHAZARRA *et al.*, 1996). Selon ces mêmes auteurs, l'emploi de Triton X-100 et de sulfate d'ammonium activerait le plus souvent les PPO latentes présentes dans les extraits d'où l'absence de mise en évidence. L'activation des PPO par le SDS peut paraître paradoxale lorsque l'on sait que ce détergent dénature généralement les protéines en modifiant leur structure tertiaire. D'après MARQUES *et al.* (1995b) la résistance des PPO est vraisemblablement due au deux ponts disulfures présents dans la région N-terminale de l'enzyme mature (voir figure 3A). Selon MOORE et FLURKEY (1990), les interactions entre la PPO et le SDS modifieraient la conformation tridimensionnelle de l'enzyme et rendrait ainsi le site actif accessible aux substrats. VAN GELDER *et al.* (1997) et ONSA *et al.* (2000) supposent qu'*in vivo*, des



**Figure 5 :** Structure de quelques composés phénoliques substrats de la polyphénoloxydase et de la tyrosinase.

molécules lipidiques seraient susceptibles de jouer le rôle d'activateurs des PPO selon un mécanisme proche de celui du SDS.

Dans le cas de la tyrosinase de champignon, près de 99 % de l'enzyme mature serait sous forme latente (VAN GELDER *et al.*, 1997). En effet, l'activité tyrosinase diminue au cours de la croissance du carpophore au profit de formes latentes (GOODENOUGH, 1978 ; INGEBRITSEN *et al.*, 1989). La plupart des PPO de feuilles de végétaux supérieurs seraient également sous forme latente (FLURKEY, 1986), alors que peu de fruits renferment cette forme particulière de l'enzyme (FRAIGNIER *et al.*, 1995). Des PPO latentes ont été détectées chez la mangue (ROBINSON *et al.*, 1993), l'avocat (KAHN, 1977) et le raisin (SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1989). Plus récemment, des formes latentes ont été découvertes chez la laitue (CHAZARRA *et al.*, 1996), la poire (GAUILLARD et RICHARD-FORGET, 1997) et dans les tubercules de pomme de terre (NOZUE *et al.*, 1999).

### **1.1.5. Spécificité des polyphénoloxydases et phénols substrats naturels.**

De nombreux travaux ont été consacrés à la spécificité des PPO vis-à-vis des substrats phénoliques. La spécificité est évaluée selon deux paramètres cinétiques : la valeur de  $K_m$  qui rend compte de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et la vitesse maximale de catalyse  $V_m$ . La spécificité dépend de la structure de l'enzyme et des substrats, mais également des conditions expérimentales (WHITAKER, 1985 ; VAN GELDER *et al.*, 1997).

La nature et la position des substituants sur les mono ou les *o*-diphénols sont déterminants pour la réactivité du substrat vis-à-vis de l'enzyme (ZAWISTOWSKY *et al.*, 1991). Aussi JANOVIKZ-KLAPP *et al.* (1989, 1990a et b) ont-ils montré que l'affinité de la PPO de pomme pour le substrat augmentait avec la présence d'une substitution acide carboxylique conjugué (acide caféique) ou non (acide *o*-dihydroxybenzoïque) sur le cycle aromatique (figure 5). Cependant, la diminution de la valeur de  $K_m$  s'accompagne dans ces deux cas d'une forte baisse de la valeur de  $V_m$ . Lorsque la fonction acide carboxylique est estérifiée (cas de l'acide chlorogénique) ou éloignée du cycle par l'interposition d'une chaîne carbonée (cas de l'acide *o*-dihydroxyphénylacétique et *o*-dihydroxyphénylpropionique) les valeurs de  $K_m$  et de  $V_m$  augmentent simultanément. Selon DUCKWORTH et COLEMAN (1970) la valeur de  $K_m$  chute lorsque l'effet électro-attractif de la substitution en *méta* du noyau benzénique augmente.

L'affinité varie également selon la source enzymatique. Ainsi, les valeurs de  $K_m$  apparent (obtenues lorsque les cinétiques sont réalisées à concentration constante en oxygène) vis-à-vis du 4-méthylcatéchol oscillent-elles de 0,5 à 20 mM selon qu'il s'agit de PPO de pomme (JANOVIKZ-KLAPP *et al.*, 1989), de salade (GOUPY *et al.*, 1994 ; HEIMDAL *et al.*, 1994), d'abricot

(CHEVALIER *et al.*, 1999) ou de tyrosinase de champignon (FAYAD-EL DAHOUK, 1998). En ce qui concerne la spécificité des PPO vis-à-vis de l'oxygène, les quelques travaux présentés indiquent des valeurs de  $K_m$  comprises entre 0,025 mM pour la PPO d'abricot (de RIGAL *et al.*, 2000), 0,1 mM pour la tyrosinase de champignon de Paris (ESPIN *et al.*, 1999a) et 0,54 mM pour la pomme (JANOVITZ-KLAPP *et al.*, 1990b). Ceci implique que, pour les solutions aqueuses saturées en air à 25°C, pour lesquelles la concentration en oxygène dissous est voisine de 0,25 mM (WISE et NAYLOR, 1985), seule la PPO d'abricot est saturée en oxygène puisque la teneur en oxygène est 10 fois supérieure à la valeur de  $K_m$ .

La valeur de pH des milieux réactionnels influence également la spécificité des PPO de manière non négligeable. Ainsi, JANOVITZ-KLAPP (1989) a-t-il montré que les protons agissaient comme des inhibiteurs vis-à-vis de l'oxydation d'*o*-diphénols par la PPO de pomme. Cependant les études concernant l'influence du pH sont rares et la plupart des auteurs indiquent simplement un optimum d'activité PPO dans une gamme de pH donnée.

La nature et la teneur dans les fruits et légumes des phénols substrats des PPO varient selon l'espèce et la variété considérées. Dans le cas de la pomme, les composés phénoliques majeurs sont l'acide chlorogénique (dérivé d'acide hydroxycinnamique) et 2 isomères de flavan-3-ol ; la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine (NICOLAS *et al.*, 1994 ; CLIFFORD, 1999). La teneur de chacun de ces deux composés peut varier de 5 à 650 mg pour 100 g de poids frais selon les variétés. La plupart des variétés d'abricots se caractérisent, selon DIJKSTRA et WALKER (1991), par une prédominance d'acide chlorogénique (jusqu'à 40 mg pour 100 g de matière sèche) ou encore de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine (RADI *et al.*, 1997). Chez la scarole, deux dérivés d'acide hydroxycinnamique représentent, d'après GOUPY (1989) près de 70 % des phénols totaux : l'acide dicaféoyltartrique et l'acide 3-*o*-caféoylshikimique. La teneur de chacun de ces composés atteint 800 mg pour 100 g de matière sèche dans les limbes. Enfin, les phénols substrats endogènes majoritaires chez le champignon de Paris sont la tyrosine et le  $\gamma$ -glutamyl-4-hydroxybenzène (VAN GELDER *et al.*, 1997). ESPIN *et al.* (1999a) et BEAULIEU *et al.* (1999) rapportent également la présence, dans le champignon, de dérivés dihydroxylés de ces deux substrats à savoir la L-DOPA et le  $\gamma$ -glutamyl-3,4-dihydroxybenzène.

Si les *o*-diphénols sont impliqués dans le brunissement enzymatique de pratiquement tous les fruits et légumes, la nature et la teneur des phénols endogènes non substrats est aussi déterminante dans l'intensité du brunissement. En effet, ces derniers peuvent participer aux réactions secondaires et plus précisément aux réactions d'oxydation couplées avec les quinones (FORGET-RICHARD, 1992). Ces phénomènes compliquent les travaux visant à établir une corrélation entre le pool

phénolique total et l'aptitude au brunissement (VAMOS-VIGYAZO, 1981 ; AMIOT *et al.*, 1992 ; NICOLAS *et al.*, 1994).

#### **1.1.6. Effet du pH sur l'activité polyphénoloxydasique.**

La valeur de pH conduisant à une activité maximale dépend de l'origine de la PPO ainsi que du substrat employé. L'activité optimale se situe généralement dans une gamme de pH comprise entre 4 et 7. Ainsi, le pH optimal de la PPO d'abricot est-il de 4,4 lorsque le 4-méthylcatéchol est employé (CHEVALIER *et al.*, 1999) et de 6,6 lors de l'oxydation de l'acide chlorogénique dans des conditions similaires (DIJKSTRA et WALKER, 1991). GOUPY *et al.* (1994) et FAYAD-EL DAHOUK (1998) déterminent des valeurs de pH optimal comprises entre 6 et 7 pour la PPO de scarole. L'activité maximale de la PPO de pomme est obtenue à pH 4,5 (FORGET-RICHARD, 1992). MARQUES *et al.* (1995b) ajoutent que le pH optimal de la PPO de pomme passe de 4,5 à 6 lorsque l'enzyme est activée en présence de SDS ou par protéolyse. Dans le cas de la tyrosinase de champignon de Paris, la valeur de pH optimal varie entre 6 et 7 selon le substrat (DUCKWORTH et COLEMAN, 1970 ; VAROQUAUX, 1978 ; ESPIN *et al.*, 1999a).

#### **1.1.7. Localisation tissulaire et subcellulaire des polyphénoloxydases.**

L'activité PPO est généralement retrouvée dans tous les tissus végétaux, mais sa répartition varie selon les espèces et leur degré de maturité (NICOLAS *et al.*, 1994 ; HEIMDAL *et al.*, 1994 ; MURATA *et al.*, 1997 ; MURATA, 1997). Chez la laitue, les PPO se retrouvent aussi bien dans les tissus photosynthétiques que dans les tissus vasculaires (HEIMDAL *et al.*, 1994), alors que chez la plupart des fruits leur activité est détectée au niveau de la peau comme du cortex (MARQUES *et al.*, 1995a). MURATA (1997) a montré par des études immuno-histochimiques associées aux mesures de couleurs que chez les pommes immatures, l'activité PPO était répartie régulièrement dans tout le fruit pour se retrouver au niveau de la pulpe et de la peau après la maturation. Chez le champignon, l'activité DOPA oxydase se concentre au niveau des lamelles, du pied et de la peau du carpophore (MOORE *et al.*, 1988).

Les PPO sont généralement des enzymes associées à la membrane interne des chloroplastes et des études d'immuno-cytochimie ont montré qu'elles étaient orientées vers le lumen des thylacoïdes (VAUGHN *et al.*, 1988 ; LAX et VAUGHN, 1991). Or ces enzymes sont exprimées à partir de gènes portés par l'ADN nucléaire. Toutefois, la présence de peptides de transit dans les précurseurs de PPO

de nombreuses espèces viennent confirmer cette localisation particulière (SHAHAR *et al.*, 1992 ; SOMMER *et al.*, 1994, SOKOLENKO *et al.*, 1995 ; CHEVALIER *et al.*, 1999). Dans certains cas, l'activité PPO est extraite à partir des fractions mitochondriales comme dans la pomme (HAREL *et al.*, 1965) et l'olive (SHOMER *et al.*, 1979), ou associée à la paroi pectocellulosique dans le cas de la banane (JAYARAMAN *et al.*, 1987). Mais ces localisations singulières restent à être confirmées par des techniques fines de cytolocalisation. Ainsi, il a été montré que la PPO des tubercules de pomme de terre était associée à la membrane des grains d'amidon (PARTINGTON *et al.*, 1999).

De nombreux auteurs notent la présence de formes solubles de PPO qui semblent augmenter avec le taux de maturité du fruit (MARQUES *et al.*, 1995a). En effet, la PPO d'olive immature est liée aux membranes chloroplastiques alors que dans le fruit mûr, presque toute l'activité est soluble, vraisemblablement libérée par la décompartmentation des plastes (BEN-SHALOM *et al.*, 1977). Ce phénomène se retrouve aussi bien chez la pomme (MURATA *et al.*, 1997) que chez le champignon (INGEBRIGTSEN *et al.*, 1989) et se produit également au cours d'une blessure ou d'une attaque fongique (PARTINGTON *et al.*, 1999). Aussi, les auteurs signalent-ils une fluctuation, pour les fruits et légumes, de l'activité polyphénoloxydasique au cours du temps, souvent associée à une augmentation du pourcentage de la forme soluble (MACHEIX, 1970 ; PRABHA et PATWARDHAN, 1986).

### **1.1.8. Rôle physiologique des polyphénoloxydases.**

Le rôle physiologique des PPO demeure en grande partie obscur et donc très controversé (VAUGHN *et al.*, 1988 ; MAYER et HAREL, 1991 ; WALKER et FERRAR, 1998). L'absence de PPO ne semble pas avoir d'effet sur la viabilité de certaines espèces végétales mutantes comme une lignée de pomme de terre transgénique (BACHEM *et al.*, 1994) ou le raisin « Bruce's Sport » (WALKER et FERRAR, 1998).

Toutefois, de nombreuses hypothèses concernant le rôle physiologique des PPO sont proposées. Premièrement, son implication dans la résistance aux infections bactériennes, fongiques et virales paraît largement admise (MARTINEZ et WHITAKER, 1995). En effet, une augmentation de l'activité PPO est généralement observée suite à un stress (GENTILE *et al.*, 1988), hausse vraisemblablement due à une maturation de formes latentes (ESPIN *et al.*, 1999b) par les protéases des pathogènes plutôt qu'à une synthèse *de novo* (LEGER *et al.*, 1997 ; CHEVALIER *et al.*, 1999). L'initiation des réactions d'oxydation enzymatique des phénols conduirait à la mise en œuvre de mécanismes de défense physiques et chimiques du végétal. MARBACH et MAYER (1975) et

ZAWISTOWSKY *et al.* (1991) attribuent en effet à la PPO un rôle dans le renforcement des parois alors que PIERPOINT (1966) affirme que certains composés intermédiaires des réactions secondaires seraient capables d'inactiver ou de fixer certains virus et de limiter leur pouvoir infectieux.

ZINKERNAGEL (1986) ajoute que les quinones produites ont un effet bactéricide et fongicide.

KUWABARA et KATOH (1999) supposent un rôle de la PPO dans la facilitation de la mort cellulaire, après avoir mis en évidence une activité protéolytique catalysée par la PPO d'épinard.

En raison de leur participation dans les réactions d'hydroxylation, les PPO interviendraient directement dans les voies de biosynthèse de composés *o*-diphénoliques (RHODES *et al.*, 1981). Cependant, la composition en *o*-diphénols ne semble pas liée à la présence ou à l'absence de PPO dans les tissus végétaux intacts, ce qui rend cette hypothèse fortement discutable (VAUGHN *et al.*, 1988).

Enfin, la localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse (WALKER et FERRAR, 1998) ou dans la régulation du niveau d'oxygène actif au sein des chloroplastes (HO, 1999 ; KUWABARA et KATOH, 1999). LAX et VAUGHN (1991) ont d'ailleurs montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la plupart des végétaux supérieurs.

Notons que les différents rôles des laccases fongiques sont clairement établis. Celles-ci sont en effet excrétées et interviennent directement dans la dégradation de la lignine (FARNET *et al.*, 1999 ; PERRY *et al.*, 1999). D'autres auteurs ajoutent qu'elles interviennent dans la pigmentation et certaines phases de la morphogénèse des carpophores (ANDERSON et NICHOLSON, 1996 ; FERNANDEZ *et al.*, 1999 ; ZHANG *et al.*, 1999).

### **1.1.9. Purification de l'activité polyphénoloxydasique.**

Les conditions d'extraction des PPO doivent permettre une solubilisation complète de la fraction enzymatique liée aux membranes tout en prévenant l'oxydation des polyphénols endogènes par la fraction enzymatique.

Les PPO de légumes comme le chou (FUJITA *et al.*, 1995), la laitue (FUJITA *et al.*, 1991 ; HEIMDAL *et al.*, 1994), ou la patate douce (NOZUE *et al.*, 1999) sont extraites par simple homogénéisation dans une solution de tampon exempte de détergent. De nombreux auteurs préconisent toutefois l'emploi d'un détergent non ionique doux, le Triton X-100, afin de pallier les problèmes de solubilisation (VALERO *et al.*, 1988b ; GOUPY *et al.*, 1994 ; FORGET-RICHARD, 1992 ; MURATA, 1997 ; WEEMAES *et al.*, 1999b ; DE LOS ANGELES SERRADELL *et al.*, 2000). Selon certains auteurs, l'extraction des formes natives de PPO ne peut être obtenue que par

l'emploi de Triton X-114 (SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1994 ; ESPIN *et al.*, 1995 ; CHAZARRA *et al.*, 1996 ; SOJO *et al.*, 1999 ; ESPIN *et al.*, 2000). Ce détergent non ionique est caractérisé par une concentration micellaire critique et une valeur de la balance hydrophile/lipophile plus faible que celle du Triton X-100 ; il préserverait donc la structure native des protéines (SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1994).

D'autre part, l'oxydation de l'extrait conduit à la synthèse de quinones, laquelle serait susceptible d'induire une inactivation de l'enzyme. Les milieux d'extraction sont donc généralement additionnés de composés réducteurs comme l'acide ascorbique, la cystéine, le dithiothréitol ou d'adsorbants des phénols comme le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ou le charbon actif (NICOLAS *et al.*, 1994).

Classiquement, une précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium et des méthodes chromatographiques de séparation succèdent à l'extraction. L'efficacité de la chromatographie d'interactions hydrophobes et sa rapidité ont été démontrées par de nombreux auteurs (INGEBRIGTSEN et FLURKEY, 1988 ; RICHARD-FORGET *et al.*, 1994 ; GOUPY *et al.*, 1994 ; GAUILLARD et RICHARD-FORGET, 1997 ; CHEVALIER *et al.*, 1999 ; JIANG *et al.*, 1999 ; ESPIN *et al.*, 2000). L'emploi de chromatographies d'échange d'ions est également préconisé (DUCKWORTH et COLEMAN, 1970 ; ZAWISTOWSKI *et al.*, 1988b ; FUJITA *et al.*, 1995 ; BILLAUD *et al.*, 1996 ; MURATA, 1997 ; NOZUE *et al.*, 1999). Dans de nombreux cas, les fractions issues de chromatographies d'hydrophobicité ou d'échange d'ions subissent une étape de dessalage par chromatographie d'exclusion (FUJITA *et al.*, 1991 ; WICHERS *et al.*, 1996 ; MURATA, 1997 ; ESPIN *et al.*, 1995 ; ESPIN *et al.*, 1997).

D'autres techniques chromatographiques plus spécifiques sont basées sur l'affinité de l'enzyme pour un ligand couplé au gel. Lorsque le ligand est un ion métallique, on parle de chélation alors que le terme d'affinité est employé lorsqu'un substrat, un inhibiteur ou un anti-corps est fixé couplé au gel. L'emploi de la chromatographie par chélation de métaux est proposé par ZAWISTOWSKI *et al.* (1987) pour la purification de la PPO de topinambour ; elle fut reprise par JANOVITZ-KLAPP (1989) et par RICHARD-FORGET *et al.* (1994) pour celle de la pomme, puis par YONG *et al.* (1990) pour la tyrosinase de champignon. La chromatographie d'affinité est depuis longtemps employée pour la purification de la tyrosinase de champignon (GOLAN-GOLDHIRSH et WHITAKER, 1984b ; INGBRIGTSEN et FLURKEY, 1988). Cette méthode chromatographique paraît plus rarement employée pour la purification de PPO de végétaux supérieurs. Toutefois le couplage d'inhibiteurs compétitifs au gel de chromatographie a permis à RICHARD-FORGET *et al.* (1994) de séparer deux isoformes de PPO de pomme.

## 1.2. REACTIONS SECONDAIRES.

Ces réactions sont directement responsables de modifications de la couleur du matériel végétal. Les *o*-quinones présentent une coloration allant du jaune clair au rose qui dépend de leur structure chimique mais aussi du pH du milieu réactionnel (TAYLOR et CLYDESDALE, 1987). En outre les quinones sont fortement réactives et engendrent deux catégories de réactions non enzymatiques :

- les réactions impliquant des phénols, résultant en la formation de dimères ou de copolymères parfois eux-mêmes substrats des PPO (ROUET-MAYER *et al.*, 1990). Les *o*-quinones sont capables d'oxyder des structures phénoliques différentes (réactions d'oxydation couplée), conduisant à la régénération du phénol parental (FORGET-RICHARD, 1992).
- les réactions impliquant les composés non phénoliques, à savoir les additions nucléophiles impliquant les thiols, les sulfites (CHEYNIER *et al.*, 1986), les fonctions amines des acides aminés et des peptides (VALERO *et al.*, 1988a), conduisant le plus souvent à la formation de composés incolores. Les oxydations couplées avec l'acide ascorbique conduisent à la génération d'acide déhydroascorbique et du phénol parental (NICOLAS *et al.*, 1994).

Selon RICHARD-FORGET *et al.* (1999) et de RIGAL *et al.* (2000) des réactions secondaires se produisent également entre les *o*-quinones et certains caroténoïdes. Elles conduiraient à une régénération de l'*o*-diphénol et à une isomérisation du  $\beta$ -carotène.

## 2. PREVENTION DU BRUNISSEMENT.

Si le brunissement enzymatique est recherché au cours de transformations technologiques de certains produits tels que le thé, le cidre, les raisins secs, les pruneaux ou les dattes, il pose un problème important pour les fruits et légumes vendus frais ou destinés à la 4<sup>ème</sup> gamme. Les méthodes de prévention du brunissement ont fait l'objet de nombreux travaux qui se trouvent fortement relancés depuis près de 15 ans, en raison des problèmes toxicologiques posés par l'emploi des sulfites (TAYLOR *et al.*, 1986). Dans ce chapitre, après un rappel succinct des généralités sur les traitements par les sulfites, nous réaliserons un inventaire des différents inhibiteurs chimiques cités dans la littérature avant de détailler plus particulièrement les méthodes faisant appel à l'emploi de préparations enzymatiques.

## 2.1. CAS DES SULFITES.

### 2.1.1. Efficacité des traitements.

Le sulfite et ses dérivés constituent le moyen le plus efficace et le moins onéreux de lutte contre le brunissement enzymatique. Ces composés agissent simultanément sur les PPO et sur les produits de la réaction d'oxydation catalysée par ces enzymes (MAC EVILY *et al.*, 1992b ; WALKER, 1995 ; WALKER et FERRAR, 1998).

Les formes solubles des sulfites, à savoir les ions sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) et bisulfite ( $\text{HSO}_3^-$ ), sont capables d'inactiver de manière irréversible les PPO de végétaux supérieurs ou d'origine fongique (GOLAN-GOLDHIRSH et WHITAKER, 1984a). L'inactivation de la PPO de poire et de la tyrosinase de champignon est totale au bout de 20 minutes pour des concentrations en sulfite de l'ordre de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  (SAYAVEDRA-SOTO et MONTGOMERY, 1986). Il s'avère en outre que l'inactivation est d'autant plus efficace que le pH des milieux d'incubation est plus faible. Les auteurs expliquent que cet effet est dû à une augmentation de la proportion d'ions bisulfites en milieu acide. Le mécanisme d'inactivation s'accompagne d'un changement de structure tertiaire et/ou d'ionisation de la PPO, vraisemblablement suite à la réduction de ponts disulfures (SAYAVEDRA-SOTO et MONTGOMERY, 1986).

La seconde série de mécanismes mis en jeu dans l'effet anti-brunissement des sulfites est leur complexation avec les quinones sous forme de produits d'addition stables et incolores (NICOLAS *et al.*, 1994 ; WALKER et FERRAR, 1995 ; MARKAKIS et EMBS, 1996) et la réduction des quinones conduisant à la régénération des phénols parentaux (GOLAN-GOLDHIRSH et WHITAKER, 1984a ; FERRAR et WALKER, 1999).

En outre, les sulfites possèdent de nombreuses propriétés intéressantes en ce qui concerne la conservation des denrées alimentaires. Ils inhibent le brunissement non enzymatique en stabilisant les composés carbonylés (porteurs de groupements aldéhydes et cétones) créés au cours des réactions de Maillard et précurseurs des mélanoidines (SAPERS, 1993 ; FRIEDMAN, 1996). Les sulfites inhibent également la croissance des microorganismes (TAYLOR *et al.*, 1986 ; FERRAR et WALKER, 1999 ; LICHTER *et al.*, 2000).

Toutes ces propriétés font de l'emploi des sulfites le traitement chimique anti-brunissement le plus répandu (IYENGAR et MAC EVILY, 1992; TAYLOR, 1993). L'œnologie est le premier domaine d'application dans lequel leur effet anti-microbien et leur capacité à stabiliser la couleur et la saveur des vins sont exploités. Dans les filières fruits et légumes, ils sont utilisés comme moyen de

prévention du brunissement des fruits et légumes secs (abricots, figues, haricots) ou frais, qu'ils soient entiers ou pelés et prédécoupés. Enfin, ces traitements sont largement employés de nos jours dans la conservation de fruits de mer. Ces produits sont en effet très sensibles au brunissement enzymatique nommé alors Black Spot. Les crevettes et autres crustacés sont généralement trempés immédiatement après la pêche dans une solution de bisulfite de sodium (OTWELL *et al.*, 1992 ; TAYLOR et NORDLEE, 1993).

Les produits alimentaires sont donc traités par trempage dans des solutions (SAYAVEDRA-SOTO et MONTGOMERY, 1986) ou le plus souvent par vaporisation de sulfite (WALKER et FERRAR, 1995, MARTINEZ et WHITAKER, 1995 ; LICHTER *et al.*, 2000).

### **2.1.2. Problèmes de toxicité et réglementation.**

Jusqu'en 1986, la Food and Drug Administration (FDA) classait les sulfites dans les additifs alimentaires non toxiques (GRAS : Generally Recognized As Safe). Les commissions d'experts de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) déclaraient alors qu'un homme de 60 kg pouvait ingérer quotidiennement jusqu'à 42 mg de sulfites sans danger. Cependant, dès 1981, un nombre croissant de rapports montre que certains aliments traités provoquent des allergies chez certains sujets asthmatiques (TAYLOR, 1993). Les aliments traités aux sulfites contiennent du dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>). Ce gaz serait susceptible de provoquer une bronchoconstriction lorsqu'il est présent dans les aliments ingérés (TAYLOR et NORDLEE, 1993). D'autres effets tels que des chocs anaphylactiques, urticaires, nausées ou diarrhées ont été observés cliniquement chez certains sujets, mais les liens avec l'ingestion des aliments traités ne sont pas clairement établis (TAYLOR et NORDLEE, 1993 ; WALKER et FERRAR, 1995). En outre, des cas d'intoxication dus aux dégagements gazeux de dioxyde de soufre, au cours du traitement de crevettes, ont été relevés (OTWELL *et al.*, 1992).

Dès 1986, la FDA prend une série de mesures visant à contrôler de plus en plus sévèrement l'utilisation des sulfites dans l'alimentation. Ainsi, depuis 1996, les traitements aux sulfites sont interdits sur les fruits et légumes servis ou vendus frais aux consommateurs. Ils restent autorisés sur divers produits comme les crevettes, les fruits et légumes secs et les vins. La présence de sulfites doit être déclarée sur l'étiquetage au delà de 10 ppm de dioxyde de soufre résiduel totaux, et ne doit pas dépasser 100 ppm (FDA, 1996 ; WALKER et FERRAR, 1998). En Europe, une directive de 1995 (95/2/EU) limite leur utilisation sur les pommes de terres pelées et/ou découpées. Un arrêté d'octobre 1997 a abaissé les quantités maximales de sulfites autorisées dans les crustacés, les fruits séchés et certains jus de fruits (DEHOVE *et al.*, 1998). Quelques exemples de quantités maximales

actuellement autorisées en Europe sont reportés dans le tableau 1. Les interdictions concernant les fruits et légumes frais sont en cours de discussion.

Denrées alimentaires	Quantité maximale (mg.kg <sup>-1</sup> ou mg.L <sup>-1</sup> ) exprimée en SO <sub>2</sub>
<i>Pommes de terre pelées</i>	50
<i>Pommes de terre transformées (y compris les pommes de terre congelées et surgelées)</i>	100
<i>Légumes blancs séchés</i>	400
<i>Légumes blancs transformés (y compris les légumes blancs congelés et surgelés)</i>	50
<i>Champignons transformés (y compris les champignons congelés)</i>	50
<i>Champignons séchés</i>	100
<i>Fruits séchés :</i>	
<i>-abricots, pêches, raisins, prunes et figues</i>	2000
<i>-bananes</i>	1000
<i>-pommes et poires</i>	600
<i>-autres (y compris fruits à coque)</i>	500
<i>Jus d'orange, de pamplemousse, de pomme et d'ananas</i>	50
<i>Jus de limette et de citron</i>	350
<i>Autres concentrés à base de jus de fruits ou de fruits broyés</i>	250
<i>Cidre, poiré, boissons fermentées à base de fruits, pétillantes ou non</i>	200

**Tableau 1 :** Quantités maximales de sulfites autorisées dans les denrées alimentaires, contenant fruits et/ou légumes (d'après DEHOVE *et al.*, 1998).

## 2.2. PRINCIPAUX INHIBITEURS CHIMIQUES DU BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE.

La recherche de traitements chimiques pouvant se substituer aux sulfites s'est intensifiée au cours de ces dix dernières années. Elle a conduit à une meilleure compréhension des mécanismes d'actions de composés connus et/ou employés dans l'industrie agro-alimentaire ainsi qu'à la découverte de nouveaux composés ayant un effet anti-brunissement. Les inhibiteurs chimiques sont classés en trois groupes selon qu'ils affectent l'enzyme, les substrats ou les produits de la réaction.

### **2.2.1. Inhibiteurs agissant sur les substrats des polyphénoloxydases.**

Certains inhibiteurs chimiques agissent en piégeant les substrats phénoliques. Parmi les produits de synthèse classiquement employés en œnologie ou dans la fabrication de jus de fruits se trouvent le polyvinylpyrrolidone (PVPP), le charbon actif et la bentonite (SIEBERT et LYNN, 1997 ; SPAGNA *et al.*, 2000). L'élimination des phénols est réalisée en filtrant les boissons au travers de lits d'agents adsorbants. L'efficacité limitée de ces produits et des problèmes liés à leur régénération ont encouragé la recherche de nouveaux adjuvants naturels et non toxiques.

Les cyclodextrines constituent une première catégorie d'agents adsorbants des phénols d'origine naturelle. Ces dérivés de l'amidon sont des oligosaccharides cycliques de 6, 7 ou 8 unités glucopyranose selon qu'il s'agisse de l' $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -cyclodextrine. Leur forme cylindrique ménage une surface interne hydrophobe alors que la surface externe présente un caractère hydrophile (SZEJTLI, 1990). Leur cavité hydrophobe leur permet de former un complexe avec une large gamme de molécules organiques et notamment avec des phénols ayant un caractère hydrophobe fort. Ainsi, leur utilisation dans les jus de fruits et légumes a été brevetée par HICKS *et al.* dès 1990 et leur efficacité a-t-elle été montrée vis-à-vis de l'acide chlorogénique et des flavan-3-ols (FAYAD-EL DAHOUK, 1998). Cependant, les cyclodextrines n'ont aucun effet sur des phénols ayant un fort caractère hydrophile comme la dopamine, substrat naturel de la PPO de banane (SOJO *et al.*, 1999). D'autre part, l'effet de la  $\beta$ -cyclodextrine dans un mélange de 2 substrats phénoliques se traduirait par un niveau variable d'inhibition voire une légère activation selon la composition du mélange (FAYAD-EL DAHOUK, 1998). De plus, leur efficacité sur les tranches de pomme, observée par de nombreux auteurs (SAPERS et HICKS, 1989 ; BILLAUD *et al.*, 1995 ; FAYAD *et al.*, 1997) est très controversée à cause de problèmes de diffusion de ces molécules de la surface des fruits vers l'intérieur (NICOLAS *et al.*, 1994). En outre, leur faible spécificité pourrait selon certains auteurs, modifier les qualités organoleptiques des aliments traités (MAC EVILY *et al.*, 1992b ; WALKER et FERRAR, 1995).

Les chitosans, polymères de N-acétylglucosamine dérivés de désacétylation de la chitine (N-acétyl-2-amino-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside), seraient également capables d'inhiber le brunissement enzymatique de jus de pommes, de poires (SAPERS, 1992) et des vins (SPAGNA *et al.*, 2000). Ces polymères d'origine naturelle ont une forte affinité pour les flavanes, les proanthocyanidines et les acides hydroxycinnamiques (SPAGNA *et al.*, 2000). D'autres polysaccharides anioniques tels que les carraghénanes et les sulfates de xylane ou d'amylose peuvent inhiber le brunissement enzymatique de jus ou de tranches de pommes. Ils complexeraient les



composés phénoliques, mais également les atomes de cuivre du site actif des PPO (TONG et HICKS, 1991). Ces derniers composés, extraits d'algues, entrent déjà dans la composition de nombreux produits alimentaires et cosmétiques, en tant qu'agents stabilisants.

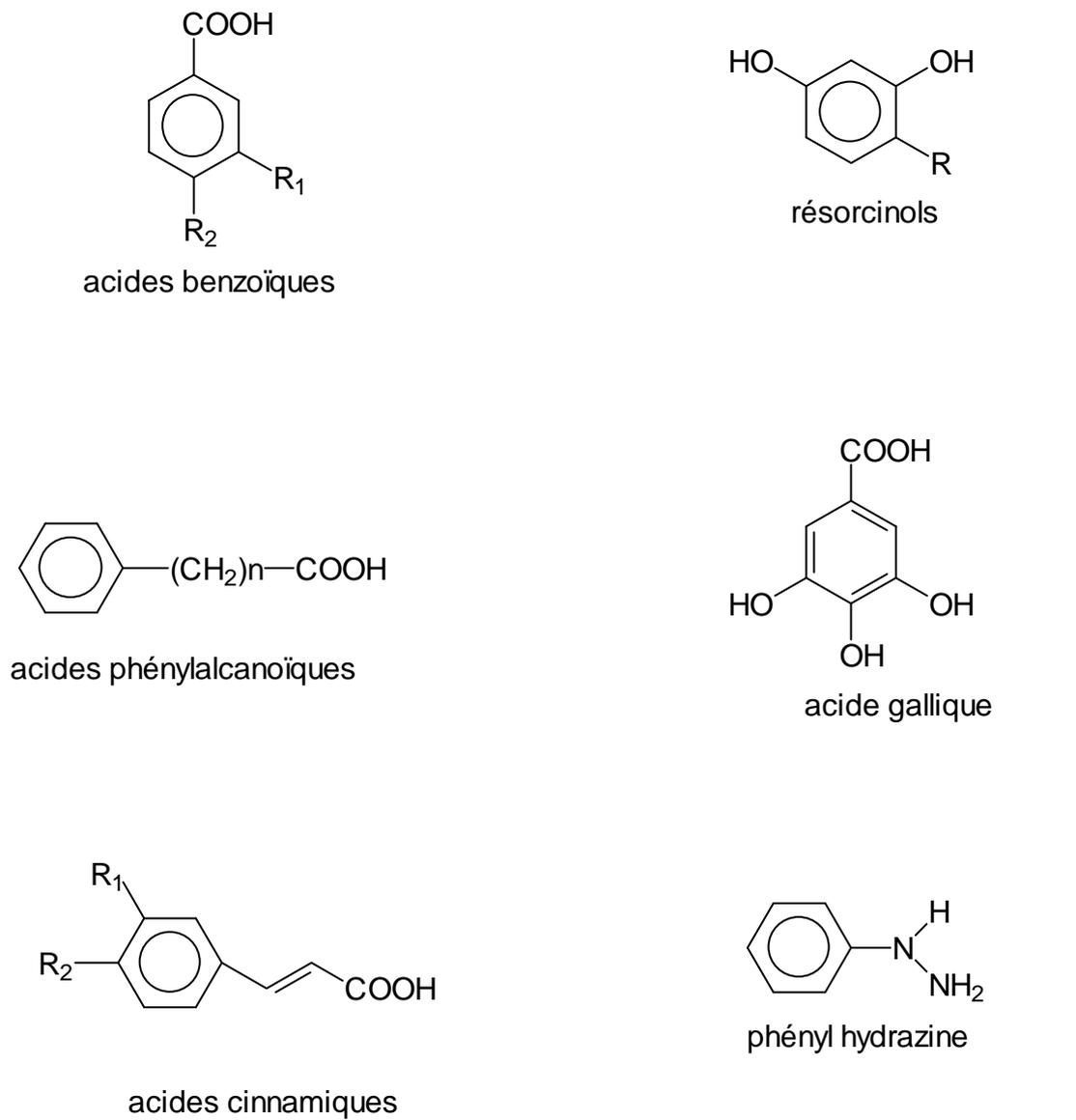
### **2.2.2. Traitements chimiques agissant sur l'enzyme.**

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

#### **2.2.2.1. Composés chélateurs d'ions métalliques.**

Ces composés forment des complexes avec les atomes de cuivre du centre actif des polyphénoloxydases. Des études de ces mécanismes par résonance paramagnétique électronique ont été réalisées dans le cas de l'inactivation de la tyrosinase par l'acide oxalique. Cette inactivation s'accompagne de l'arrachement d'un des deux atomes de cuivre de l'enzyme conduisant à une forme inactive nommée *metapo*, l'atome de cuivre encore fixé à l'enzyme restant sous forme oxydé. La forme *metapo* est alors capable de fixer spontanément un atome de cuivre présent dans le milieu, conduisant ainsi à la régénération de la forme native de l'enzyme et à la restitution de l'activité catalytique (YONG *et al.*, 1990).

Parmi les composés chélateurs classiques inhibant les PPO (figure 6) se trouvent le 2-mercaptobenzothiazole (PALMER et ROBERTS, 1967), l'azoture et le cyanure de sodium (DUCKWORTH et COLEMAN, 1970 ; HEALEY et STROTHKAMP, 1981), le monoxyde de carbone (ALBISU *et al.*, 1989), l'acide éthylènediamine tétracétique (SAPERS, 1993), l'homocystéine (REISH *et al.*, 1995), la métallothionéine (GOETGHEBEUR et KERMASHA, 1996) et le diéthylldithiocarbamate (POMA *et al.*, 1999). D'autres composés chélateurs ont une structure relativement proche de celle d'un phénol, ce qui leur confère une forte efficacité. C'est le cas de la tropolone (KAHN et ANDRAWIS, 1985), la mimosine (WINKLER *et al.*, 1981 ; KAHN et ANDRAWIS, 1985), le kaempférol (KUBO et KINST-HORI, 1999b), l'acide paratoluïque, l'acide salicyl hydroxamique (ALLAN et WALKER, 1988) ainsi que les acides kojique (KAHN *et al.*, 1995 ; BATTAINI *et al.*, 2000) et oxalique (TONG *et al.*, 1995).



**Figure 7 :** Structure de quelques composés agissant au niveau du site actif des PPO.

Parmi les agents chélateurs employés industriellement se trouve le Sporix, un polyphosphate acide de synthèse, fréquemment utilisé en mélange avec l'acide ascorbique (SAPERS, 1993). L'efficacité de cette préparation dépend fortement du pH de l'aliment traité (TAOUKIS *et al.*, 1990). Les ions chlorure sont également capables de complexer les atomes de cuivre présents dans le site actif de la PPO (de POIX *et al.*, 1980 ; JANOVIKZ-KLAPP *et al.*, 1990a ; WEEMAES *et al.*, 1999a). Si le chlorure de sodium ou de calcium est fréquemment employé en combinaison avec l'acide ascorbique, son emploi est limité par les modifications des qualités gustatives qu'il entraîne (WALKER et FERRAR, 1995).

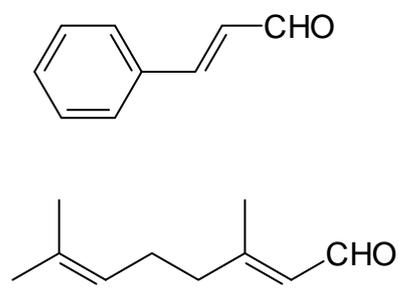
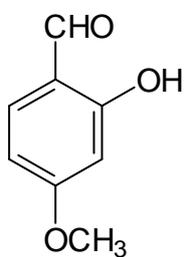
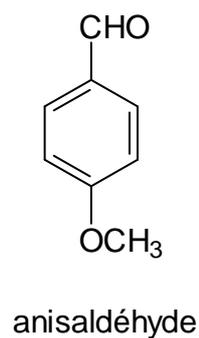
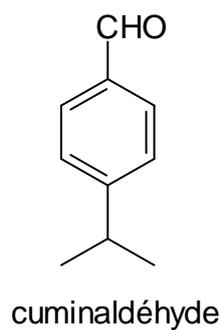
L'acide ascorbique, le peroxyde d'hydrogène, la phénylhydrazine, l'acide gallique, le ferrocyanure, de dithiothréitol, le glutathion et le  $\text{NH}_2\text{OH}$  seraient capables de réduire les atomes de cuivre du site actif de la tyrosinase de champignon (ANDRAWIS et KAHN, 1990). Selon ces mêmes auteurs, les ions cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) ainsi formés resteraient associés à la PPO, même si leur affinité pour les résidus histidines de l'enzyme est fortement réduite. Ce phénomène conduit toutefois à une inactivation des activités polyphénoloxydasiques.

#### **2.2.2.2. Agents acidifiants.**

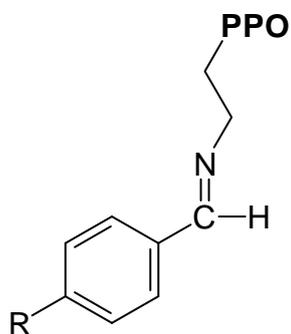
D'une manière générale, le pH optimal des PPO est compris entre 5 et 7 (MAC EVILY *et al.*, 1992b). Un abaissement de la valeur de pH du milieu vers 3 ou 4 permet donc d'inhiber ces enzymes et même d'augmenter l'efficacité de nombreux inhibiteurs (JANOVIKZ-KLAPP *et al.*, 1990a ; CONRAD *et al.*, 1994). L'acide citrique est l'agent acidifiant le plus couramment utilisé pour le traitement de fruits et légumes frais. Il est capable en outre de chélater le cuivre du site actif de l'enzyme (WALKER et FERRAR, 1998). Certains acides, organiques ou non tels l'acide malique, tartrique, malonique, phosphorique ou chlorhydrique peuvent également être employés (MAC CORD et KILARA, 1983 ; ZEMEL *et al.*, 1990). Cependant, leur prix et leur effet sur la qualité gustative des aliments représentent leurs principaux inconvénients (WEEMAES *et al.*, 1999a).

#### **2.2.2.3. Inhibiteurs agissant sur le site de fixation du substrat phénolique.**

Dans ce groupe (figure 7) se trouvent les acides carboxyliques et plus particulièrement les acides benzoïques, cinnamiques et phénylalcanoïques. Ce sont le plus souvent des inhibiteurs compétitifs des PPO. Leur pouvoir inhibiteur tient à leur similitude structurale avec les phénols-substrats et à leur faible caractère oxydable (MAC EVILY *et al.*, 1992b). Toutefois, le type d'inhibition observé peut varier selon le substrat ou la source enzymatique (JANOVIKZ-KLAPP *et*



**Figure 8 :** Structure de quelques aldéhydes inhibant les PPO.



**Figure 9 :** Structure de la liaison formée entre le groupement aldéhyde d'un inhibiteur et un groupement aminé porté par l'enzyme.

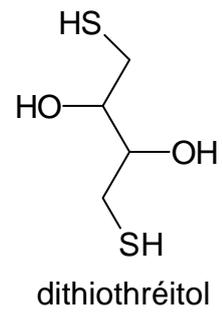
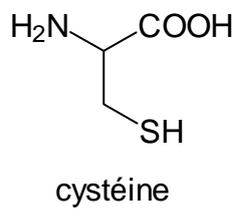
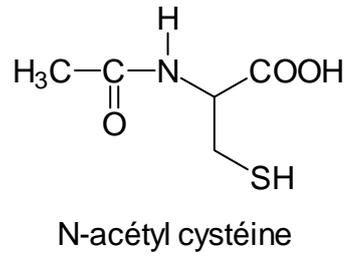
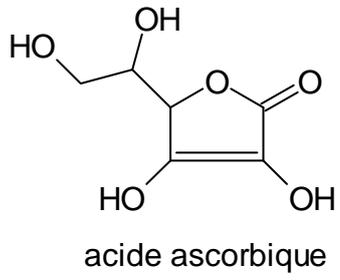
*al.*, 1990a ; MENON *et al.*, 1990). Ces derniers auteurs ont également montré que la forme protonnée des acides étaient responsables de l'inhibition, après avoir observé que celle-ci était accentuée à pH acide. Généralement, les dérivés de l'acide cinnamique ont un pouvoir inhibiteur plus élevé que ceux des deux autres séries citées (SAPERS, 1993 ; KERMASHA *et al.*, 1993).

L'action des composés résorcyliques, substitués en position 4, vis-à-vis du brunissement a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux (MAC EVILY *et al.*, 1992b ; TAYLOR et NORDLEE, 1993 ; MARTINEZ et WHITAKER, 1995 ; FAYAD-EL DAHOUK, 1998 ; SHIMIZU *et al.*, 2000). Ces inhibiteurs naturels ont été identifiés par MAC EVILY *et al.* (1991) dans une préparation protéasique de figue appelée ficine. L'efficacité des composés résorcyliques est augmentée par la longueur de la chaîne carbonée substituée sur le cycle aromatique (MONSALVE-GONZALEZ *et al.*, 1995). L'effet anti-brunissement d'un dérivé de synthèse, le 4-hexylrésorcinol, a été prouvé chez la crevette (OTWELL *et al.*, 1992), la pomme (MONSALVE-GONZALEZ *et al.*, 1993 et 1995 ; LUO et BARBOSA-CANOVAS, 1994), le champignon (DAWLEY et FLURKEY, 1993a et b), la pomme de terre (WHITAKER et LEE, 1995) et la laitue (CASTANER *et al.*, 1996). Selon FAYAD-EL DAHOUK (1998) le 4-hexylrésorcinol est un inhibiteur compétitif de la PPO de pomme et il provoque également une dénaturation irréversible de l'enzyme au cours de laquelle il est consommé. Le 4-hexylrésorcinol ne présentant pas de toxicité, il entre dans la composition de produits de traitements (Everfresh) employés industriellement sur les crevettes (WALKER et FERRAR, 1995).

Citons également l'acide kojique, l'acide oxalique et la tropolone qui, outre leur pouvoir chélateur de métaux, sont des inhibiteurs compétitifs ou mixtes des PPO (KAHN et ANDRAWIS, 1985 ; KAHN *et al.*, 1995 ; TONG *et al.*, 1995).

#### ***2.2.2.4. Inhibiteurs agissant sur des sites autres que le site de fixation du substrat phénolique.***

Ce groupe d'inhibiteurs non compétitifs est constitué principalement d'aldéhydes extraits de végétaux auxquels s'est intéressée, notamment, une équipe de chercheurs américains. Citons le cuminaldéhyde présent dans les graines de cumin (KUBO et KINST-HORI, 1998a), l'ansaldéhyde présent dans les graines d'anis (KUBO et KINST-HORI, 1998b), le 2-hydroxy-4-méthoxybenzaldéhyde extrait de racines de plantes médicinales (KUBO et KINST-HORI, 1998c) et les (2E)-alkenals (aldéhydes aliphatiques  $\alpha,\beta$ -insaturés) issues de l'huile d'olive (KUBO et KINST-HORI, 1999a) dont les structures sont schématisées sur la figure 8. L'inhibition est due à l'attaque par le groupement aldéhyde d'amines primaires présents sur les chaînes latérales des PPO, conduisant à la formation d'une base de Schiff stable (figure 9). De plus, l'hexanal sous forme de gaz



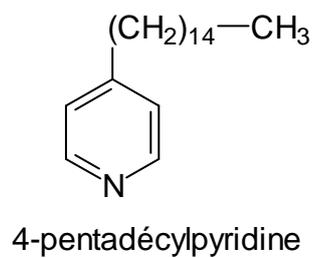
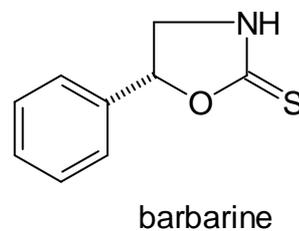
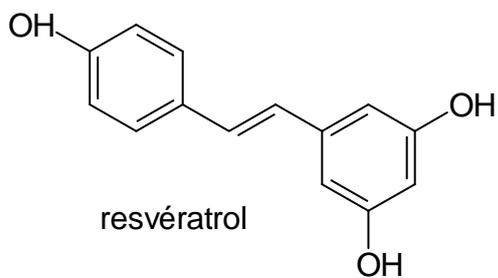
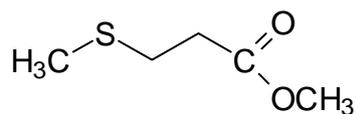
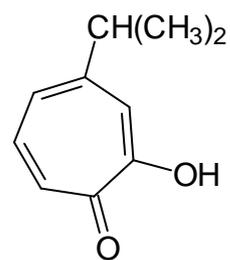
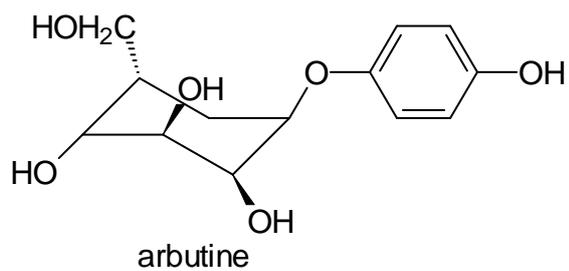
**Figure 10 :** Structure de quelques agents réducteurs ou piègeurs de quinones.

s'est montré très efficace contre le brunissement de tranches de pommes (LANCIOTTI *et al.*, 1999). Outre son effet direct sur la PPO, l'hexanal est capable d'inhiber la croissance des microorganismes lorsque les pommes sont placées sous atmosphère contrôlée.

### **2.2.3. Traitements chimiques agissant sur les produits de l'oxydation.**

L'acide ascorbique (figure 10) et ses dérivés sont bien connus pour réduire les quinones et régénérer ainsi les phénols parentaux (VAROQUAUX et SARRIS, 1979 ; NICOLAS *et al.*, 1994 ; WALKER et FERRAR, 1995 ; MARTINEZ et WHITAKER, 1995). Son faible coût et ses propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires en font un traitement alternatif de choix aux sulfites. L'acide ascorbique est employé contre le brunissement de la pomme, l'avocat, la poire, la banane et la pomme de terre, en combinaison avec l'acide citrique, le métabisulfite de sodium (0,05 %) et l'EDTA (ALMEIDA et NOGUEIRA, 1995), ainsi que les ions chlorures (de POIX *et al.*, 1980) et le 4-hexylrésorcinol (MONSALVE-GONZALEZ *et al.*, 1993). Cependant, son oxydation par les quinones en acide déhydroascorbique rend son effet anti-brunissement temporaire (VAROQUAUX et SARRIS, 1979 ; GOLAN-GOLDHIRSH et WHITAKER, 1984a et b). En outre, selon ESPIN *et al.* (2000), la PPO de poire présenterait une activité ascorbate oxydase en présence de SDS. Certains dérivés de l'acide ascorbique tels que l'acide ascorbique-2-phosphate, l'acide ascorbique triphosphate ou l'ascorbyl palmitate permettent de retarder plus longuement l'apparition du brunissement de tranches ou de jus de fruits que l'acide ascorbique lui-même (SAPERS *et al.*, 1989 ; NICOLAS *et al.*, 1994 ; WALKER et FERRAR, 1998). L'efficacité de ces dérivés tient essentiellement à leur caractère oxydable plus faible que l'acide ascorbique.

Les composés contenant des groupements sulfhydryl (figure 10) sont également reconnus pour leur effet anti-brunissement (SAPERS, 1993 ; NICOLAS *et al.*, 1994 ; FRIEDMAN et BAUTISTA, 1995 ; FRIEDMAN, 1996 ; WALKER et FERRAR, 1998). La littérature rapporte principalement des données concernant l'effet d'un acide aminé soufré : la cystéine (FORGET-RICHARD, 1992 ; MAC EVILY *et al.*, 1992b ; SAPERS, 1993 ; NICOLAS *et al.*, 1994). Cet acide aminé piège les *o*-quinones sous forme de produits d'addition stables et incolores, lesquels sont des inhibiteurs compétitifs de la PPO de pomme (RICHARD *et al.*, 1991). Cependant, ces composés d'addition peuvent également entrer dans des réactions d'oxydation couplées avec les *o*-quinones en excès conduisant, d'une part au phénol parental et d'autre part à la formation de produits fortement colorés. Selon NAPPI et VASS (1994), la cystéine inhiberait l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon. La N-acétylcystéine est également considérée comme un excellent inhibiteur du brunissement des tranches de pommes et de pommes de terre (MOLNAR-PERL et FRIEDMAN,



**Figure 11 :** Structure de quelques composés inhibiteurs présents dans des extraits naturels de végétaux.

1990a ; FRIEDMAN et BAUTISTA, 1995 ; BUTA *et al.*, 1999) ainsi que des jus de fruits (MOLNAR-PERL et FRIEDMAN, 1990b).

### 2.3. INHIBITION DU BRUNISSEMENT PAR DES EXTRAITS D'ORIGINE NATURELLE.

Depuis peu, on note dans la littérature un nombre croissant de nouveaux inhibiteurs (figure 11) provenant de plantes médicinales les plus variées. Ainsi l'arbutine et l'hinokitiol (SAKUMA *et al.*, 1999), la barbarine (5-phényl-2-oxazolidinethione) extraite de *Barbarea orthocerus* (SEO *et al.*, 1999), l'acide gallique et ses dérivés alkylés extraits de plantes médicinales africaines (KUBO *et al.*, 2000), des dérivés de flavonols et le resveratrol extraits de racines d'*Artocarpus gomezianus* (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 2000) apparaissent comme des inhibiteurs compétitifs des tyrosinases. Certains microorganismes synthétisent également des inhibiteurs. Citons deux inhibiteurs compétitifs classiques d'origine fongique : l'acide fusarique et la 4-pentadécylpyridine (FUCHS et SPITELLER, 1997 ; FERRAR et WALKER, 1999) qui sont cependant toxiques. L'acide kojique sécrété par différentes espèces d'*Aspergillus* et de *Penicilium* est également un inhibiteur compétitif des polyphénoloxydases et un agent réducteur de quinones (FUCHS et SPITELLER., 1997).

Certains peptides naturels contenant un résidu cystéinyl sont également capables de piéger les quinones et d'inhiber très efficacement le brunissement. C'est le cas du dipeptide acide glutamique-cystéine, présent dans les préparations commerciales de papaine (RICHARD-FORGET *et al.*, 1998) et du glutathion, un tripeptide L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine, présent notamment dans le raisin (GOLAN-GOLDHIRSH et WHITAKER, 1984a ; MOLNAR-PERL et FRIEDMAN, 1990a et b ; FRIEDMAN et BAUTISTA, 1995 ; JIANG *et al.*, 1999).

OSZMIANSKI et LEE (1990) rapportent qu'un peptide de 600 Daltons contenu dans le miel serait capable d'inhiber fortement le brunissement enzymatique de tranches de pommes en agissant notamment comme un inhibiteur non compétitif faible de la PPO. Ce peptide piègerait également les quinones de la même manière que la cystéine. En outre, CHEN *et al.* (2000) attribuent l'efficacité anti-brunissement du miel à sa richesse en antioxydants tels que l'acide ascorbique, les flavonoïdes et l' $\alpha$ -tocophérol.

Le jus d'ananas est également reconnu pour son efficacité anti-brunissement (BENNION, 1990 ; LOZANO-DE-GONZALEZ *et al.*, 1993). Outre la présence d'acide citrique et d'acide ascorbique, un ester d'acide organique soufré (l'acide 3-(méthylthio)propanoate de méthyle) serait directement responsable de cette efficacité (BENNION, 1990).

## 2.4. INHIBITION DU BRUNISSEMENT PAR DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES.

Les préparations enzymatiques font, depuis longtemps, partie des additifs employés dans l'industrie agroalimentaire (REED et UNDERKOFER, 1966 ; POULTER et CAYGILL, 1985). Aussi, l'emploi d'extraits enzymatiques d'origine végétale, fongique ou bactérienne apparaît comme une nouvelle alternative aux sulfites (LABUZA *et al.*, 1990). Les enzymes ont l'avantage d'être d'origine naturelle, non toxiques, mais leur prix est généralement élevé, principalement lorsqu'un haut degré de pureté est requis.

### 2.4.1. Préparations de protéases.

Certaines préparations protéasiques sont reconnues pour avoir une efficacité anti-brunissement (LABUZA *et al.*, 1990 ; TAOUKIS *et al.*, 1990 ; MAC EVILY *et al.*, 1992b). C'est le cas des préparations de ficine, la bromélaïne, l'actinidine et la papaine ; toutes sont commercialisées (à l'exception de l'actinidine) et proviennent respectivement du latex de figue, de jus d'ananas, de jus de kiwi et de latex de papaye. Ces préparations contiennent des sulfhydryl protéases nommées de la même manière que la préparation qui les contient.

#### 2.4.1.1. La ficine.

Cette préparation enzymatique inhibe aussi efficacement que les sulfites, dans certaines conditions expérimentales, le brunissement de crevettes et de pommes de terre pelées et tranchées (LABUZA *et al.*, 1990 ; TAOUKIS *et al.*, 1990 ; TAYLOR et NORDLEE, 1993 ; NICOLAS *et al.*, 1994 ; MARTINEZ et WHITAKER, 1995). Très rapidement, MAC EVILY *et al.* (1992b) isolent les composés responsables de l'inhibition de la PPO à l'aide de techniques chromatographiques classiques puis les identifient par la technique de RMN du proton et du carbone associée à la spectrométrie infra-rouge. Ces auteurs démontrent alors que les agents inhibiteurs ne sont pas les protéases mais l'acide 2,4-dihydroxydihydrocinnamique (acide résorcilique) et deux de ses dérivés présents dans les préparations, à savoir la *bis*-(2,4-dihydroxydihydrocinnamoïl)-putrécine et la *bis*-(2,4-dihydroxydihydrocinnamoïl)-spermidine. Suite à ces résultats, de nombreux auteurs se sont intéressés à l'effet des analogues structuraux de synthèse que sont les dérivés du résorcinol. MAC

EVILY *et al.* (1992a) ont montré que le pouvoir inhibiteur du résorcinol augmentait avec le caractère hydrophobe de la substitution en position 4. Le 4-hexylrésorcinol apparaissait alors comme le plus efficace parmi les dérivés solubles dans les solutions aqueuses. Rappelons que ce composé est un inhibiteur compétitif des PPO et qu'il est également capable de dénaturer ces enzymes (FAYAD-EL DAHOUK, 1998). Des travaux menés au laboratoire semblent indiquer que le 4-hexylrésorcinol soit affecte l'activité monophénolasique de la PPO d'abricot du fait d'une forte affinité de l'enzyme pour ce phénol et d'une vitesse d'hydroxylation lente (BESSON-VAYSSIER, communication personnelle).

#### **2.4.1.2. La bromélaïne.**

Si, d'après LABUZA *et al.* (1990), une préparation commerciale de bromélaïne n'a aucun effet anti-brunissement sur les crevettes, les tranches de pomme ou de pomme de terre, BALLS et HALE (1935) puis BENNION (1990) ont montré que le jus d'ananas retardait le brunissement de fruits et légumes. Selon BENNION (1990), un ester d'acide organique soufré (l'acide 3-(méthylthio)propanoïque estérifié) présent dans le jus d'ananas serait responsable de l'inhibition du brunissement. LOZANO-DE-GONZALEZ *et al.* (1993) confirment cette hypothèse en écartant toute implication des protéases dans ce phénomène et en indiquant que les échantillons ne contiennent que des composés de masses moléculaires inférieures à 10 kDaltons. MOLINE *et al.* (1999) affirment que le jus d'ananas frais retarde plus efficacement le brunissement de tranches de bananes qu'une solution d'acide ascorbique. Cependant, cet effet serait dû, selon ces derniers auteurs, à la présence d'acide citrique et ascorbique et de sucre dans le jus plutôt qu'à des composés soufrés. Ne présentant aucune toxicité, le jus d'ananas est employé industriellement en combinaison avec l'acide citrique pour la préparation de salades de fruits fraîches.

#### **2.4.1.3. L'actinidine.**

LABUZA *et al.* (1990) ont observé que le brunissement de fruits en contact avec des tranches de kiwi était fortement retardé. Ces auteurs ont alors supposé que l'actinidine, une puissante protéase présente dans les kiwis, était capable de cliver les PPO. Aucune étude précisant cet effet n'a été réalisée à notre connaissance.

#### **2.4.1.4. La papaïne.**

Dès 1935, un brevet est déposé par BALLS et HALE pour l'emploi de jus de papaye pour prévenir le brunissement de fruits et légumes coupés. LABUZA *et al.* (1990) ont observé ultérieurement que l'emploi d'une solution contenant 2 % de préparation enzymatique permettait de retarder de huit heures le brunissement de tranches de pommes stockées à 24°C avec une efficacité supérieure à celle des sulfites dans certaines conditions expérimentales. Un effet anti-brunissement était également noté sur des tranches de pommes de terre stockées à 4°C. Les auteurs supposent que les sulfhydryl-protéases présentes dans la préparation dégradent les PPO. LUO *et al.* (1992) ajoutent que ces protéases préservent les structures cellulaires de tranches de pommes en clivant les enzymes responsables de la dégradation des parois pectocellulosiques. Dès 1998, RICHARD-FORGET *et al.* ont montré qu'une préparation commerciale de papaïne (MERCK) contient de la cystéine et un dipeptide acide glutamique-cystéine, capables de piéger les quinones sous forme de thioéthers stables et incolores. La teneur en composés thiols était estimée à 10 mmole.g<sup>-1</sup> de préparation. Cette teneur tient compte de la cystéine et du bisulfite introduits au cours du procédé de fabrication de la préparation enzymatique en tant qu'agents stabilisants (REED et UNDERKOFER, 1966). D'autre part, RICHARD-FORGET *et al.* (1998) notent la présence d'agents inactivant la PPO de scarole, dont la nature reste à être déterminée.

La papaïne (EC.3.4.22.2) est une cystéine-protéase de 23,4 kDa généralement extraite à partir de latex de papaye verte (*Carica papaya* L.) non mature (BROCKLEHURST *et al.*, 1981 ; POULTER et CAYGILL, 1985). Elle catalyse notamment l'hydrolyse de la liaison peptidique entre deux acides aminés X-Y lorsque l'acide aminé X est lui-même précédé d'un résidu phénylalanine, valine, isoleucine ou leucine, ce qui révèle une large spécificité de cette enzyme. La papaïne serait également capable de catalyser l'hydrolyse d'esters (BROCKLEHURST *et al.*, 1981). Au cours de la catalyse, une liaison thio-éther est formée entre la chaîne latérale de la cystéine avec le groupement acyle du substrat. Les préparations commerciales d'extraits bruts de papaïne sont obtenues par coagulation du latex frais durant 10 minutes sous agitation, suivie d'un simple séchage dans des fours ventilés ou par lyophilisation (REED et UNDERKOFER, 1966). Outre la papaïne, ces préparations contiennent généralement de la chymopapaïne, une peptidase A (BROCKLEHURST *et al.*, 1981), différentes classes de chitinases (AZARKAN *et al.*, 1997) ainsi que des lipases (CARO *et al.*, 2000). Les préparations commerciales de papaïne sont, en outre, riches en composés volatils et odorants tels que le linalol (un alcool à longue chaîne aliphatique) le phényl acétonitrile ou l'isothiocyanate de benzyle (TANG, 1973 et 1974 ; FLATH et FORREY, 1977, WINTERHALTER, 1991).

Les préparations commerciales de papaïne sont très largement employées dans l'industrie agro-alimentaire pour leurs propriétés protéolytiques et anti-fongiques (BROCKLEHURST *et al.*, 1981 ; POULTER et CAYGILL, 1985 ; GIORDANI *et al.*, 1991). Leur emploi permet principalement l'attendrissement de viandes, mais ces préparations peuvent être également ajoutées au cours de l'élaboration de la bière ou employées dans l'industrie de la pêche (BROCKLEHURST *et al.*, 1981 ; DIAZ *et al.*, 1996). Cependant, des cas d'allergie au latex de papaye ont été observés cliniquement (SOTO-MERA *et al.*, 2000). L'emploi de papaïne dans l'alimentation est alors interdit aux Etats-Unis ainsi que dans l'élaboration de la bière en Allemagne. D'autre part, la papaïne commerciale présente une forte odeur désagréable. Pour pallier ce problème, on tente de sélectionner de nouvelles variétés de papayes dont le latex est riche en papaïne, peu odorant et suffisamment stable (KLAHORST, 1998).

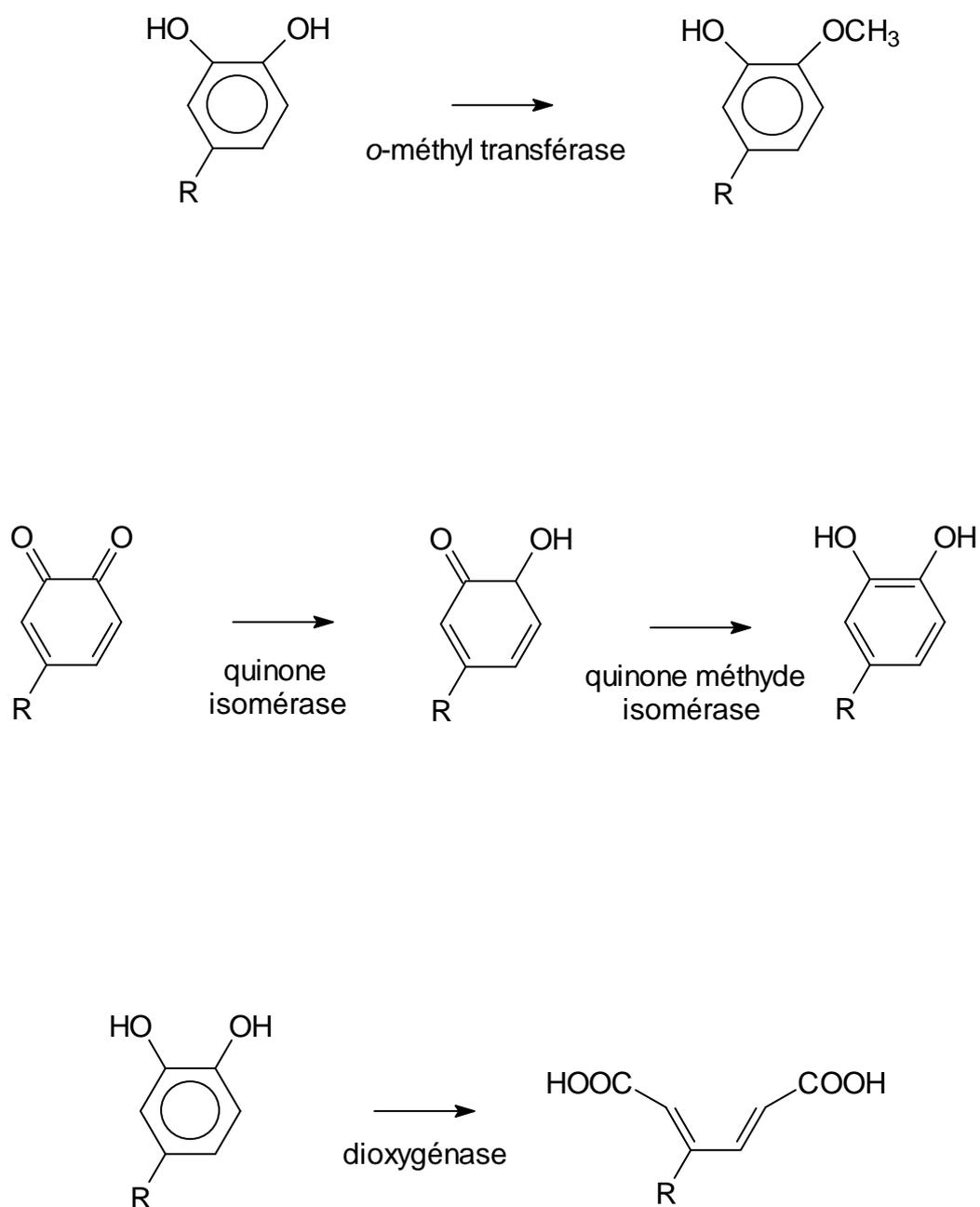
## **2.4.2. Autres enzymes.**

### **2.4.2.1. L'*o*-méthyl transférase.**

FINKLE et NELSON (1963) ont proposé l'emploi d'une *o*-méthyl transférase comme moyen de prévention du brunissement de jus de pomme. Cette méthode implique la méthylation enzymatique d'un *o*-diphénol conduisant à la formation d'un dérivé méthyl-éther (voir figure 12). Ainsi, l'acide caféique est-il converti en acide férulique (inhibiteur de la PPO) et l'acide chlorogénique en acide feruloylquinique (MAC EVILY *et al.*, 1992b). Cependant cette enzyme n'est active qu'à pH proche de la neutralité ce qui rend son emploi difficile sur des fruits ou jus de fruits (LABUZZA *et al.*, 1990). En outre, son coût reste trop élevé (MAC EVILY *et al.*, 1992b).

### **2.4.2.2. Les quinones isomérases.**

SUGUMARAN *et al.* (2000) ont isolé des activités quinone isomérase et quinone méthide isomérase associées aux tyrosinases chez les insectes de l'espèce *Calliphora*. La première de ces deux activités serait capable de réduire les quinones d'*N*-acétyldopamine en semi-quinone laquelle serait à son tour réduite sous l'action de la quinone méthide réductase conduisant à la régénération du phénol parental (figure 12). La structure de ce complexe enzymatique d'environ 620-680 kDa reste à être déterminée, ainsi que sa spécificité vis-à-vis des composés phénoliques afin d'envisager l'emploi d'isomérases recombinantes pour régénérer les phénols oxydés au cours de brunissement.



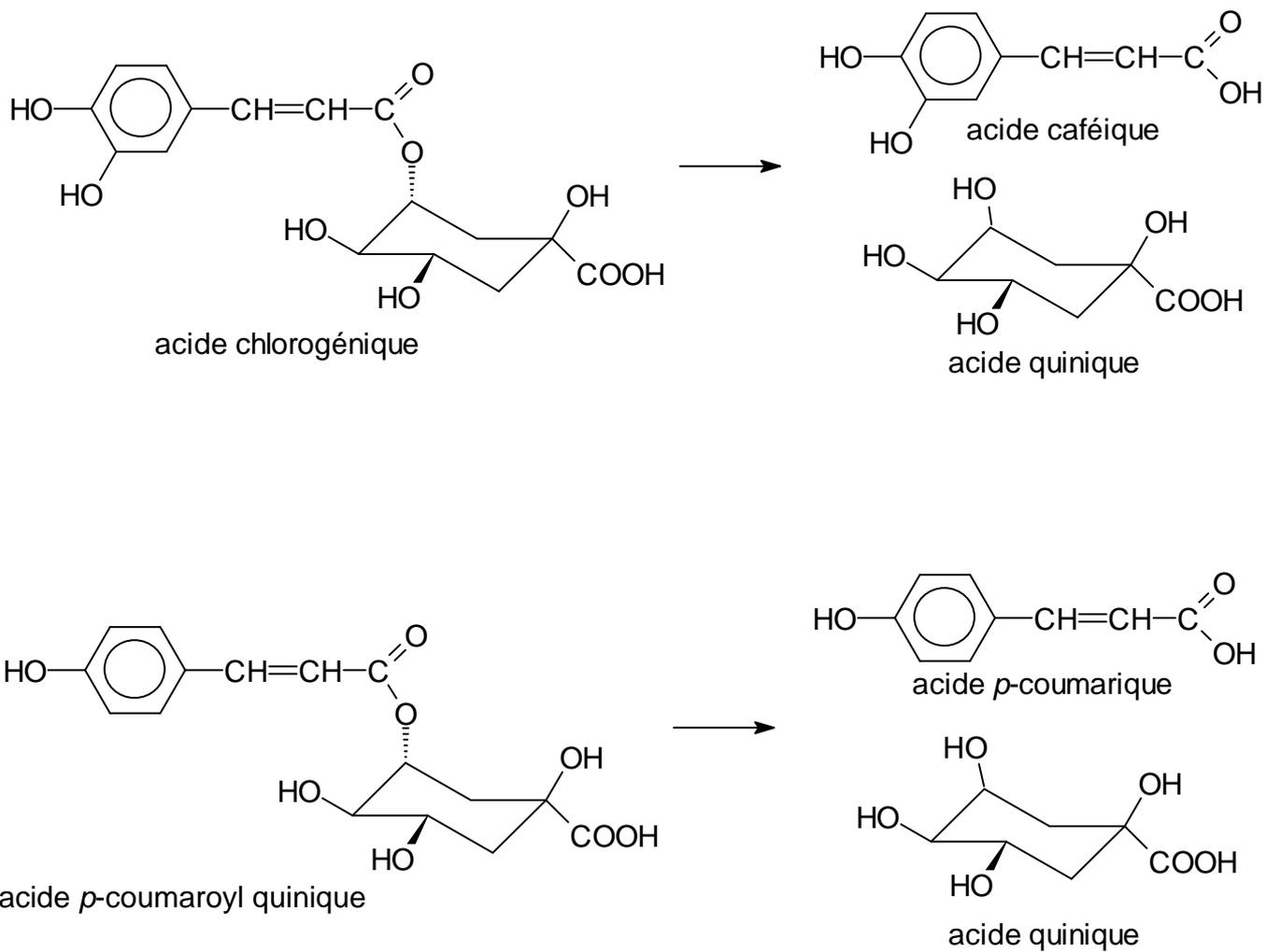
**Figure 12 :** Réactions catalysées par différentes enzymes de préparations commerciales ou non.

#### **2.4.2.3. Les dioxygénases.**

L'emploi d'une protocatéchuate 3,4-dioxygénase a été proposé par KELLY et FINKLE (1969) pour inhiber le brunissement via la dégradation des phénols-substrats. Cette enzyme catalyse l'oxydation de certains *o*-diphénols conduisant aux diacides carboxyliques correspondants (LABUZZA *et al.*, 1990). Le traitement de jus de pomme par une préparation enzymatique d'origine bactérienne en combinaison avec l'acide ascorbique permet en effet d'inhiber le brunissement. Cependant, la vitesse de clivage de l'acide chlorogénique, l'un des phénols majoritairement impliqué dans le brunissement enzymatique, serait très lente (MAC EVILY *et al.*, 1992b).

#### **2.4.2.4. L'hydroxycinnamoyl quinate estérase.**

L'une des méthodes de lutte contre le brunissement enzymatique est de substituer via une catalyse enzymatique, les substrats naturels des PPO par des substrats difficilement oxydables ou des inhibiteurs. Dans cette optique, LEWIS et THOMPSON (1961) ont répertorié des souches d'*Aureobasidium pullulans* (levure noire) et d'*Aspergillus* capables de synthétiser une activité chlorogénicase sous l'effet inducteur de l'acide *p*-hydroxybenzoïque. Cette chlorogénicase catalyse l'hydrolyse de l'acide chlorogénique conduisant à la formation d'acide caféique et d'acide quinique (figure 13). Parallèlement, WALKER (1969) a observé une accumulation d'acide caféique et d'acide *p*-coumarique ainsi qu'une intense activité pectinolytique au niveau de tissus de pommes infectées par *Penicillium expansum* autrement nommé « Blue Mold ». Selon cet auteur, cette accumulation est le résultat d'hydrolyses enzymatiques et provoque l'absence de brunissement au niveau des tissus infectés. SCHÖBEL et POLLMANN (1980) puis VAROQUAUX *et al.* (1982) confirmeront que ces différents microorganismes sécrètent une enzyme : la chlorogénicase, alors renommée hydroxycinnamoyl quinate estérase (HCQE). Les acides cinnamiques, produits de l'hydrolyse, se caractérisent par une forte affinité pour les PPO et par un faible caractère oxydable (WALKER, 1976 ; KERMASHA *et al.*, 1993). Ainsi, JANOVITZ-KLAPP *et al.* (1989) ont-ils montré que l'oxydation de 4-méthylcatéchol par la PPO de pomme était fortement inhibée par l'acide caféique. Des extraits commerciaux d'enzymes pectinolytiques issus d'*Aspergillus niger* apparaissent alors comme d'importantes sources d'HCQE. La masse moléculaire apparente de l'enzyme (estimée par chromatographie d'exclusion) est controversée puisqu'estimée à 240 kDa par SCHÖBEL et POLMANN (1980) puis à 40 kDa par VAROQUAUX (communication personnelle). Son point isoélectrique serait situé autour de pH 4-4,5 (SCHÖBEL et POLMANN, 1980). L'affinité (estimée



**Figure 13** : Réactions catalysées par l'HCQE.

par la valeur de  $K_m$ ) de l'enzyme pour l'acide chlorogénique varie de 0,7 à 2 mM et l'acide *p*-coumaroyl quinique apparaît également comme substrat de l'HCQE avec une valeur de  $K_m$  de 0,66 mM (VAROQUAUX *et al.*, 1982). Les valeurs de pH optimal d'hydrolyse de l'acide chlorogénique à 35°C comprises entre 4,5 et 7 rendent l'utilisation possible de cette enzyme sur des fruits peu acides.

Plus récemment, des études en milieu modèle ont montré qu'un extrait d'HCQE inhibait efficacement la vitesse initiale d'oxydation (dosée par spectrophotométrie) de catéchine et d'acide chlorogénique catalysée par la tyrosinase de champignon (MADANI *et al.*, 1997), alors que l'extrait d'HCQE était 100 fois moins actif que la tyrosinase présente. La même observation était réalisée en présence de certains phénols substrats de la tyrosinase. Des dosages polarographiques ont indiqué que seules les activités catécholasique et laccasique étaient affectées (MADANI *et al.*, 1999a). Or ces auteurs n'ont pas proposé de mécanisme précis d'inhibition, mais il est possible que l'extrait d'HCQE employé soit contaminé par des inhibiteurs de la tyrosinase. MADANI *et al.*, (1999b) ont indiqué également que l'ajout d'HCQE modifiait l'évolution de la couleur des incubats.

Les sources d'HCQE sont des préparations commerciales de pectinases d'*Aspergillus niger* à usage œnologique, disponibles sous forme de poudres déshydratées. Les pectinases présentes dans ces préparations permettent d'aider la clarification des vins rouges ou blancs ou d'améliorer l'extraction des anthocyanes. Les activités pectinolytiques dont les principales sont les pectine méthylestérases (PME) et les polygalacturonases (PG), sont susceptibles de provoquer un ramollissement indésirable et par la suite une accélération du brunissement des fruits et légumes traités. Des tentatives de séparation de l'activité HCQE par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium se sont révélées infructueuses (MADANI *et al.*, 1997). La même équipe semble avoir mis au point une séparation sur colonne de chromatographie échangeuse d'anions (MADANI *et al.*, 1999a), mais les résultats de celle-ci ne sont pas publiés. Un protocole de purification de l'activité HCQE reste donc à développer.

## 2.5. NOUVELLES METHODES PHYSIQUES DE PREVENTION DU BRUNISSEMENT.

Les méthodes physiques conventionnelles visent principalement soit à diminuer la teneur des aliments en oxygène moléculaire (premier substrat des PPO) grâce à la conservation sous atmosphères contrôlées soit à inactiver les PPO par la chaleur ou le froid (SAPERS, 1993 ; WALKER et FERRAR, 1995). L'efficacité de ces traitements est cependant limitée par des inconvénients non négligeables tels que l'apparition de métabolismes anaérobies modifiant les

qualités organoleptiques des aliments, ou la résistance des PPO aux écarts de températures tolérés par les tissus végétaux ou fongiques (ROY *et al.*, 1995).

BALDWIN *et al.* (1996) ont proposé de recouvrir des tranches de pomme ou de pomme de terre d'une couche comestible à base de cellulose riche en antioxydants et en agents acidulants. Cette méthode permet principalement de limiter le contact entre l'oxygène de l'air et les aliments. Elle apparaît en effet plus efficace que les trempages des tranches dans diverses solutions au cours desquels l'aliment perd sa fermeté (SAPERS, 1993). L'application de solutions à base de miel, riches en antioxydants, a été également envisagée sur les fruits tranchés, mais ces traitements apportent des modifications des qualités gustatives (CHEN *et al.*, 2000).

Une voie de recherche consiste à associer les traitements par la chaleur à une exposition des aliments sous haute pression hydrostatique. Selon CHEFTEL (1992), certaines enzymes subissent une dénaturation irréversible lorsqu'elles sont exposées à des pressions supérieures à 100 MPa. Ainsi, les PPO partiellement purifiées de pomme, de raisin, de poire et d'avocat sont-elles partiellement dénaturées (10 à 60 % de l'activité initiale est perdue) lorsqu'elles sont exposées durant 15 secondes à des pressions allant de 100 à 900 MPa et à des températures atteignant 60°C (WEEMAES *et al.*, 1998 et 1999b ; RASTOGI *et al.*, 1999). La tyrosinase de champignon ne semble cependant pas affectée par ces traitements (WEEMAES *et al.*, 1999a ; MATSER *et al.*, 2000). Toutefois, la température, la pression et la durée du traitement restent des paramètres à optimiser pour une meilleure efficacité. Certains auteurs ont affirmé que ces traitements, associés ou non à des inhibiteurs chimiques classiques, permettaient d'inhiber considérablement le brunissement de purées de tomates fraîches (HERNANDEZ et CANO, 1998), de purées d'avocat (LOPEZ-MALO *et al.*, 1998) et de champignons (WEEMAES *et al.*, 1999a ; MATSER *et al.*, 2000). En outre, ces traitements inhibent les activités peroxydasiques de tomate (HERNANDEZ et CANO, 1998) et de raisin (RASTOGI *et al.*, 1999).

Parmi les nouvelles méthodes physiques affectant directement les PPO, les rinçages rapides à l'eau chaude (Hot Water Brushing) paraissent aussi efficaces sur les litchis que les fumigations au sulfite (LICHTER *et al.*, 2000). Cependant, cette méthode qui implique le passage des fruits pendant quelques secondes dans un tambour rotatif ne paraît pas applicable aux fruits plus sensibles aux chocs mécaniques.

Certains auteurs ont tenté d'adapter les méthodes de chauffage par les micro-ondes généralement employées pour la pasteurisation ou le blanchiment des produits de 5<sup>ème</sup> gamme (TAJCHAKAVIT et RAMASWAMY, 1997 ; DEVECE *et al.*, 1999). Selon RODRIGUEZ-LOPEZ *et al.* (1999), une exposition de la tyrosinase de champignon durant 15 secondes à une radiation de 22 W.cm<sup>-3</sup> suffit à inhiber totalement l'enzyme. La température de l'extrait reste inférieure à 55°C au

cours de l'expérience. Cette méthode paraît selon ces mêmes auteurs plus efficace qu'une méthode conventionnelle de blanchiment, mais elle reste à être optimisée.

A l'issue de ce chapitre, nous espérons avoir montré que si les connaissances sur les propriétés des polyphénoloxydases et plus généralement sur les mécanismes impliqués dans le brunissement enzymatique ont très largement progressé, la recherche de traitements alternatifs aux sulfites laisse encore de nombreuses lacunes à combler. Nous nous proposons donc d'étudier le mode d'action de d'une préparation commerciale de papaïne et d'un extrait d'HCQE produit par *Aspergillus niger* apparaissant déjà comme d'efficaces inhibiteurs du brunissement.

## MATERIELS ET METHODES

# **1. PURIFICATION PARTIELLE DES DIFFERENTS SYSTEMES ENZYMATIQUES.**

Les protocoles de pré-purification de la PPO de scarole (GOUPY *et al.*, 1994) et du champignon (VAROQUAUX, 1978) comportent deux étapes classiques de purification, à savoir une extraction et une précipitation. Pour l'abricot et la pomme, ces deux étapes sont suivies de l'emploi de méthodes chromatographiques (FORGET-RICHARD, 1992 ; CHEVALIER *et al.*, 1999).

## **1.1. MATERIELS.**

Les carpophores de champignons de Paris (*Agaricus bisporus*) ont été pelés, leurs lamelles retirées, puis découpés. Les tissus vascularisés situés à la base des coeurs de scarole (*Cichorium endivia* L.) ont été séparés et coupés en tranches. Les pommes (*Malus sylvestris*, var. Red One) et les abricots (*Prunus armeniaca*, var Bergeron) ont été récoltés à maturité commerciale, pelés et épépinés (pommes), dénoyautés (abricots), puis découpés et immédiatement plongés dans un bain d'acide ascorbique à 30 mM. Les tissus sont alors rapidement retirés du bain puis immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis lyophilisés et stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **1.2. DOSAGE DE L'ACTIVITE POLYPHENOLOXYDASIQUE.**

Le dosage de l'activité enzymatique se fait par mesure de la consommation d'oxygène dans le milieu réactionnel, à l'aide d'un polarographe enregistreur Hansatech CB1D équipé d'une électrode de Clark placée dans une cellule de 3,5 mL maintenue à  $30^{\circ}\text{C}$ . Le substrat utilisé est le 4-méthylcatéchol (4MC) à une concentration de 20 mM, préparé dans une solution de tampon dont le pH est optimisé selon l'origine de l'extrait enzymatique à doser. La solution de substrat est saturée d'air par barbotage et maintenue à  $30^{\circ}\text{C}$  dans un bain-Marie. Selon WISE et NAYLOR (1985), la concentration en oxygène est alors de 0,22 mM. Après addition de l'extrait enzymatique au milieu réactionnel (2,8 mL de substrat) dans la cuve du polarographe, l'activité polyphénoloxidasique est déterminée par la mesure de la pente initiale de la courbe donnant la variation de la concentration en oxygène en fonction du temps. L'activité est exprimée en katals, soit en moles d'oxygène consommé par seconde.

### 1.3. DOSAGE DES PROTEINES.

Les teneurs en protéines sont évaluées par la méthode de BRADFORD (1976). Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe entre les groupements aminés des protéines et le bleu de Coomassie, absorbant à 595 nm. L'albumine sérique bovine (SAB) est employée comme étalon. Une simple détection des protéines sera également réalisée dans certains cas, sans recourir à la gamme étalon. Cette détection sera désignée par les termes de Bradford qualitatif.

### 1.4. EXTRACTION DES SYSTEMES POLYPHENOLOXYDASIQUES.

Les différentes étapes de purification de chaque système polyphénoloxydasique sont regroupées dans le tableau 2.

Matériel végétal	Extraction (g.mL <sup>-1</sup> ) (poids/vol. de solution d'extraction)	Précipitation au sulfate d'ammonium	durée de la dialyse (h)	chromatographie
Abricot	0,1	30 %	8	hydrophobicité
Pomme	0,12	30 %	8	hydrophobicité
Scarole	0,05	fractionnée 30 et 80 %	12	-
Champignon	0,1	70 %	8	-

**Tableau 2 :** récapitulatif des étapes de pré-purification des différents systèmes polyphénoloxydasiques.

Les différentes extractions de même que toutes les étapes de précipitation au sulfate d'ammonium sont réalisées à 4°C. Le matériel végétal est homogénéisé pendant une minute, à l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax, dans différentes solutions de tampon additionnées d'acide ascorbique, de Triton X100, de PVPP. Les compositions des différents milieux d'extraction sont détaillées dans le tableau 3. Les homogénats sont ensuite centrifugés 40 minutes à 30 000 x g puis filtrés sur étamine ; le filtrat constitue alors **l'extrait brut**.

Végétal	Poids/volume solution de tampon (g/mL)	Solution de tampon	Triton X100	PVPP*	Acide ascorbique
<i>Abricot (Bergeron)</i>	12g/120mL	Mac Ilvaine's pH 7	1%	1 (humide)	30 mM
<i>Pomme (Red One)</i>	12g/100mL	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50mM) pH 7,2	0,5%	1 (humide)	25 mM
<i>Scarole</i>	10g/200mL	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM) pH 7	1%	0,5	15 mM
<i>Champignon</i>	10g/100mL	phosphate-citrate pH 5,5	1%	0,1	40 mM

**Tableau 3:** Récapitulatif des compositions des solutions d'homogénéisation des différents tissus végétaux. \* poids PVPP/poids tissu végétal lyophilisé.

## 1.5. PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

### 1.5.1. Cas de l'abricot et de la pomme.

La précipitation à 30 % de saturation en sulfate d'ammonium se fait par ajout dans l'extrait brut de 164 g.L<sup>-1</sup> de sulfate d'ammonium en présence de 10 g.L<sup>-1</sup> de chlorure de calcium. Après 2 h de repos, le précipité formé est séparé par centrifugation (40 minutes à 21 000 x g pour l'abricot et à 30 000 x g pour la pomme). Le surnageant filtré représente la fraction nommée S<sub>30</sub>A pour l'abricot et S<sub>30</sub>P pour la pomme.

### 1.5.2. Cas de la scarole.

La précipitation comporte deux étapes. Une première précipitation à 30 % de saturation de sulfate d'ammonium est réalisée durant 2 h. Puis l'extrait est centrifugé pendant 30 minutes à 13 000 x g. Le surnageant est filtré (S<sub>30</sub>) puis amené à 80 % de saturation en sulfate d'ammonium par addition de 323 g.L<sup>-1</sup> de ce sel. Après 12 h de repos, le précipité est séparé par centrifugation (30 minutes à 20 000 x g) puis solubilisé dans 10 mL de solution de tampon phosphate mono sodique à

pH 6. Cette fraction (nommée P<sub>80</sub>) est alors dialysée contre un litre d'une solution de tampon phosphate mono sodique (0,1 M) à pH 6 durant 12 h à 4°C. Le dialysat est nommé PPOS.

### **1.5.3. Cas du champignon de Paris.**

L'extrait brut est amené à 70 % de saturation en sulfate d'ammonium par ajout de 436 g.L<sup>-1</sup> de ce sel. Après 2 h de repos, le précipité formé est séparé par une centrifugation de 30 minutes à 30 000 x g. Le culot obtenu est repris avec 15 mL d'une solution de tampon phosphate-citrate à pH 5,5. Cette dernière fraction (nommée P<sub>70</sub>) est ensuite dialysée durant 8 h à 4°C contre 1 l d'une solution de tampon phosphate-citrate à pH 5,5 additionnée d'acide ascorbique (40 mM). Cette dernière fraction est nommée PPOC.

## **1.6. CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTION HYDROPHOBE.**

### **1.6.1. Cas de l'abricot.**

Cinquante mL de S<sub>30</sub> sont amenés dans les conditions d'adsorption sur la matrice d'interactions hydrophobes par dialyse (8 heures maximum) contre une solution de tampon phosphate mono sodique (0,1 M) à pH 6,5 enrichie en KCl (0,6 M) et en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6 M), additionnée d'acide ascorbique (30 mM).

La chromatographie s'effectue à 4°C à l'aide d'une colonne de 5 cm<sup>2</sup> de section (K 26/40). Après équilibrage des 40 mL de gel Phényl-Sepharose CL-4B avec une solution de Tampon phosphate mono sodique (0,1 M) à pH 6,5 enrichie en KCl (0,6 M) et en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6 M), le S<sub>30</sub> dialysé (52 mL) est déposé en tête de colonne. Le lavage de la colonne est réalisé par 240 mL de la solution précédente. L'activité polyphénoloxydasique est ensuite éluee par 150 mL d'une solution de phosphate mono sodique (0,1 M) enrichie en KCl (0,1 M) et en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 M). Enfin, les protéines encore fixées sont éluées par 90 mL d'eau permutée et en milieu eau/éthylène glycol (50/50). L'élution est descendante avec un débit de 120 mL.h<sup>-1</sup>. L'éluat est recueilli par fractions de 7 mL, sur lesquelles sont effectués dosage d'activité et mesure d'absorbance à 280 nm. Les fractions actives réunies sont nommées PPOA.

### **1.6.2. Cas de la pomme.**

Le surnageant filtré S<sub>30</sub> de pomme (soit 85 mL) est amené dans les conditions d'adsorption sur la matrice d'interactions hydrophobes par dialyse (20 heures) à 4°C contre une solution de tampon phosphate mono sodique (50 mM) à pH 6,5 enrichie en chlorure de potassium (0,5 M) et sulfate d'ammonium (0,5 M), additionnée d'acide ascorbique (25 mM).

La chromatographie s'effectue sur le même type de colonne que précédemment et à 4°C. La colonne est remplie de Phényl-Sépharose CL-4B (Pharmacia). Les 50 mL de gel sont ensuite équilibrés avec une solution de tampon phosphate mono sodique 50 mM à pH 6,5 enrichie en chlorure de potassium (0,5 M) et sulfate d'ammonium (0,5 M). Le S<sub>30</sub> dialysé (S<sub>30</sub>D) est déposé en tête de colonne et l'élution des protéines non fixées est réalisée par 230 mL de la solution précédente. L'activité polyphénoloxydasique est ensuite éluée par 210 mL de la même solution diluée cinq fois par une solution de tampon phosphate mono sodique à pH 6,5. Enfin, les protéines encore fixées sont éluées par 120 mL d'eau. L'éluat est recueilli par fractions de 5,4 mL, sur lesquelles un dosage d'activité et une mesure d'absorbance à 280 nm sont effectués. Les fractions actives sont réunies et nommées PPOP.

## **2. INHIBITION DU BRUNISSEMENT PAR UNE PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE.**

### **2.1. EFFET SUR LE BRUNISSEMENT DE BROYATS.**

Le brunissement enzymatique de broyats d'abricot, de pomme et de champignon, est analysé par colorimétrie tristimulaire L\*, a\* et b\*.

Quarante grammes de matériel végétal frais sont homogénéisés avec différentes solutions d'additifs (1 mL de solution par gramme de matériel végétal) pendant 30 secondes à l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax. Les broyats obtenus sont immédiatement placés dans des boîtes de Pétri de 5,5 cm de diamètre (contenance de 26 mL) puis l'évolution de leur couleur mesurée sur une période de 60 minutes à l'aide d'un spectrocolorimètre Minolta CR-1000. Toutes ces opérations sont réalisées à 20°C.

## 2.2. PURIFICATION DES COMPOSES INACTIVATEURS DE LA PPO DE SCAROLE CONTENUS DANS L'EXTRAIT DE PAPAINE.

La première étape de purification a été mise au point par RICHARD-FORGET *et al.* (1998) pour la séparation et l'identification des composés « piègeurs de quinones » à partir d'un extrait brut de papaine. Les différentes étapes du protocole de purification ainsi que les différentes analyses réalisées au cours de celle-ci sont schématisées sur la figure 14.

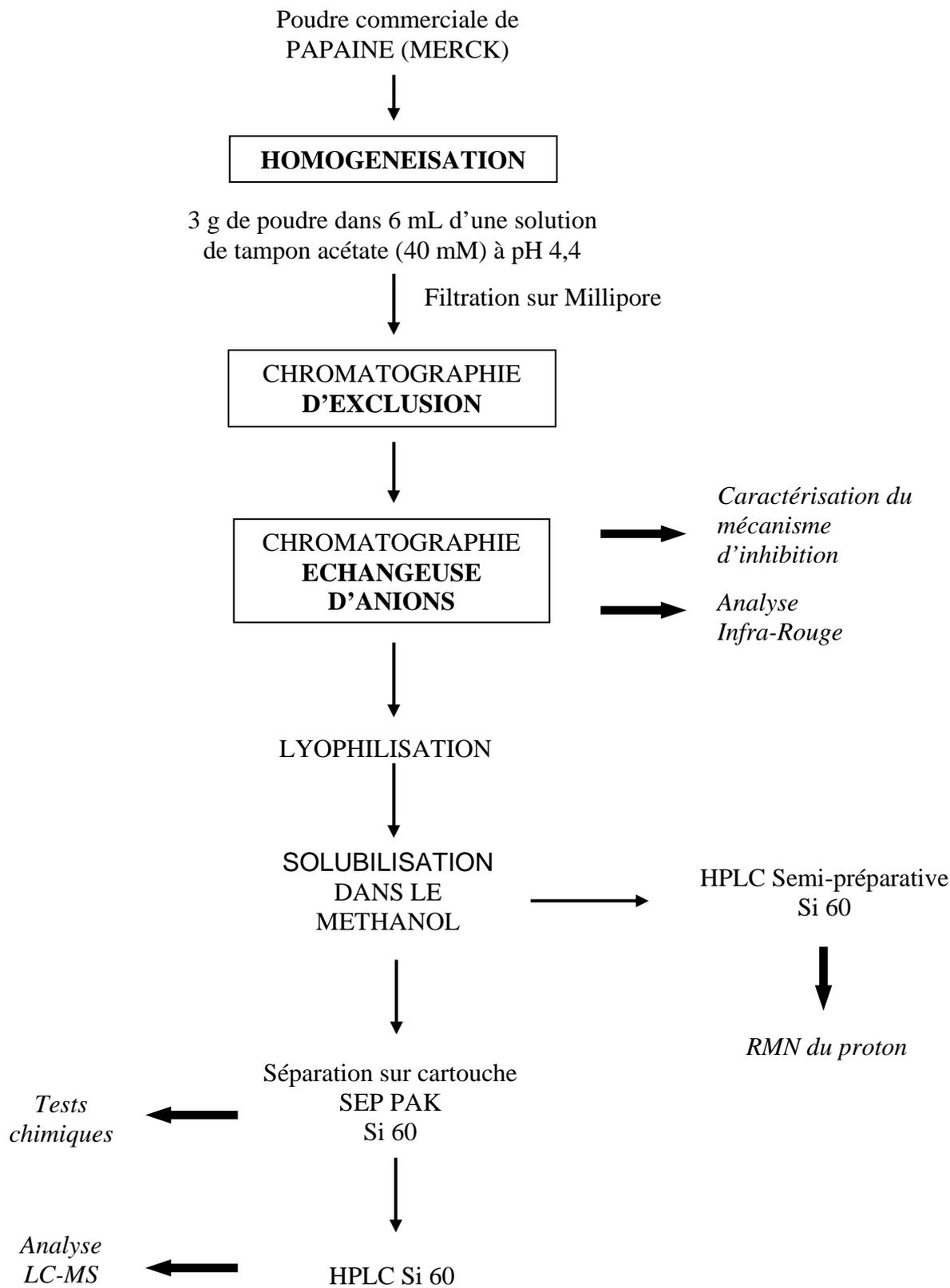
### 2.2.1. Mesure du pouvoir inactivateur des extraits de papaine.

Cinquante  $\mu\text{L}$  d'extrait à doser sont pré-incubés à  $20^\circ\text{C}$  avec  $50 \mu\text{L}$  d'extrait enzymatique de scarole PPOS en présence de  $100 \mu\text{L}$  d'une solution de tampon phosphate-citrate à pH 4 (ou autres pour l'étude de l'effet du pH). L'extrait polyphénoloxydasique de scarole PPOS est choisi pour la détection du pouvoir inactivateur tout au long des étapes de purification des inhibiteurs. Les témoins sont réalisés en pré-incubant  $50 \mu\text{L}$  d'extrait enzymatique avec  $150 \mu\text{L}$  de la solution de tampon phosphate-citrate à pH 4. Cent  $\mu\text{L}$  de l'incubat sont prélevés et l'activité polyphénoloxydasique résiduelle de cette aliquote est immédiatement dosée polarographiquement. Le pouvoir inactivateur est alors exprimé en pourcentage du rapport activité PPO résiduelle sur activité PPO initiale, après 2 minutes de pré-incubation.

### 2.2.2. Dosage des composés piègeurs de quinones.

Les composés « piègeurs de quinones » retardent l'apparition de pigments bruns, au cours de l'oxydation enzymatique des *o*-diphénols, en piégeant les *o*-quinones sous forme d'un composé d'addition incolore (SANADA *et al.*, 1972). La détection de ces composés dans les échantillons se fait selon une méthode utilisée par KAHN (1985), DUDLEY et HOTCHKISS. (1989) et RICHARD-FORGET *et al.* (1991).

Cent  $\mu\text{L}$  d'échantillon à analyser sont ajoutés à 2 mL d'une solution de 4-méthylcatéchol (2 mM) à pH 6 à  $30^\circ\text{C}$  et préalablement saturée en air. Après addition de 1,5 nkatal de PPO de scarole PPOS, l'absorbance à 400 nm est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre à barrette de diode Hewlett-Packard 8452A. On mesure le laps de temps qui se déroule entre l'ajout de la PPO et le début de l'augmentation de l'absorbance à 400 nm (temps de latence).



**Figure 14 :** Protocole de purification des composés inhibiteurs à partir d'une préparation commerciale de papaine. Les différentes analyses physico-chimiques réalisées sont également indiquées.

### **2.2.3. Homogénéisation.**

Trois grammes de Papaine MERCK (30 000 USP-U.mg<sup>-1</sup>) sont homogénéisés dans 6 mL d'une solution de tampon acétate (40 mM) à pH 4,4, durant 30 minutes à 20°C. L'homogénat est filtré au travers d'un filtre Millipore (pores de 0,45 µm de diamètre). Le filtrat est nommé Extrait Brut de papaine (EB).

### **2.2.4. Chromatographie d'exclusion.**

La chromatographie s'effectue à 20°C à l'aide d'une colonne de type K26/40 contenant 80 mL de Biogel P2 équilibré avec une solution de tampon acétate (40 mM) à pH 4,4. La limite d'exclusion du gel est comprise entre 100 et 1800 g.mole<sup>-1</sup>. Six mL de EB sont déposés. L'élution est descendante, avec un débit fixé à 20 mL.h<sup>-1</sup> et suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm de l'éluat. Ce dernier est recueilli par fractions de 3 mL sur lesquelles le dosage des protéines et du pouvoir inactivateur sont effectués. Les fractions inactivatrices sont regroupées et nommées GF.

### **2.2.5. Chromatographie d'échange d'anions.**

Trente mL de gel DEAE-Sephadex A25 sont déposés dans une colonne de 2 cm<sup>2</sup> de section (K16/40) puis équilibrés par 150 mL de la solution de tampon acétate (40 mM) à pH 4,4. Vingt-cinq mL de fraction GF sont déposés en tête de colonne. Le lavage de la colonne se fait à l'aide de 180 mL de solution d'équilibrage. Les agents inactivateurs sont ensuite élués avec 80 mL d'un gradient salin, correspondant à la solution de tampon d'équilibrage enrichie progressivement de 0 à 0,5 M en sulfate d'ammonium. Suite au gradient, les composés encore présents sur la colonne sont élués avec 60 mL de la solution de tampon d'équilibrage additionnée de 0,5 M de sulfate d'ammonium, puis avec 60 mL de cette même solution supplémentée en sulfate d'ammonium (1 M). Le débit est fixé à 40 mL.h<sup>-1</sup> et le volume des fractions recueillies à 2 mL. Le pouvoir inactivateur et l'absorbance à 280 nm sont mesurés sur chaque fraction. Une détection des composés piègeurs de quinones est également réalisée sur chaque fraction. Les fractions inhibitrices réunies sont nommées EI.

La fraction EI est ensuite lyophilisée puis solubilisée dans 100 mL de méthanol ; les composés non dissous sont éliminés par centrifugation de 10 minutes à 10 000 x g. Le surnageant est concentré

20 fois à 27°C à l'aide d'un évaporateur rotatif Rotovapor EL30. L'échantillon obtenu est conservé à -20°C et sera nommé EIL.

#### **2.2.6. Séparation sur cartouche Sep-Pak.**

Une cartouche Sep-Pak Plus (Short Body) Cartridge Silica (taille des particules comprise entre 55 et 105 µm) WATERS est équilibrée par 10 injections de 500 µL d'acétonitrile. 500 µL d'EIL sont déposés en tête de cartouche puis celle-ci est lavée par 10 injections de 500 µL d'acétonitrile. L'élution se fait ensuite par 10 injections de 500 µL d'une solution d'acétonitrile contenant 10 % d'eau Milli Q acidifiée par 0,05 % d'acide formique. Suivent 10 injections de 500 µL d'une solution d'acétonitrile contenant 25 % d'eau Milli Q acidifiée par 0,05 % d'acide formique. La colonne est ensuite lavée par 12 injections de 500 µL d'eau Milli Q acidifiée par 0,05 % d'acide formique. L'éluat est recueilli par fractions de 500 µL, sur lesquelles les dosages de pouvoir inactivateur et l'absorbance à 260 nm sont effectués. Ces fractions feront l'objet d'une analyse par HPLC et de différents tests chimiques dont les protocoles sont décrits dans le chapitre qui suit.

#### **2.2.7. Séparation sur HPLC semi-préparative.**

Cette séparation se fait à l'aide d'une colonne MERCK HIBAR Lichrosorb Si 60 de 250 x 10 mm (granulométrie de 7µm). La chromatographie est réalisée sur un ensemble Workstation 9020 (Varian) comportant une pompe 9010 permettant d'effectuer les mélanges ternaires et un détecteur Varian UV-Visible 9050. La colonne est équilibrée avec l'acétonitrile, puis 250 µL d'échantillon EIL préalablement filtré sur Acrodix Stérile (0,45 µm) sont injectés. La colonne est ensuite lavée à l'aide d'acétonitrile pendant 10 minutes, puis l'élution se fait avec un gradient de 20 minutes, au cours duquel l'eau ultrapure Milli Q acidifiée par 0,05 % d'acide trifluoroacétique est progressivement enrichie en acétonitrile (0 à 100 %). La colonne est ensuite lavée avec de l'eau Milli Q acidifiée (0,05 % d'acide trifluoroacétique) pendant 10 minutes. La durée totale du chromatogramme est de 40 minutes, le débit est fixé à 2 mL.min<sup>-1</sup>, la température de la colonne est stabilisée à 30°C par un four et la détection se fait à 260 nm. Le volume des fractions recueillies est de 5 mL. Après 20 injections successives, les fractions sont regroupées entre elles avant d'être concentrées 100 fois. Le pouvoir inactivateur de chaque fraction concentrée est dosé.

## 2.3. ANALYSES DES FRACTIONS INACTIVATRICES.

### 2.3.1. Tests chimiques.

#### 2.3.1.1. Test à la ninhydrine.

Quarante  $\mu\text{L}$  d'échantillon à analyser sont ajoutés à 400  $\mu\text{L}$  de ninhydrine dissoute à 1 % dans le méthanol. La lecture de l'absorbance à 560 nm est réalisée après une incubation de 30 minutes à 60°C (bain-Marie). La cystéine est utilisée comme étalon ; la teneur des échantillons en groupements aminés primaires est exprimée en mole d'équivalent cystéine par litre.

#### 2.3.1.2. Test d'Ellman.

La teneur d'un échantillon en groupements sulfhydryl est déterminée selon la méthode d'ELLMAN (1959). Trois mL d'échantillon à doser sont ajoutés à 2 mL d'une solution de tampon phosphate monosodique (0,1 M) à pH 8 et à 5 mL d'eau distillée. Trois mL de la solution obtenue sont mis à incuber pendant 2 minutes à 25°C avec 20  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (10 mM) dans une solution de tampon phosphate monosodique (0,1 M) à pH 7. L'absorbance à 412 nm est ensuite lue et la teneur de l'échantillon en groupements soufrés est déterminée en utilisant la cystéine comme étalon. Cette teneur est exprimée en mole d'équivalent cystéine par litre.

#### 2.3.1.3. Test au ferricyanure de potassium et chlorure ferrique.

Cinq  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont déposés sur plaque de silice. Une solution de ferricyanure de potassium (0,5 %) et de chlorure ferrique (0,5 %) dans l'eau MilliQ est ensuite pulvérisée sur la plaque de silice. La présence de phénols dans l'échantillon est révélée par une coloration bleue et une fluorescence sous ultra-violet.

#### 2.3.1.4. Test de Schweppe.

La présence d'acides carboxyliques dans l'échantillon est détectée à l'aide d'un réactif mis au point par SCHWEPPE (1980). Vingt mL d'une solution de glucose (1  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) dans l'eau Milli Q sont

homogénéisés avec 20 mL d'une solution d'aniline (10 %) dans l'éthanol. Quatre mL de ce mélange sont ensuite homogénéisés dans 16 mL de butanol pour constituer le réactif. Cinq  $\mu\text{L}$  d'échantillon à analyser sont déposés sur une plaque de silice. Après séchage du dépôt, le réactif est pulvérisé sur la plaque. Celle-ci est ensuite chauffée pendant 10 minutes à 70°C. La présence de fonctions acides dans l'échantillon fait alors apparaître une coloration brune.

### **2.3.2. Analyse HLPC.**

La séparation se fait à l'aide d'une colonne HPLC MERCK HIBAR LichroCART Si 60 (125 x 4 mm, granulométrie 5  $\mu\text{m}$ ) de silice non greffée, associée à une colonne de garde Lichrosorb Si 60 (4 x 4 mm). La chromatographie est réalisée sur un ensemble Workstation 9020 (Varian) comportant une pompe 9010 permettant d'effectuer les mélanges ternaires et un détecteur Varian UV-Visible 9050. L'équilibrage de la colonne se fait à l'aide d'acétonitrile. Cinquante  $\mu\text{L}$  d'échantillon préalablement filtré sur Acrodix Stérile (0,45  $\mu\text{m}$ ) sont injectés. La colonne est ensuite lavée par l'acétonitrile pendant 2 minutes, puis l'élution est réalisée à l'aide d'un gradient de 10 minutes, correspondant à l'acétonitrile progressivement enrichi de 0 à 100 % d'eau ultrapure Milli Q acidifiée par 0,05 % d'acide formique. La colonne est ensuite lavée durant 3 minutes par de l'eau Milli Q acidifiée (0,05 % d'acide formique), avant d'être ramenée progressivement (gradient de 10 minutes) dans les conditions d'équilibrage. La durée totale du chromatogramme est de 15 minutes, le débit de solvant est fixé à 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . La température de la colonne est maintenue à 30°C à l'aide d'un four et la détection se fait à 260 nm.

### **2.3.3. Analyse Infra-Rouge.**

L'analyse est réalisée à l'Université d'Avignon et de Pays de Vaucluse à l'aide d'un spectromètre Mattson 1000 FTIR piloté par le logiciel First. Deux grammes de lyophilisat EIL sont mélangés à 2 grammes de bromure de potassium puis compressés sous forme de pastille prête à analyser. Le spectre est enregistré sur un intervalle de nombres d'ondes allant de 500 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.3.4. Analyses HPLC/MS-MS.**

Les analyses ont été réalisées au laboratoire de xénobiotiques de l'INRA de Toulouse, en collaboration avec le Dr Laurent DEBRAUWER. Le spectromètre LCQ Finnigan est équipé d'un

analyseur à trappe ionique et l'ionisation est réalisée par électronébulisation (ou électrospray ESI). Le spectromètre est couplé à un système HPLC identique à celui décrit au chapitre 2.3.2.

### **2.3.5. Analyse RMN.**

L'analyse est réalisée sous la direction de Mr Gancet au groupement de Recherches ELF-ATOCHEM de Lacq. Deux cent mL de la fraction inactivatrice (fraction B) éluée au cours de la chromatographie HPLC sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis lyophilisés. On obtient 14 mg de matière sèche que l'on dissout dans du méthanol deutéré puis la solution obtenue est filtrée sur coton. Notons que cette filtration a été réalisée par simple précaution, et que la totalité de l'échantillon paraissait dissoute. L'échantillon est analysé immédiatement à 27°C sur un appareil DRX 500 Bruker équipé d'une console Avance pilotée du logiciel Win Nmr.

## **3. INHIBITION DU BRUNISSEMENT PAR UN EXTRAIT D'HCQE.**

### **3.1. DOSAGE DES DIFFERENTES ACTIVITES ENZYMATIQUES.**

#### **3.1.1. Polygalacturonases et pectine méthyl estérases.**

Pour le dosage de l'activité polygalacturonase (PG), 500 mL de milieu gélosé contenant 1,5 % d'agar sont préparés dans une solution de tampon acétate (0,05 M) à pH 4,8 en présence de 0,5 % (poids/volume) d'acide polygalacturonique. Le milieu gélosé employé pour le dosage de l'activité pectine méthyl estérase (PME) diffère par son pH qui est de 4,5 et par le substrat employé à savoir de la pectine de pomme à 0,5 % (poids/volume).

Après avoir été autoclavées, les géloses sont coulées sur boîte de Pétri de 98 mm de diamètre (12 mL de gélose par boîte) ; des puits de 6 mm de diamètre sont ensuite creusés à l'emporte pièce à raison de 4 par boîte. Cinquante µL de fraction à analyser sont déposés dans chaque puits. Les boîtes sont alors incubées durant 18 h à 37°C. La révélation se fait par recouvrement des géloses par 15 mL d'une solution de bromure cétylméthylammonium à 1 %. Les zones d'activité apparaissent alors comme des auréoles de diffusion translucides sur fond opaque, dont le diamètre est proportionnel à l'activité enzymatique de la fraction analysée.

### 3.1.2. HCQE.

Cinquante  $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique sont incubés avec 1 mL d'une solution d'acide chlorogénique à 1 mM dans un tampon phosphate-citrate à pH 6 ; l'incubation est maintenue à  $37^\circ\text{C}$  dans un bain-Marie. Après 5 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée par l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  d'acide chlorhydrique à 37 % et d'une goutte d'acide *o*-phosphorique.

Dix  $\mu\text{L}$  de l'incubation sont ensuite injectés sur une colonne HPLC analytique Lichrospher 100 RP-18 (MERCK) de 125 x 4 mm (granulométrie de 5  $\mu\text{m}$ ). La chromatographie est réalisée sur un ensemble Workstation 9020 (Varian) comportant une pompe 9010 permettant d'effectuer les mélanges ternaires et un détecteur Varian UV-Visible 9050. L'élution se fait en mode isocratique à l'aide d'un mélange contenant 20 % d'acétonitrile et 80 % d'eau milli Q acidifiée à pH 2,6 par de l'acide *o*-phosphorique. Le débit est fixé à  $1 \text{ mL} \cdot \text{minutes}^{-1}$  et la température de la colonne est stabilisée à  $25^\circ\text{C}$  par un four. La durée totale du chromatogramme est de 4 minutes et la détection du matériel élué se fait à 280 nm. L'activité HCQE est exprimée en katals soit en mole d'acide caféique formé par seconde.

### 3.2. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION.

La chromatographie s'effectue à  $20^\circ\text{C}$  à l'aide d'une colonne de type K26/40 contenant 57 mL de résine Sephadex G25 Fine équilibrée avec une solution de tampon phosphate (0,1 M) à pH 6,5, enrichi en chlorure de potassium (0,6 M) et en sulfate d'ammonium (0,6 M). La limite d'exclusion du gel est comprise entre 1000 et 5000  $\text{g} \cdot \text{mole}^{-1}$ . Neuf millilitres de préparation GB sont déposés. L'élution est descendante, avec un débit fixé à  $42 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$  et suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm de l'éluat. Ce dernier est recueilli par fractions de 2,1 mL, sur lesquelles les dosages de protéines et de l'activité HCQE sont effectués. Les fractions inactivatrices sont regroupées et nommées GF.

### 3.3. CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTIONS HYDROPHOBES.

La chromatographie s'effectue à  $20^\circ\text{C}$  à l'aide d'une colonne de 5  $\text{cm}^2$  de section (K 26/40). Après équilibrage des 61 mL de gel Phényl-Sepharose CL-4B avec une solution de tampon phosphate monosodique (0,1 M) à pH 6,5 enrichie en KCl (0,6 M) et en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,6 M), 14 mL de la fraction GF sont déposés en tête de colonne. Un premier lavage est réalisé par 190 mL de la solution précédente. Suit un lavage par 130 mL d'une solution de phosphate monosodique (0,1 M)

enrichie en KCl (0,1 M) et en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,1 M). Enfin, l'activité HCQE est éluée par 100 mL d'eau permutée. L'éluion est descendante avec un débit de  $72 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ . L'éluat est recueilli par fractions de 3,6 mL, sur lesquelles dosage d'activité HCQE, polygalacturonase (PG) et pectine méthyl estérase (PME) et mesure d'absorbance à 280 nm sont effectués. Les fractions contenant une activité HCQE sont réunies et nommées HCQE.

## RESULTATS ET DISCUSSION

# 1. PURIFICATION PARTIELLE DES SYSTEMES POLYPHENOLOXYDASIQUES.

La préparation de polyphénoloxydases partiellement purifiées d'abricots reprend les premières étapes de purification des polyphénoloxydases d'abricot mise au point au laboratoire (CHEVALIER *et al.*, 1999). Les autres protocoles de préparation des extraits enzymatiques que nous avons utilisés sont adaptés de ceux décrits par GOUPY *et al.* (1994) pour la scarole, de FORGET-RICHARD (1992) pour la pomme et enfin de VAROQUAUX (1978) pour le champignon.

## 1.1. CONDITIONS DE DOSAGE DES DIFFERENTS EXTRAITS ENZYMATIQUES.

Les conditions de dosage des différents extraits polyphénoloxydasiques sont récapitulées dans le tableau 4.

végétal	substrat	pH
Abricot	4-MC (20 mM)	4,4
pomme	4-MC (20 mM)	4,5
Scarole	4-MC (20 mM)	6
Champignon	4-MC (20 mM)	6

**Tableau 4 :** Récapitulatif des conditions de dosage des différents systèmes polyphénoloxydasiques.

Les conditions de dosage de la PPO d'abricot sont celles décrites par CHEVALIER *et al.* (1999). L'extrait enzymatique est ajouté à 2,8 mL d'une solution de 4-méthylcatéchol (20mM) dans un tampon phosphate-citrate à pH 4,4. Notons cependant que DIJKSTRA et WALKER (1991) utilisaient l'acide chlorogénique comme substrat bien qu'ils aient montré que dans leurs conditions expérimentales le 4-méthylcatéchol était un meilleur substrat de la PPO d'abricot que l'acide chlorogénique.

Les conditions de dosage de l'activité polyphénoloxydasique extraite de pomme Red One sont identiques à celles décrites par JANOVIKZ-KLAPP *et al.* (1989) puis RICHARD-FORGET (1992). L'extrait enzymatique est incubé avec 2,8 mL d'une solution de 4-méthylcatéchol (20 mM) dans un tampon phosphate-citrate à pH 4,5.

Le dosage de l'activité polyphénoloxydasique de scarole que nous utilisons est celui décrit par GOUPY *et al.* (1994). Il se fait en incubant l'extrait enzymatique avec 2,8 mL d'une solution de 4-méthyl catéchol (20 mM) dans un tampon de phosphate monosodique (0,1 M) à pH 6. Ces conditions de dosage sont également très proches de celles retenues par HEIMDAL *et al.* (1994) pour le dosage des polyphénoloxydases de laitue. FAYAD-EL DAHOUK (1998) optait cependant pour un pH de dosage de 4,5 après avoir observé un plateau optimal d'activité polyphénoloxydasique pour des pH allant de 4,5 à 6 (et même de 5,5 à 7 pour une concentration en 4-méthyl catéchol de 2 mM).

Les conditions de dosage adoptées ici sont adaptées du protocole utilisé par VAROQUAUX (1978). La concentration de 4-méthylcatéchol est de 20 mM et le pH fixé à 6. Nous dosons donc ici l'activité catécholase de la tyrosinase, dans un souci d'homogénéité vis-à-vis des autres extraits végétaux. Le 4-méthylcatéchol est fréquemment utilisé (DAWLEY et FLURKEY, 1993) même si le substrat le plus classique est la L-DOPA (DAWLEY et FLURKEY, 1993a et b ; WICHERS *et al.*, 1996 ; BEAULIEU *et al.*, 1999).

## 1.2. PREPARATION DES DIFFERENTS EXTRAITS ENZYMATIQUES.

### 1.2.1. PPO d'abricot.

#### 1.2.1.1. Extraction.

Les conditions optimales d'extraction ont été définies au cours d'expériences préalables: des extractions ont été réalisées à différents pH (6 à 8) ; le pH 7 permet une extraction optimale de la PPO d'abricot. Ce pH est proche des pH d'extraction de PPO de pomme (JANOVITZ-KLAPP *et al.*, 1989) ou de fève de cacao (REEVES *et al.*, 1988). En absence de Triton X100 dans le milieu d'extraction, la solubilisation de la PPO est très faible. L'ajout de Triton X100 à raison de 1 % permet de solubiliser les fractions membranaires et suffit à solubiliser la majorité des formes non solubles de PPO d'abricot. L'activité polyphénoloxydasique extraite en présence de PVPP humidifié à raison de 1g/g de cortex est maximale. Cet adsorbant des phénols permettrait d'éviter la formation de combinaisons irréversibles phénol-protéines conduisant à la dénaturation de certaines activités enzymatiques et à la formation d'artéfacts (JANOVITZ-KLAPP *et al.*, 1989). Enfin, l'activité extraite est maximale dès l'addition de 30 mM d'acide ascorbique dans le tampon d'extraction. Les concentrations en acide ascorbique (agent réducteur des quinones) utilisées par ZAWISTOWSKI *et al.* (1988a) pour l'artichaut sont proches de celles retenues dans ce travail.

#### ***1.2.1.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium.***

La quantité d'activité polyphénoloxydasique précipitée à 30 % de saturation en sulfate d'ammonium est de 8 % et la quantité de protéines précipitées (79 %). Un taux de purification supérieur à 4 et son rendement de 93 % témoignent de l'efficacité de cette étape. L'étape de précipitation de l'activité à 80 % de saturation en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  préconisée par certains auteurs a été supprimée car son rendement est faible et peu reproductible. Cette difficulté semble liée à la présence de pectines dans le S<sub>30</sub>.

#### ***1.2.1.3. Dialyse.***

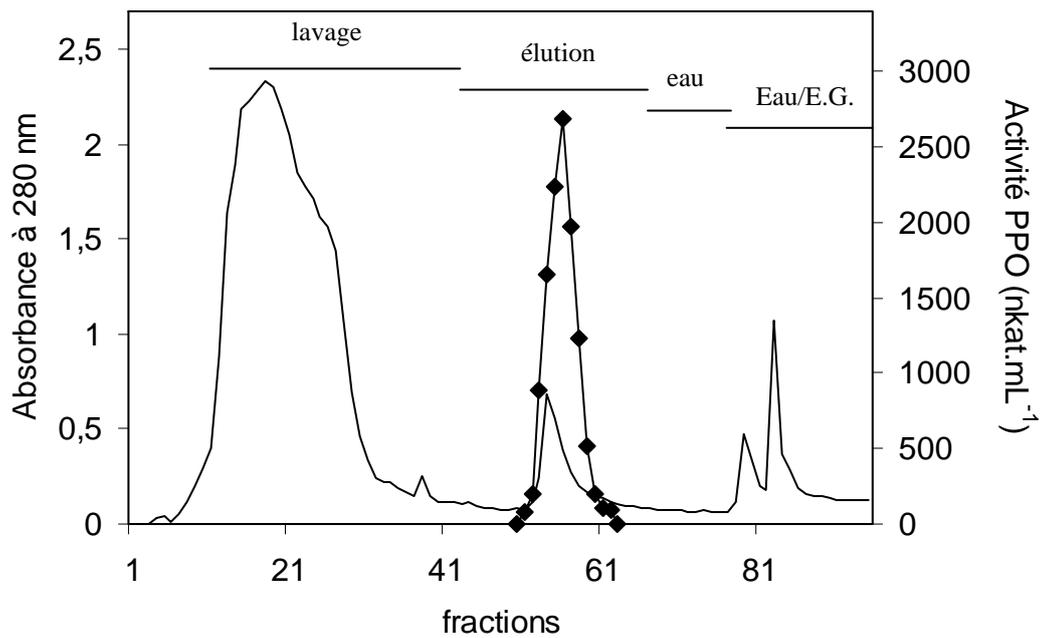
L'étape de dialyse du S30 contre la solution d'équilibrage de la chromatographie d'interactions hydrophobes présente un rendement en activité polyphénoloxydasique de 88 %. L'addition d'acide ascorbique dans la solution de dialyse permet en effet de limiter l'oxydation des composés phénoliques et accroît la stabilité de l'activité enzymatique.

#### ***1.2.1.4. Chromatographie d'interactions hydrophobes.***

Le chromatogramme obtenu est représenté figure 15. On observe un pic unique d'activité polyphénoloxydasique coïncidant avec un très faible pic protéique. Les fractions éluées et recueillies représentent 83 % de l'activité polyphénoloxydasique déposée et moins de 25 % des protéines déposées. L'emploi d'une matrice identique, associée à une élution par paliers successifs de sulfate d'ammonium permet à ESPIN *et al.* (2000) de séparer la PPO de poire.

#### ***1.2.1.5. Bilan de purification.***

Les résultats obtenus à partir des 12 g de cortex d'abricot lyophilisé au cours des différentes étapes de purification sont reportés dans le tableau 5. Le taux de purification de l'extrait enzymatique obtenu est de l'ordre de 14, avec un rendement global de 68 %. La chromatographie d'interactions hydrophobes, qui permet ici de multiplier le taux de purification d'un facteur 5, est classiquement employée pour la purification de la PPO. Ces résultats sont satisfaisants au regard des valeurs obtenues à l'aide d'un protocole similaire appliqué pour la poire par GAUILLARD et RICHARD-FORGET (1997) qui obtenait un rendement de 69 % pour un taux de purification deux fois moins



**Figure 15** : Chromatographie d'interactions hydrophobes sur Phényl-Sépharose CL-4B de l'extrait de PPO d'abricot S<sub>30</sub>D.  
 (—) Absorbance à 280 nm et (◆) Activité PPO.

important que le notre. Ce protocole permettait à FORGET-RICHARD (1992) d'obtenir des résultats comparables pour la PPO de pomme.

Enfin, nous avons observé que l'extrait enzymatique issu de la colonne de chromatographie d'interactions hydrophobes était stable durant cinq semaines, lorsqu'il était conservé à 4°C.

Etapes	Volume total (mL)	Protéines totales (mg)	Activité totale (nkat)	Activité Spécifique (nkat.mg <sup>-1</sup> )	Rendement %	Facteur de purification
Extrait brut	85	77,7	115940	1492	100	1
S <sub>30</sub> A	88	17,2	107976	6278	93	4,2
S <sub>30</sub> D	102	16,1	94962	5898	82	4
Hydrophobicité (PPOA)	50	3,8	78300	20605	68	13,8

**Tableau 5 :** Résultats obtenus au cours de la préparation de l'**extrait enzymatique (PPOA)** à partir de 12 g de cortex lyophilisé d'abricot.

### 1.2.2. PPO de pomme.

Le protocole de purification utilisé ici a été mis au point par JANOVITZ-KLAPP *et al.* (1989) puis modifié par RICHARD-FORGET (1992) pour la PPO de pomme Red Delicious. Nous présentons dans le tableau 6 le bilan de la purification partielle réalisée à partir de 12 g de cortex lyophilisé.

Les résultats obtenus montrent tout d'abord que l'activité spécifique de l'extrait brut de pomme Red One est similaire à celle de l'extrait brut de la pomme Red Délicious (300 nkat.mg<sup>-1</sup>) obtenu par FORGET-RICHARD (1992), dans les mêmes conditions. Le rendement est proche de 30 % pour un facteur de purification de 8 alors que FAYAD-EL DAHOUK (1998) obtenait un rendement de 50 % pour un facteur de purification proche de 30, dans des conditions de purification similaires et à partir de la variété Red Délicious. Dans notre cas, on remarque que le rendement de la dialyse est très faible (56 %) au regard de celui obtenu par RICHARD-FORGET (1992) qui était de 77 % et ce, malgré l'emploi d'acide ascorbique préconisé par ce dernier auteur. De la même manière que ces deux derniers auteurs, nous avons pu observer que l'extrait enzymatique partiellement purifié issu de la colonne de chromatographie d'interactions hydrophobes était stable durant trois semaines, lorsqu'il était stocké à 4°C.

Etapes	Volume total (mL)	Protéines totales (mg)	Activité totale (nkat)	Activité spécifique (nkat.mg <sup>-1</sup> )	Rendement %	Facteur de purification
Extrait brut	84	53	13188	249	100	1
S <sub>30</sub> P	85	31	11560	373	88	1,5
S <sub>30</sub> D	110	31	4840	156	37	<1
Hydrophobicité (PPOP)	29,5	1,8	3570	1983	27	8

**Tableau 6 :** Résultats obtenus au cours de la préparation de l'**extrait enzymatique (PPOP)** à partir de 12 g de cortex lyophilisé de pomme.

### 1.2.3. PPO de scarole.

La préparation de l'extrait enzymatique de scarole consiste en deux étapes de précipitation par le sulfate d'ammonium suivies d'une dialyse, réalisées d'après le protocole mis au point par GOUPY *et al.* (1994). Le bilan de purification à partir de 10 g de cœur de scarole (tissu vascularisé) lyophilisé est présenté dans le tableau 7.

Etapes	Volume total (mL)	Protéines totales (mg)	Activité totale (nkat)	Activité spécifique (nkat.mg <sup>-1</sup> )	Rendement %	Facteur de purification
Extrait brut	170	218,3	3133	14,3	100	1
S <sub>30</sub>	175	124,1	2782	22,4	89	1,56
P <sub>80</sub>	7	115,3	550	4,7	18	<1
P <sub>80</sub> D (PPOS)	10	69,7	1450	20,8	46	1,45

**Tableau 7 :** Résultats obtenus au cours de la préparation de l'**extrait enzymatique (PPOS)** à partir de 10 g de cortex lyophilisé de scarole.

Le rendement de la purification est de 46 % alors que le taux de purification est proche de 1,5. GOUPY *et al.* (1994) obtenaient un facteur de purification similaire pour un rendement de 94 %, à l'aide d'une seule étape de précipitation à 60 % de sulfate d'ammonium. Cependant, cette étape

permettait à ces auteurs d'éliminer 35 % des protéines totales alors que notre protocole permet d'en éliminer près de 70 %. On remarque qu'au cours de la dialyse, l'activité PPO totale est fortement augmentée (2,6 fois), ce qui suggère l'élimination par ce procédé d'inhibiteurs présents dans l'extrait enzymatique.

Notons que l'extrait enzymatique obtenu est particulièrement stable puisque lorsqu'il est stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ , son activité spécifique ne diminue pas significativement avant huit semaines.

#### 1.2.4. Tyrosinase de champignon.

Le protocole utilisé ici est adapté de celui optimisé par VAROQUAUX (1978). Le bilan de purification à partir de 10 g de champignon lyophilisé est présenté dans le tableau 8.

Etapes	Volume total (mL)	Protéines totales (mg)	Activité totale (nkat)	Activité spécifique (nkat.mg <sup>-1</sup> )	Rendement %	Facteur de purification
Extrait brut	75	320	6642	21	100	1
S <sub>70</sub>	82	187	2989	16	45	<1
P <sub>70</sub>	22,5	151	5721	38	86	1,8
P <sub>70</sub> D (PPOC)	28	125	11429	91	172	4,35

**Tableau 8 :** Résultats obtenus au cours de la préparation de l'**extrait enzymatique (PPOC)** à partir de 10 g de champignon de Paris lyophilisé.

Le rendement de purification de 172 % peut s'expliquer par l'élimination d'inhibiteurs présents dans l'extrait brut au cours de la dialyse qui présente un rendement de 200 %. Ce rendement pourrait aussi résulter d'une auto-activation de formes latentes de tyrosinases présentes dans l'extrait (ESPIN et WICHERS, 1999). Le taux de purification est de 4,35, taux proche de celui obtenu par NELSON et MASON (1971) en réalisant une extraction acétonique suivie de deux étapes successives de précipitation au sulfate d'ammonium (saturation de 40 et 52 %). Ce dernier protocole permettait d'éliminer 90 % des protéines, ce qui est aussi le cas quand l'étape de précipitation est remplacée par un passage sur colonne d'hydroxylapatite (WICHERS *et al.* 1996), alors que dans notre cas seuls 27 % des protéines sont éliminés.

L'activité *o*-diphénolxydasique de l'extrait enzymatique ainsi obtenu est stable pendant 6 jours, lorsqu'il est stocké à  $4^{\circ}\text{C}$ .

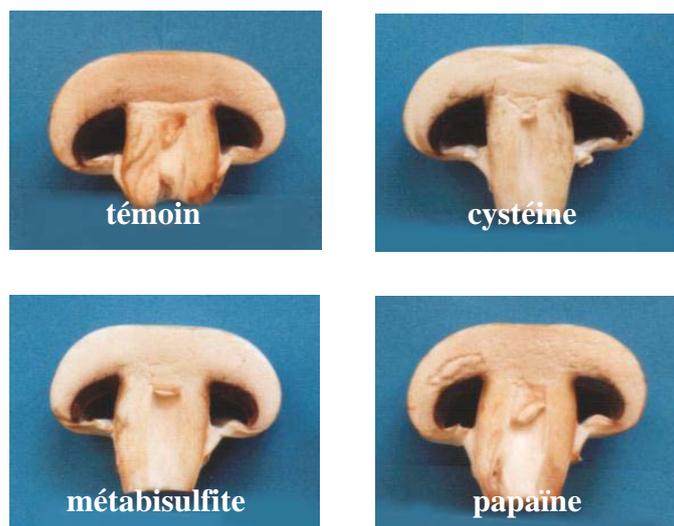
## **2. INHIBITION DU BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE PAR UNE PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE.**

Le premier objectif est de vérifier le pouvoir inhibiteur de l'extrait de papaïne vis-à-vis du brunissement enzymatique. La première série d'expérimentations a été réalisée avec différents matériels végétaux, sous forme de coupes et sous forme de broyats. Cette première étude sera suivie de l'identification des agents inhibiteurs et d'une caractérisation du mécanisme d'inhibition du brunissement enzymatique.

### **2.1. EFFET D'UN EXTRAIT DE PAPAINE SUR LE BRUNISSEMENT DE COUPES DE POMME, DE CHAMPIGNON ET DE SCAROLE.**

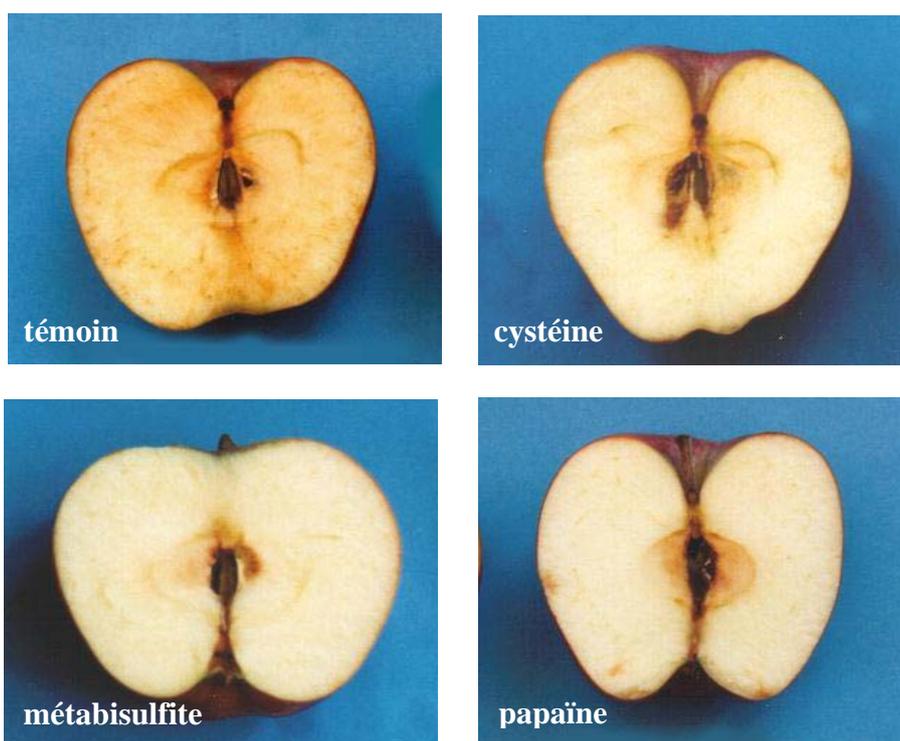
L'effet du filtrat de papaïne GF sur le brunissement de coupes longitudinales de champignon (figure 16) et de pomme (figure 17) est comparé à l'effet de solutions d'additifs classiques. Immédiatement après la coupe, le matériel végétal a été plongé 10 minutes dans 500 mL de solutions de tampon acétate 40 mM à pH 4,5, additionnées de métabisulfite de potassium ou de cystéine à raison de 8 milliéquivalents réducteurs.mL<sup>-1</sup> pour chaque additif. Une autre série de coupes a été traitée par un extrait de papaïne exempt de protéines. Cet extrait est obtenu en solubilisant la fraction GF préalablement lyophilisée dans un tampon acétate 40 mM à pH 4,5 à hauteur de 5 mg.mL<sup>-1</sup>. Toutes les coupes sont stockées à 4°C dans des barquettes fermées dans le but de garder un taux d'humidité constant. L'emploi de barquettes est en effet préconisé par LUO *et al.* (1992), LOZANO-DE-GONZALEZ *et al.* (1993), LUO et BARBOSA-CANOVAS (1994), CASTANER *et al.* (1996) et enfin BUTA *et al.* (1999) afin d'éviter tout dessèchement des tranches.

Le traitement des tranches de champignons et de pommes par le métabisulfite apparaît comme le traitement anti-brunissement le plus efficace dans nos conditions expérimentales, résultat déjà largement observé sur les tranches de pommes (LOZANO-DE-GONZALEZ *et al.*, 1993 ; MONSALVE-GONZALEZ *et al.*, 1993). Sur les coupes de champignons, le filtrat de papaïne présente un pouvoir anti-brunissement beaucoup plus faible que celui du métabisulfite et de la cystéine. Chez la pomme toutefois, l'efficacité du filtrat de papaïne est indiscutable. Ce résultat obtenu avec les tranches de pommes confirme les conclusions de LABUZA (1992) lors de son étude sur l'efficacité anti-brunissement de différentes protéases sur des tranches de pommes de terre et de



**Figure 16 :** Effet de différents additifs sur des coupes de champignon de Paris.

Conditions : les champignons frais sont coupés et immédiatement trempés 10 min dans 500 mL de solutions de tampon acétate 40 mM à pH 4,5 (témoin), additionné de 4 mM métabisulfite de potassium (soit 8 milliéquivalent réducteur.L<sup>-1</sup>) ou de 8 mM cystéine (soit 8 milliéquivalent réducteur.L<sup>-1</sup>), ou dans un extrait de papaïne GF. Les photographies sont prises 12 heures après trempage.



**Figure 17 :** Effet de différents additifs sur des coupes de pomme Red One.

Conditions : les pommes sont coupées et immédiatement trempées 10 min dans 500 mL de solutions de tampon acétate 40 mM à pH 4,5 (témoin), additionné de 4 mM métabisulfite de potassium (soit 8 milliéquivalent réducteur.L<sup>-1</sup>) ou de 8 mM cystéine (soit 8 milliéquivalent réducteur.L<sup>-1</sup>), ou dans un extrait de papaïne GF. Les photographies sont prises 12 heures après trempage.

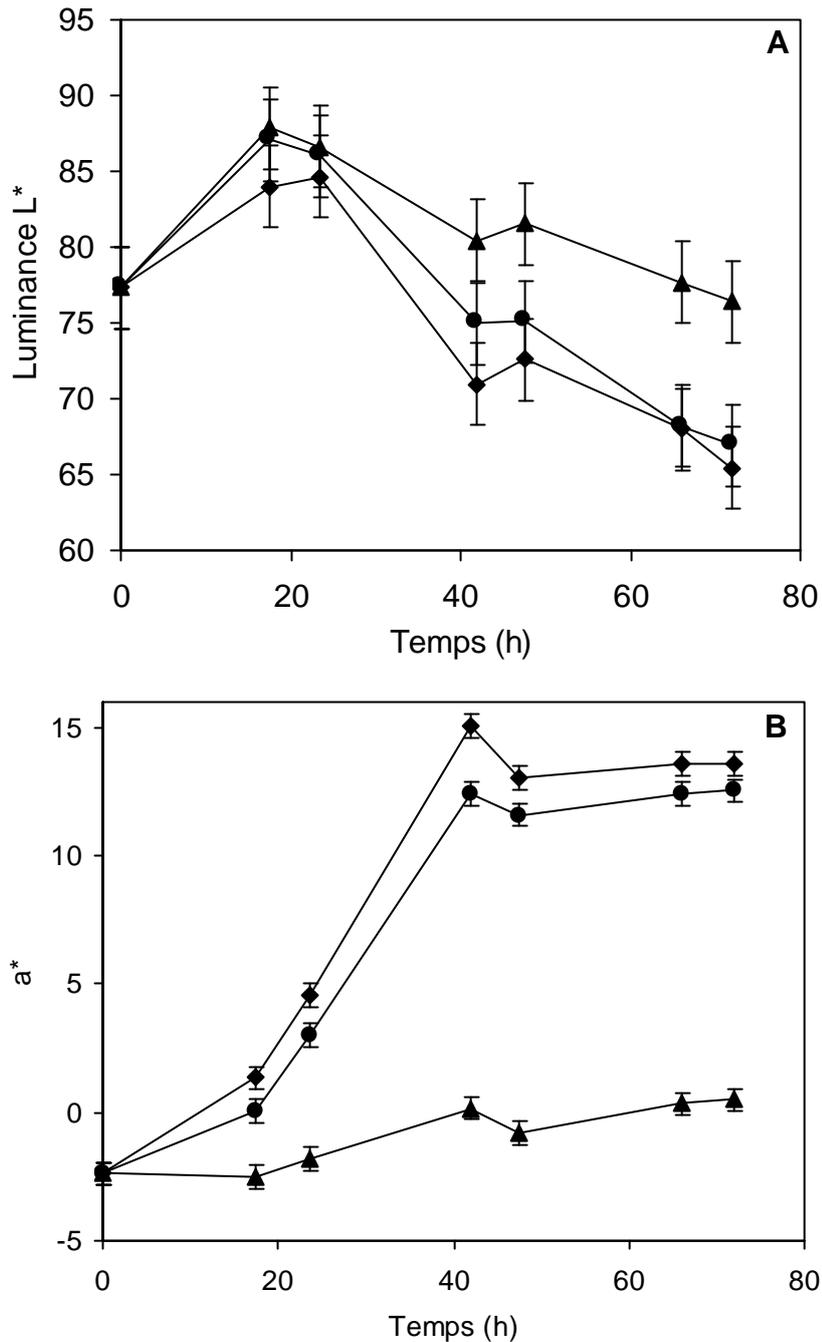
pommes. On remarque que notre filtrat est d'une efficacité comparable à celle de la cystéine dans nos conditions expérimentales. Or RICHARD-FORGET *et al.* (1998) avaient estimé une teneur en groupements sulfhydryls de 5 milliéquivalents.L<sup>-1</sup> dans l'extrait GF. Cet extrait contient donc au moins 1,6 fois moins de groupements sulfhydryls que notre solution de cystéine. La fraction GF contiendrait d'autres substances ayant un effet anti-brunissement.

Rappelons que LUO *et al.* (1992) avaient supposé que l'application d'un extrait brut de papaine retardait le brunissement de tranches de pomme en préservant la texture de celles-ci et l'intégrité des parois pectocellulosiques. Selon ces mêmes auteurs, l'activité protéolytique de la papaine agissait sur les systèmes enzymatiques liés à la dégradation des parois. L'absence de protéines dans notre filtrat laisse plutôt supposer que l'extrait de papaine contient des inhibiteurs du brunissement de petite taille (dont la cystéine et le dipeptide identifié par RICHARD-FORGET *et al.*, 1998), agissant probablement directement sur la formation des pigments bruns.

Pour compléter les observations visuelles réalisées sur les pommes et les champignons, l'effet du filtrat de papaine (GF) sur le brunissement de coupes de scarole est suivi par colorimétrie tristimulaire L\*a\*b\* au cours du temps. Pour cela, nous reprenons un protocole décrit par CASTANER *et al.* (1996) pour la laitue, dans lequel des tranches de tissus vascularisés sont découpées à la base des cœurs.

La reproductibilité des mesures a été vérifiée sur un lot homogène de quatre tranches préalablement plongées 10 minutes dans une solution de tampon acétate (40 mM) à pH 4,5, chaque tranche faisant l'objet de trois mesures (résultats non figurés). Un coefficient de variation de 3,5 % témoigne d'une bonne reproductibilité des mesures de luminance L\*. La reproductibilité des valeurs de a\* et b\* apparaît cependant médiocre, avec des coefficients de variation proches de 20 %.

Des lots de quatre tranches ont ensuite été plongés pendant 10 minutes dans différentes solutions, placés dans des barquettes fermées puis conservés à 4°C pendant la durée de la cinétique. Les résultats obtenus sont donnés dans la figure 18. Les trois traitements appliqués n'ayant pas d'effet significatif sur les valeurs de b\*, seules les valeurs de L\* (figure 18A) et de a\* (figure 18B) sont reportées. Les courbes témoin (tranches traitées à la solution de tampon acétate à pH 4,5) montrent qu'un changement significatif de couleur intervient 20 h après le début de la cinétique. De plus, les résultats au bout de 40 h montrent que la valeur de a\* a fortement augmenté alors que la valeur de L\* n'a diminué que de 10 %. Ces résultats traduisent le développement d'une couleur rose rougeâtre sur les tranches. Ce type de coloration est également observable sur les cœurs de laitue (CASTANER *et al.*, 1996). La couleur des tranches traitées par le fluorure de sodium demeure stable au cours de la cinétique ; l'ion fluorure est en effet un puissant inhibiteur des polyphénoloxydases



**Figure 18 :** Effets de différents traitement sur des coupes de tissus vascularisés de cœurs de scarole.

Conditions : les cœurs de scaroles sont tranchés et immédiatement trempés 10 min dans 500 mL de solution de tampon acétate 40 mM à pH 4,5 (◆), additionné de 0,1 M de fluorure de sodium (σ) ou dans un extrait de papaïne GF (●). Les valeurs L\* (**figure 18A**) et a\* (**figure 18B**) sont mesurées au cours de 72 h de cinétique.

(JANOVITZ-KLAPP *et al.*, 1990a ; NICOLAS *et al.*, 1994). CASTANER *et al.* (1996) ont montré qu'un traitement par l'acide acétique à 5 % permettait également de stabiliser la couleur de tranches de laitue. L'évolution de la couleur des tranches traitées par le filtrat de papaine est similaire à celle des tranches témoin. La luminance reste cependant légèrement supérieure à celle des témoins pendant les 50 premières heures. Le filtrat ne présente donc qu'un effet peu significatif sur le rosissement des tissus de scarole. CASTANER *et al.* (1996) ont observé qu'un traitement par la ficine n'avait pas d'effet anti-brunissement, mais que le résorcinol et la cystéine limitaient l'apparition de coloration rose pendant au moins 24 h. Il est donc possible que les substances anti-brunissement détectées dans notre extrait ne soient pas assez concentrées pour observer leur effet sur les tranches de scarole. D'autre part, l'inefficacité de notre extrait pourrait s'expliquer par des problèmes de diffusion des substances dans les tissus de scaroles, problèmes déjà observés dans le cas des cyclodextrines (NICOLAS *et al.*, 1994).

Ainsi, notre extrait de papaine présente une efficacité anti-brunissement qui semble dû à des substances autres que les protéases ou des acides aminés et peptides soufrés. D'autre part, cette efficacité peut varier fortement selon le tissu végétal traité.

## 2.2. EFFET D'UN EXTRAIT DE PAPAINE SUR LE BRUNISSEMENT DE BROYATS DE FRUITS ET LEGUMES.

Après avoir étudié l'effet du filtrat de papaine GF sur des coupes de tissus végétaux, nous testons l'efficacité anti-brunissement de cet extrait GF sur différents broyats en la comparant à celle d'additifs classiques. Le protocole, adapté de celui d'AMIOT *et al.* (1992), permet d'estimer le degré de brunissement en suivant la couleur des broyats par la mesure de la luminance  $L^*$ . Les études préliminaires menées sur des broyats d'abricots, de pommes et de champignons ont en effet montré que seule la luminance  $L^*$  évoluait de manière significative dans nos conditions. Son évolution pour les broyats témoin concorde en effet avec le brunissement observé à l'œil nu, confirmant la corrélation observée par SAPERS et DOUGLAS (1987) sur tranches de pomme et de poire et de KUCZYNSKI *et al.* (1992) sur des broyats de pêche blanche.

Les additifs ont été ajoutés au moment du broyage sous forme de solutions dans un tampon acétate (40 mM) à pH 4,4. Le bisulfite de potassium et la cystéine sont ajoutés à hauteur de 0,25 et 0,5 millimole respectivement pour 100 grammes de matière végétale fraîche. La teneur en groupements sulfhydryl de la fraction GF est de 5 millimoles d'équivalent cystéine par litre. Chaque traitement correspond à un ajout dans le broyat de 0,5 à 0,55 milli équivalents réducteurs pour 100

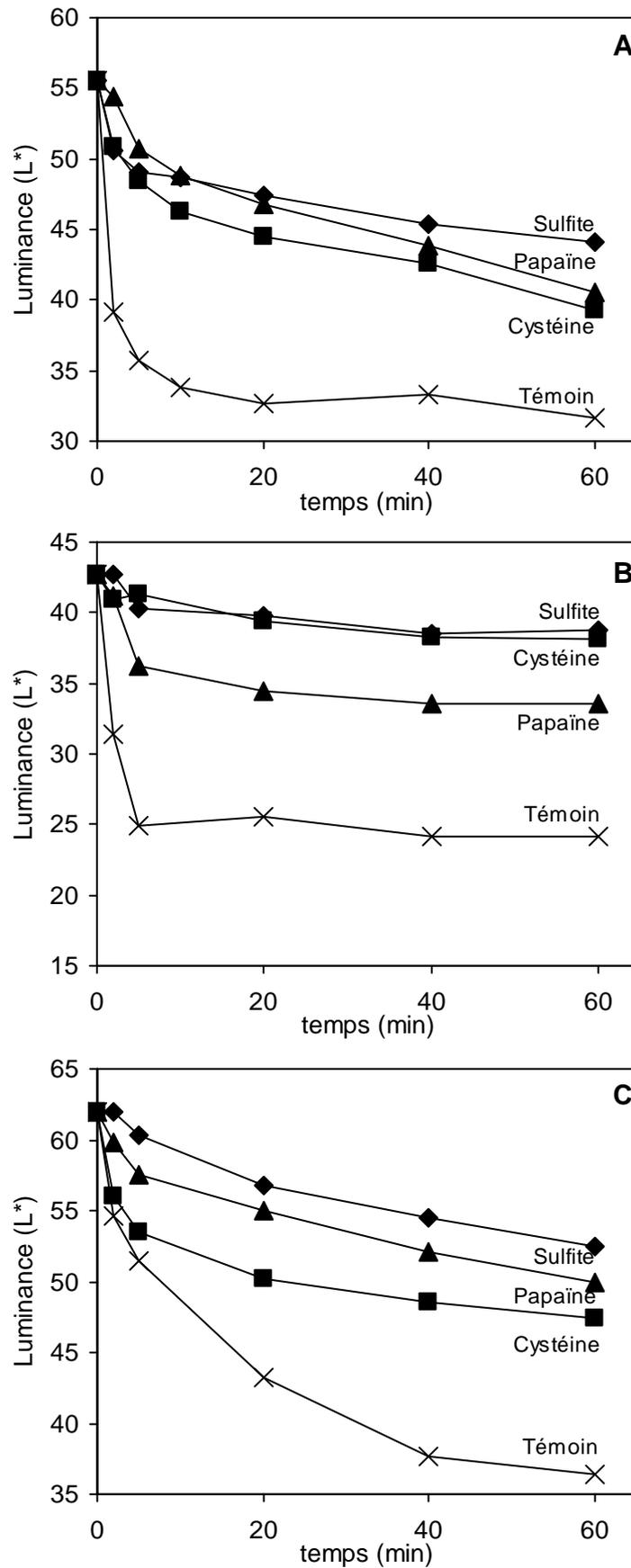
grammes de matière végétale fraîche. La solution de tampon seule est ajoutée pour les broyats témoin.

La reproductibilité des mesures a été vérifiée en réalisant pour chaque traitement trois broyages et trois mesures par point. Les résultats de cette étude sur des broyats d'abricot, de pomme et de champignon sont représentés dans la figure 19. La reproductibilité est satisfaisante car on obtient un coefficient de variation de 3,8 pour un écart type de 2,1 unités. Dans tous les cas, on observe un fort brunissement des broyats témoins qui se traduit par une rapide diminution de la luminance durant les premières minutes suivant le broyage, puis la luminance semble se stabiliser après avoir perdu dans tous les cas 40 % de sa valeur initiale. De POIX *et al.* (1980) observent un phénomène similaire sur des purées de pommes Golden Délicious ; la luminance se stabilise au bout de 60 minutes après le broyage. Cette stabilisation apparaît dans nos conditions au bout de 20 minutes pour l'abricot et la pomme et de 60 minutes pour le champignon.

Les différents additifs appliqués ont un fort effet protecteur vis-à-vis du brunissement, le bisulfite étant dans tous les cas le plus efficace puisque lorsqu'il est ajouté, la luminance des broyats ne chute que de 10 à 20 % au cours de l'expérience, avec une vitesse initiale 4 (pour l'abricot) à 10 fois (pour la pomme et le champignon) moins importante que les témoins. Cependant, la luminance ne chute que pendant les cinq premières minutes suivant le broyage, sauf pour le broyat de champignon où elle chute régulièrement au cours de l'expérience. De POIX *et al.* (1980) affirme que cet assombrissement apparent des broyats est toujours observé et serait dû à un changement d'état physique de l'échantillon au cours du temps, ce qui entraîne une modification de la quantité d'énergie lumineuse réfléchie.

L'effet de la cystéine semble varier selon le matériel végétal considéré ; si elle est aussi efficace que les sulfites sur le broyat de pommes, son efficacité est plus contrastée sur l'abricot et surtout sur le champignon. NAPPI et VASS (1994) rapportent en effet que certains produits d'addition provoquent une augmentation significative de l'activité catécholasique de la tyrosinase de champignon.

Le filtrat de papaine possède un effet anti-brunissement plus efficace que la cystéine dans les broyats d'abricot et de champignon. Son efficacité est plus contrastée dans le broyat de pomme. Notons que le filtrat de papaine contient de la cystéine et le dipeptide acide glutamique-cystéine identifiés par RICHARD-FORGET *et al.* (1998) et que dans nos conditions expérimentales, la concentration de ces composés piègeurs de quinones est inférieure ou égale à celle de la cystéine. La forte efficacité de ce filtrat suggère donc la présence d'autres composés ayant un effet anti-brunissement. Ces résultats ont été confirmés en utilisant des extraits exempts de composés piègeurs de quinones, tels que ceux obtenus par chromatographie échangeuse d'anions (résultats non figurés).



**Figure 19** : Effet de différents additifs sur l'évolution de la luminance (L\*) de broyats d'abricot (A), de pomme (B) et de champignon (C).

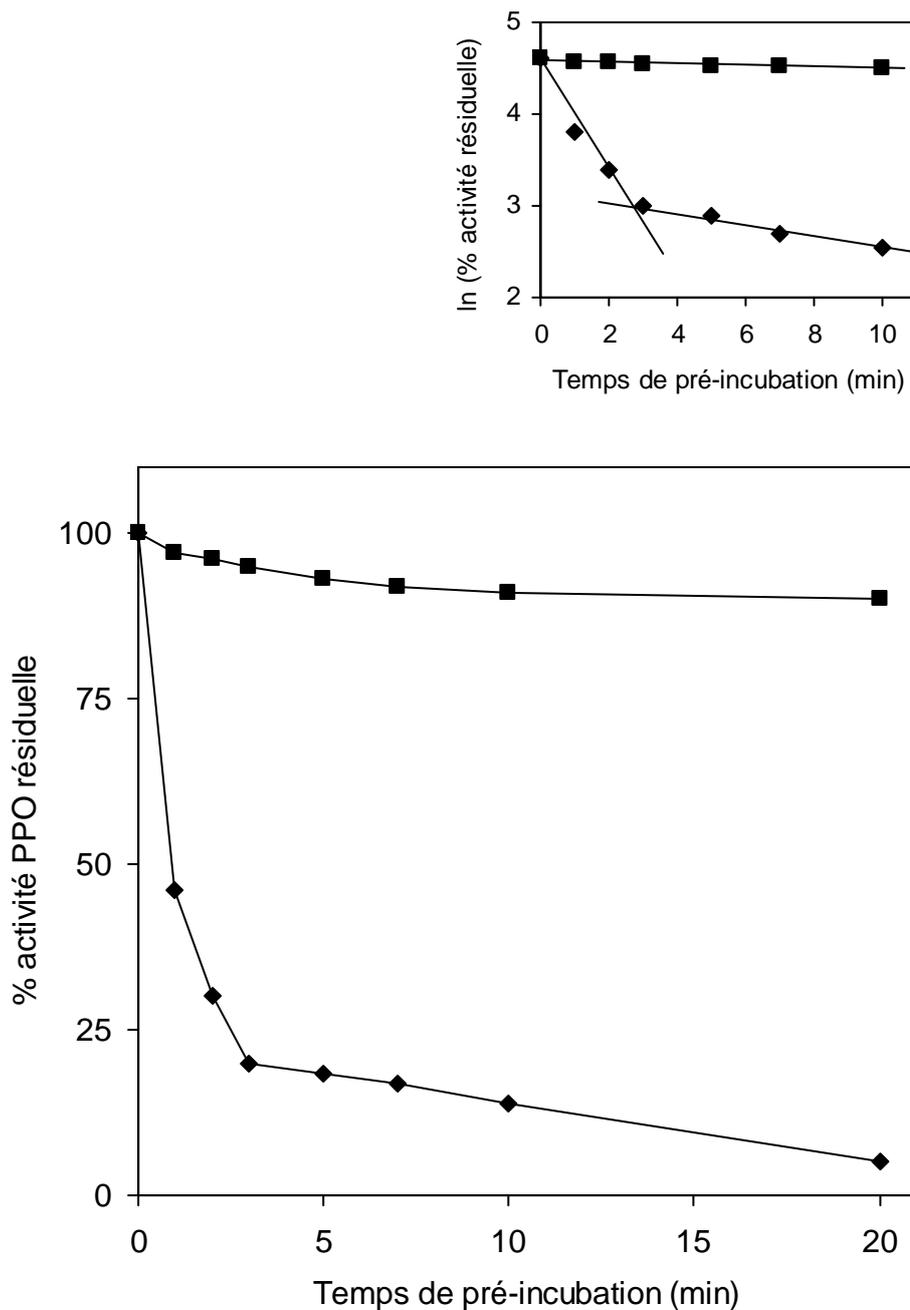
Ainsi, les préparations de papaïne sont des inhibiteurs du brunissement avec une efficacité variable selon le matériel végétal considéré. Les conditions de pH semblent avoir une influence prédominante sur l'efficacité des inhibiteurs, influence déjà largement évoquée vis-à-vis de nombreux inhibiteurs (ROUET-MAYER et PHILIPPON, 1986 ; JANOVITZ-KLAPP *et al.*, 1990a ; FORGET-RICHARD, 1992).

### 2.3. EFFET DE LA PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE SUR LA PPO DE SCAROLE.

Une étude préliminaire de la reproductibilité des conditions de pré-incubation et des dosages polarographiques de l'activité PPO résiduelle a été réalisée. Le coefficient de variation obtenu est de 5,48 % pour un écart type de 3,3 nkat.mL<sup>-1</sup>. Au vu de ces résultats satisfaisants, nous choisissons de ne pas afficher les écarts types sur nos graphes afin de ne pas les surcharger.

Une cinétique est réalisée, dans laquelle un extrait brut de papaïne (0,25 g.mL<sup>-1</sup>) est incubé avec un extrait polyphénoloxydasique de scarole PPOS. L'évolution de l'activité PPO en présence de la papaïne est comparée à celle d'un témoin dans lequel l'extrait brut de papaïne est remplacé par une solution de tampon acétate à pH 4,4. Les résultats sont donnés dans la figure 20. La courbe témoin montre une légère perte d'activité PPO au cours de l'expérience qui ne dépasse pas 12 % de l'activité PPO initiale. L'extrait PPOS paraît donc relativement stable dans nos conditions expérimentales. La présence de l'extrait brut de papaïne entraîne une chute rapide de l'activité enzymatique selon un processus biphasique : une première phase d'inactivation rapide suivie d'une phase caractérisée par une inactivation plus lente. Ce résultat confirme ceux de FAYAD-EL DAHOUK (1998) réalisés dans les mêmes conditions. La vitesse initiale d'inactivation appelée  $k$  est calculée graphiquement, à partir du graphe représentant le logarithme népérien de l'activité PPO résiduelle (exprimée en pourcent de l'activité initiale) en fonction du temps de pré-incubation (insert de la figure 20). On calcule la régression linéaire à partir des points correspondant à la première phase d'inactivation. La vitesse initiale d'inactivation est égale à la valeur absolue de la pente de la droite obtenue ; elle s'exprime donc en minutes<sup>-1</sup>. Dans notre cas, elle est proche de 0,53 minutes<sup>-1</sup>.

Ces profils biphasiques sont d'ailleurs classiquement observés lors d'incubations d'inhibiteurs avec des extraits de PPO d'origines variées. Il en est ainsi pour l'inactivation de la PPO de chou palmiste par la cystéine (ROBERT *et al.*, 1995) ou par le métabisulfite de sodium (RICQUEBOURG *et al.*, 1996) et pour la dénaturation d'un extrait de tyrosinase par le sulfite (SAYAVEDRA-SOTO et MONTGOMERY, 1986). Dans ce dernier cas, les auteurs supposent que la



**Figure 20 :** Effet d'un extrait brut de papaine sur le système polyphénoloxydasique de scarole partiellement purifié.

**Insert :** ln (activité PPO résiduelle en pourcent de l'activité initiale) en fonction du temps de pré-incubation.

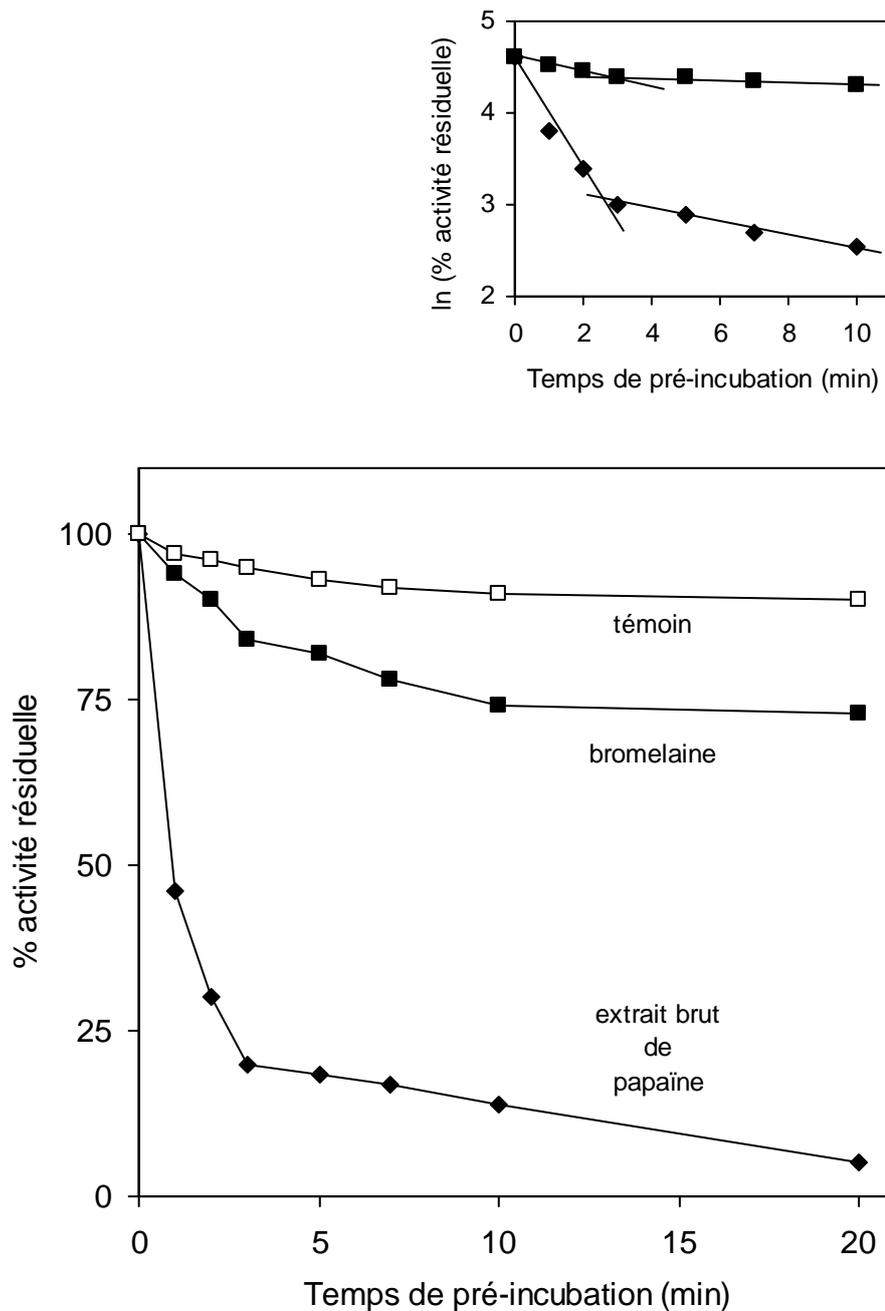
Conditions de pré-incubation : 3  $\mu$ katal de PPO de scarole (PPOS) sont pré-incubés avec un extrait brut de papaine (◆) ou avec une solution de tampon acétate (40 mM) à pH 4,4 (■), dans une solution de tampon phosphate-citrate à pH 4 et à 20°C. L'activité PPO résiduelle est dosée polarographiquement en prélevant au cours du temps des aliquotes de 50 $\mu$ L.

phase rapide d'inactivation correspond à la formation d'un complexe tyrosinase inactivée/bisulfite, alors que la phase lente est le résultat de la libération d'ions bisulfites en solution suite à la dissociation de ce complexe. Dans notre cas, il est également possible que les profils biphasiques soient consécutifs à l'existence de plusieurs isoformes de PPO avec des sensibilités différentes aux composés inactivateurs. Il serait également possible qu'une forme de PPO sensible à l'inactivation évolue vers une forme moins sensible, suite à une modification de structure ou un changement d'ionisation.

#### 2.4. EFFET DE DIFFERENTES PREPARATIONS PROTEOLYTIQUES SUR LA PPO DE SCAROLE.

L'efficacité d'un extrait brut de papaine ( $0,25 \text{ g.mL}^{-1}$ ) est comparée avec celles d'autres préparations protéasiques. Pour cela, des extraits bruts à  $0,25 \text{ g.mL}^{-1}$  d'actinidine (extraite de kiwi puis filtrée sur gel Trisacryl GF 05M), de bromélaïne (MERCK,  $2 \text{ mAnson- U.mg}^{-1}$ ) et de ficine (MERCK, activité BAEE de  $3 \text{ U.mg}^{-1}$  exempté de dérivés de résorcinol) ont été testés vis-à-vis de la PPO de scarole (PPOS). L'évolution de l'activité PPO résiduelle est reportée dans la figure 21 en fonction du temps de pré-incubation avec les extraits protéasiques. Aucune inactivation significative de la PPO n'a été observée en présence de l'actinidine ou de la ficine dans nos conditions expérimentales (courbes non reportées sur le graphique). Cependant, la bromélaïne et la papaine provoquent une chute significative de l'activité PPO, chute caractérisée par une vitesse initiale d'inactivation  $k$  (calculée graphiquement) 10 fois plus faible en présence de bromélaïne que celle obtenue en présence de papaine. Rappelons que LOZANO-DE-GONZALEZ *et al.* (1993) avaient décrit un effet anti-brunissement du jus d'ananas riche en bromélaïne sur des tranches de pommes. On observe que l'incubation avec la bromélaïne provoque la perte de 25 % de l'activité PPO initiale en fin d'expérience contre plus de 90 % pour la papaine. Cette dernière préparation protéasique est donc de loin la plus efficace dans nos conditions expérimentales ainsi que l'avait observé LABUZA (1992) lors de son étude sur l'efficacité anti-brunissement de différentes protéases sur des tranches de pommes de terre et de pommes. Notons cependant qu'à ce stade de l'étude, nous ne connaissons ni la nature ni la teneur des agents inactivateurs présents dans chacun des extraits, ce qui rend la comparaison de leur efficacité très discutable.

En outre, il ressort de nos résultats que le pouvoir anti-brunissement de préparations de ficine observé par MAC EVILY *et al.* (1992b) serait donc exclusivement due à la présence de résorcinols dans ces préparations. Ce dernier point rejoint les conclusions de CASTANER *et al.* (1996).



**Figure 21 :** Effet de la bromélaïne et de la papaïne sur le système polyphénoloxydasique de scarole partiellement purifié.

**Insert :** ln (activité PPO résiduelle en pourcent de l'activité initiale) en fonction de temps de pré-incubation.

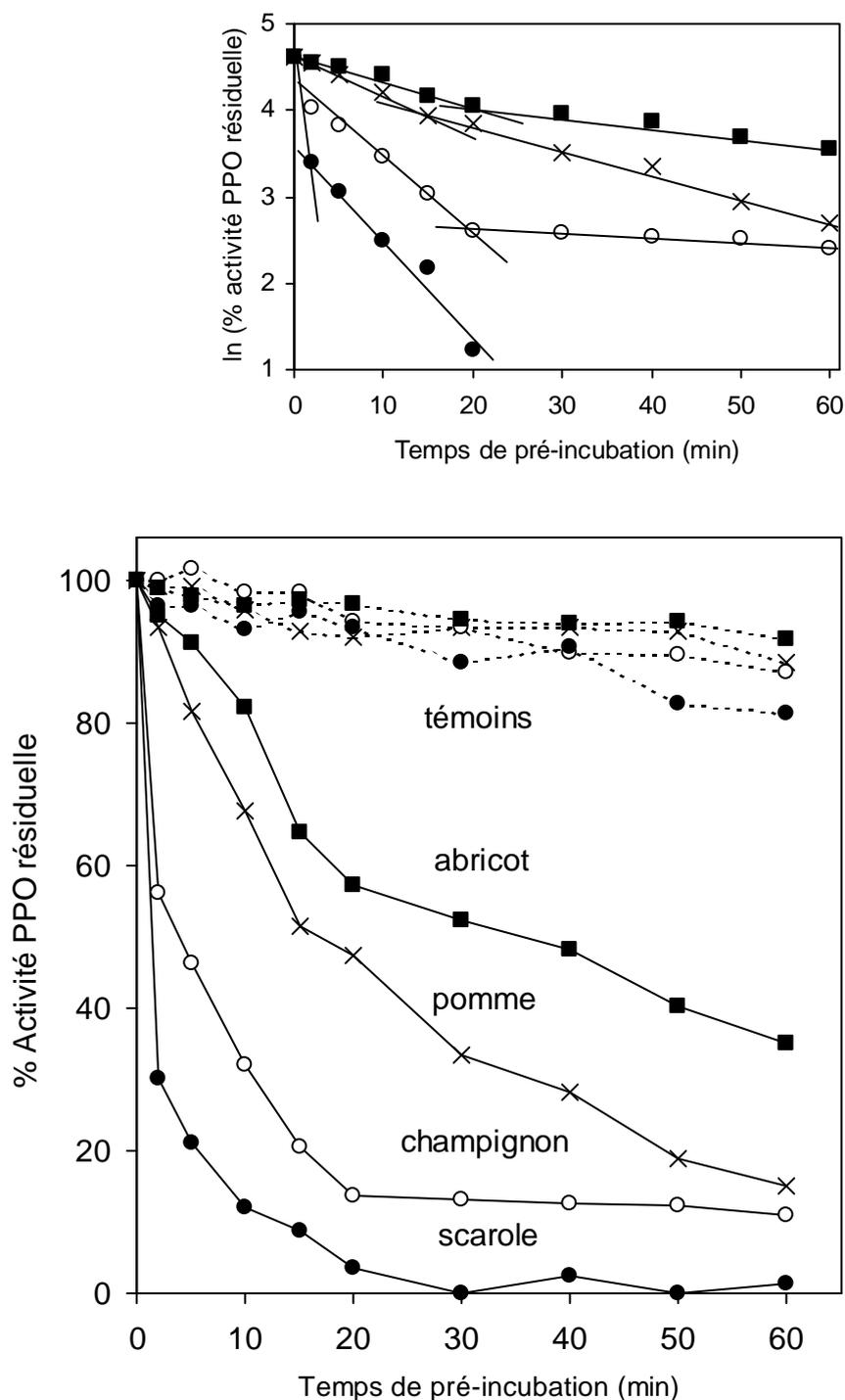
Conditions de pré-incubation : 3  $\mu$ katals de PPO de scarole (PPOS) sont pré-incubés avec 0,25  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de préparation de papaïne ou de bromélaïne à pH 4 et 20°C. L'activité PPO résiduelle est dosée polarographiquement en prélevant au cours du temps des aliquotes de 50 $\mu$ L.

## 2.5. INFLUENCE DE LA PAPAÏNE SUR DIFFÉRENTS EXTRAITS POLYPHÉNOLOXYDASIQUES.

Les résultats préliminaires obtenus sur coupes et sur broyats nous ont poussé à étudier l'effet d'un extrait de papaine sur différents systèmes polyphénoloxydasiques partiellement purifiés. L'extrait de papaine répondant à ces deux conditions est la fraction EI issue de la chromatographie échangeuse d'anions, exempte de protéase et de composé piègeur de quinones comme nous le confirmerons au cours de la purification.

Dans la figure 22, nous avons reporté l'évolution de l'activité PPO de scarole, champignon, d'abricot et pomme au cours de leur pré-incubation en présence de la fraction EI. Les conditions de pH et d'activité enzymatique initiale sont identiques pour tous les incubats. On observe que l'incubation de chaque système polyphénoloxydasique avec la fraction EI provoque une perte importante de l'activité PPO. De plus, la vitesse d'inactivation dépend fortement de l'origine de la PPO : celle de la PPO de scarole ( $k = 0,599 \text{ minutes}^{-1}$ ) est 7 fois plus élevée que celle de champignon ( $k = 0,090 \text{ minutes}^{-1}$ ), 14 fois plus élevée que celle de pomme ( $k = 0,044 \text{ minutes}^{-1}$ ) et 20 fois plus élevée que celle de la PPO d'abricot ( $k = 0,029 \text{ minutes}^{-1}$ ). Ce résultat est étonnant au regard de ceux obtenus avec le broyat de scarole. FERRAR et WALKER (1996) notèrent de fortes différences de sensibilité des PPO de pomme, banane et de champignon vis-à-vis de nombreux inhibiteurs ou agents inactivateurs. Des différences de sensibilités de tyrosinases de différentes origines fongiques vis-à-vis de halogénures ont été observées par MARTINEZ *et al.* (1986). Ces auteurs supposent que la sensibilité aux inhibiteurs est directement liée aux caractéristiques intrinsèques des enzymes et plus particulièrement à l'accessibilité du groupement prosthétique des PPO aux ligands exogènes.

Nos premiers résultats obtenus montrent que les préparations protéasiques de papaye contiennent des composés ayant un effet sur le brunissement enzymatique. Cet effet avait déjà été partiellement attribué aux composés piègeurs de quinones par RICHARD-FORGET *et al.* (1998). Il nous est cependant apparu que des préparations de papaine, exemptes de ces composés et de protéases, étaient capables d'inactiver les polyphénoloxydases. Ces préparations contiennent donc des composés « dénaturants » qu'il est nécessaire de purifier et d'identifier en vue de comprendre leur mécanisme d'action vis-à-vis des polyphénoloxydases.



**Figure 22 :** Effet d'un extrait de papaïne issu de chromatographie d'échange d'anions sur différents systèmes polyphénoloxydasiques partiellement purifiés.

Conditions de pré-incubation : 300  $\mu$ L de fraction EI (ou de solution tampon à pH 4 pour les témoins) sont mis à pré-incuber à 20°C avec 300  $\mu$ L de PPO (PPOA d'abricot, PPOP pour la pomme, PPOS pour la scarole et PPOC pour le champignon) et 400  $\mu$ L d'une solution de tampon phosphate-citrate à pH 4. L'évolution de l'activité PPO résiduelle (dosée polarographiquement) de chaque incubat est suivie au cours du temps.

## 2.6. PURIFICATION DES COMPOSES RESPONSABLES DE L'INACTIVATION DE LA PPO PRESENTS DANS LA PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE.

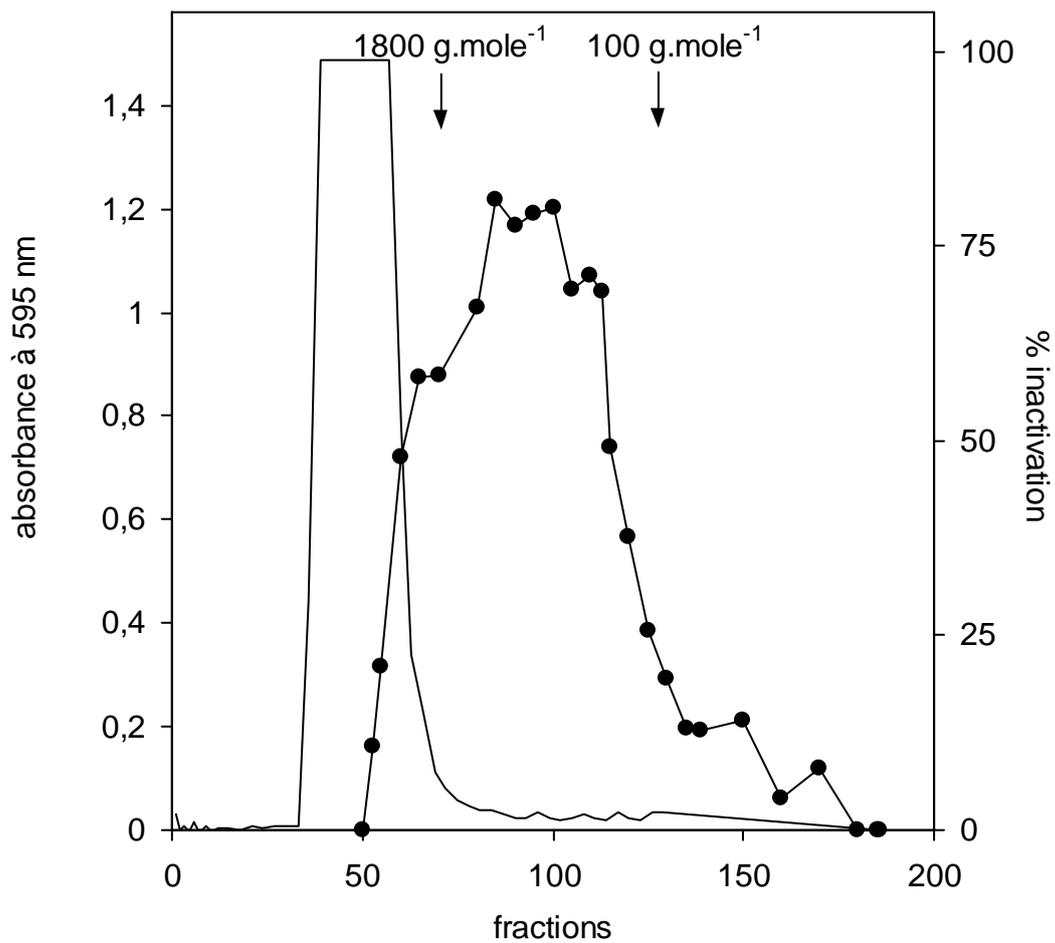
Notre étude se poursuit par la purification des composés inactivant la PPO de scarole (PPOS). D'après les expériences décrites dans le chapitre précédent, ce système polyphénoloxydasique s'est en effet révélé très sensible à l'inactivation par l'extrait de papaine. Le protocole de purification utilisé reprend comme première étape la chromatographie d'exclusion mise au point par RICHARD-FORGET *et al.* (1998).

### 2.6.1. Chromatographie d'exclusion.

L'extrait brut de papaine (EB) est déposé sur une matrice de Biogel P2, caractérisée par une zone d'exclusion située entre 100 et 1800 g.mole<sup>-1</sup>. La colonne a été au préalable étalonnée à l'aide de cytochrome C (MERCK, 12 500 Daltons), d'un heptapeptide (Dermorphine, BACHEM) de 802 Daltons, d'un tripeptide ((D-Ala<sup>2</sup>)- $\beta$ -Casomorphin (1-3) amide, BACHEM) de 444 Daltons et de tyrosine (MERCK, 180 Daltons).

Après dépôt de l'extrait brut de papaine en tête de colonne, chaque fraction éluée fait l'objet d'une détection de protéines réalisée à l'aide d'un dosage qualitatif par la méthode de BRADFORD (1976). Parallèlement, le pouvoir inactivateur de chaque fraction vis-à-vis de la PPOS est mesuré. Sur le chromatogramme présenté figure 23, on observe que la majorité des protéines, dont la papaine proprement dite, est éluée dans le volume mort de la colonne. La masse moléculaire de cette protéase est en effet de 23,4 kDa (BROCKLEHURST *et al.*, 1981). Nos composés inactivateurs sont majoritairement élués dans la zone de séparation de la colonne. Le sommet du pic d'inactivation (qui comprend les fractions inactivant plus de 70 % de l'activité PPO après 5 minutes de pré-incubation) est très large et correspond à une zone de poids moléculaire s'étalant de 250 à 1600 g.mole<sup>-1</sup> avec un léger maximum autour de 650 g.mole<sup>-1</sup>. Notons qu'un poids moléculaire de 600 g.mole<sup>-1</sup> a été déterminé par OSZMIANSKI et LEE (1990) pour les agents anti-brunissement contenus dans le miel. Le large pic d'inactivation observé ici laisse fortement penser que plusieurs agents inactivateurs différents sont détectés et/ou que ceux-ci sont présents dans la préparation sous forme de polymères.

Aucune inactivation n'est détectée dans les fractions riches en protéines. Nous confirmons donc que dans notre préparation commerciale de papaine, la protéase proprement dite n'est pas



**Figure 23 :** Chromatographie d'exclusion d'un extrait brut de papaïne. Une détection des protéines (-) ainsi que du pouvoir inactivateur vis-à-vis de la PPO de scarole ( $\lambda$ ) a été réalisée sur chaque fraction.

responsable de l'inactivation de la PPO. Certains auteurs affirment en outre que l'activité polyphénoloxydase résiste aux digestions protéolytiques les plus classiques telles que la trypsine ou la pepsine dans des conditions de température et de pH proches de celles de notre dosage du pouvoir inactivateur (KING et FLURKEY, 1987 ; MARQUES *et al.*, 1994). De plus, les composés inactivateurs sont de taille globalement inférieure à 2000 g.mole<sup>-1</sup>, ce qui permet d'affirmer qu'ils ne sont pas de nature enzymatique. MAC EVILY *et al.* (1992a) et CASTANER *et al.* (1996) ont montré que les inhibiteurs de la PPO présents dans la ficine étaient des dérivés du résorcinol et que la protéase n'avait pas d'effet sur la PPO. LOZANO-DE-GONZALES *et al.*, 1993 affirment que les inhibiteurs de la PPO présents dans le jus d'ananas ne sont pas non plus de nature enzymatique, mais qu'il s'agit de composés neutres d'une masse moléculaire inférieure à 10 kDa.

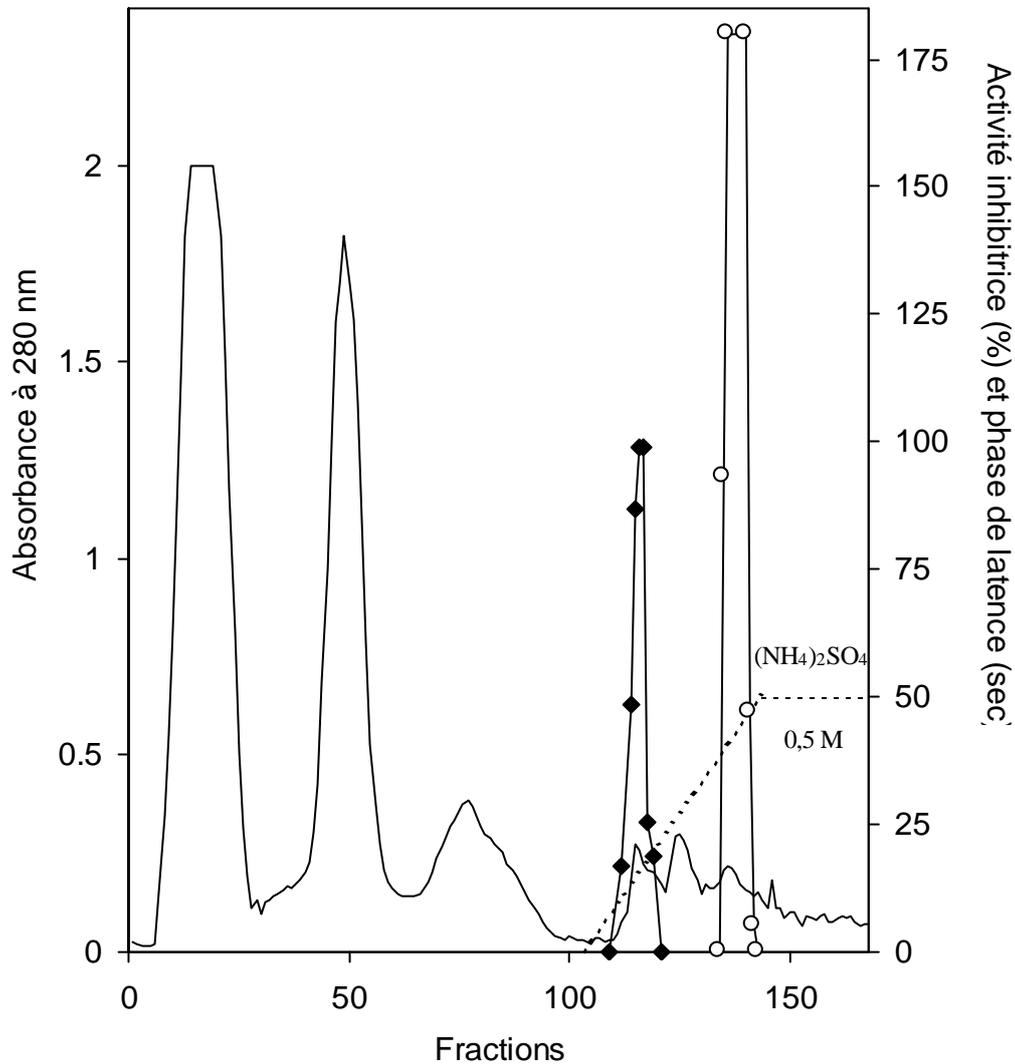
Les fractions inactivatrices correspondant à un poids moléculaire allant de 250 à 1600 g.mole<sup>-1</sup> sont regroupées et nommées GF.

### **2.6.2. Chromatographie échangeuse d'anions.**

Vingt cinq mL de fraction GF sont déposés sur une colonne de chromatographie contenant une résine échangeuse d'anions DEAE Sephadex A25 préalablement équilibrée à pH 4,4. Le chromatogramme obtenu est représenté dans la figure 24. Les fractions ayant un pouvoir inactivateur se trouvent regroupées en un seul pic élué au cours du gradient, pour une concentration en sulfate d'ammonium avoisinant 0,15 M. Ce pic coïncide avec un pic de faible amplitude absorbant à 280 nm. L'éluion en début de gradient montre que le point isoélectrique de ces composés est légèrement inférieur à 4,4. D'importants pics de matériel inactif sont élués au cours du lavage de la colonne, ce qui témoigne de l'efficacité de cette étape de purification. D'autre part, les composés piègeurs de quinones caractérisés par la phase de latence sont élués en fin de gradient, pour une concentration en sulfate d'ammonium proche de 0,4 M.

Cette chromatographie permet donc de séparer efficacement les composés capables d'inactiver la PPO des composés piègeurs de quinone. Nous pouvons affirmer que nos composés inactivateurs ne sont ni la cystéine, ni le dipeptide identifiés par RICHARD-FORGET *et al.* (1998). Notre choix d'une résine échangeuse d'anions a été guidé par le travail de LOZANO-DE-GONZALEZ *et al.* (1993). Ces auteurs préconisaient son emploi au cours de la purification d'inhibiteurs de la PPO présents dans le jus d'ananas pasteurisé.

Les fractions inactivatrices sont regroupées puis lyophilisées. La reprise du lyophilisat dans le méthanol permet de faire précipiter plus de 80 % du sulfate d'ammonium présent dans la fraction EI. Le précipité est séparé par centrifugation et le surnageant est concentré pour donner la fraction EIL.



**Figure 24 :** Chromatographie d'échange d'anions d'un extrait GF. L'élution est suivie par lecture de l'absorbance à 280 nm (-), mesure de l'activité inhibitrice en % (v) et de la phase de latence en sec (O) sur chaque fraction. Le gradient de sulfate d'ammonium est symbolisé en pointillés.

Conditions : les mesures d'activité inhibitrice sont réalisées selon le protocole 2.2.1 avec 5 min d'incubation et de phase de latence selon le protocole 2.2.2.

Notons qu'aucun pouvoir inactivateur n'a été détecté dans le culot. La fraction EIL permet d'inactiver 80 % de la PPO après 2 minutes d'incubation. Nous avons vérifié que la présence de méthanol dans les milieux d'incubation n'avait pas d'effet direct sur la PPO ou sur la réaction d'oxydation du 4-méthylcatéchol. VALERO *et al.* (1990) et WARRINGTON et SAVILLE (1999) ont en outre montré que ce solvant n'inhibait ou n'inactivait pas la PPO de raisin ou la tyrosinase.

### **2.6.3. Bilan de purification.**

#### **2.6.3.1. Rendement de purification.**

Une estimation du rendement de chaque étape de purification s'impose afin de vérifier si l'on conserve la totalité des agents inactivateurs au cours de la purification. Le rendement sera basé sur les valeurs d'activité inhibitrice totale obtenues en multipliant les vitesses initiales d'inactivation de la PPO (proportionnelles à la concentration en agents inactivateurs, voir chapitre 2.7.2.1) par le volume total de fraction. Pour cela, il est nécessaire d'estimer l'activité inhibitrice totale de chaque échantillon en multipliant la vitesse initiale d'inactivation par le volume total. Les résultats obtenus pour la purification des agents inactivant la PPO à partir de 3 g de préparation commerciale de papaine sont reportés dans le tableau 9.

fraction	Volume (mL)	Vitesse initiale d'inactivation (k) en minutes <sup>-1</sup>	« activité inhibitrice totale » en minutes <sup>-1</sup>	Rendement (%)
EB	6	14,06	84,36	100
GF	99	0,81	80,19	95
EI	56	1,39	77,84	92
EIL	8	4,81	38,48	46

**Tableau 9 :** Bilan de purification des composés inactivant la PPO à partir d'une préparation commerciale de papaine.

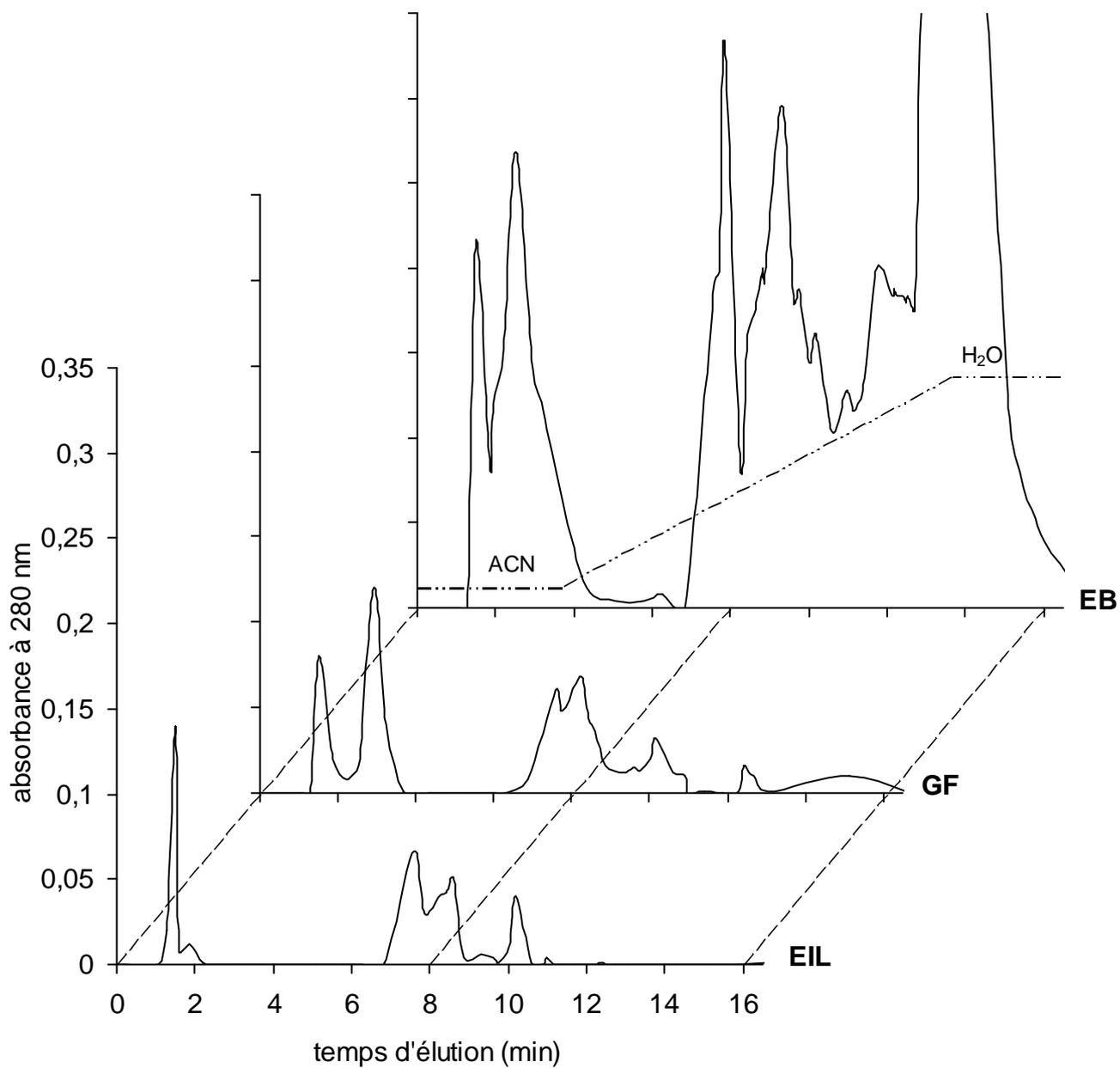
La filtration sur colonne de l'extrait brut est très efficace car elle permet de récupérer 95 % de l'activité inhibitrice totale déposée en éliminant les protéases. Le volume de la fraction GF permet de

réaliser 4 dépôts de 25 mL sur la colonne de chromatographie échangeuse d'anions, chaque dépôt permettant d'obtenir 14 mL de fraction EI. Le rendement des 4 chromatographies échangeuses d'anions est donc proche de 97 % et le pouvoir inactivateur est multiplié par 1,7 au cours de cette étape, ce qui témoigne de son efficacité. Enfin, la concentration de la fraction EI (concentrée 20 fois) permet de multiplier la vitesse d'inactivation par 3,5 mais cette étape présente un rendement médiocre de 50 %. Or aucune activité n'a été retrouvée dans le culot de sulfate d'ammonium. Ce faible rendement ne s'explique certainement pas par la perte des composés, mais par une modification de leur efficacité inactivatrice au cours de la solubilisation du lyophilisat dans le méthanol. Cette étape de purification est néanmoins indispensable pour éliminer la majorité du sulfate d'ammonium de l'échantillon et concentrer l'échantillon.

#### ***2.6.3.2. Analyse HPLC des fractions obtenues au cours de la purification.***

Afin de confirmer la purification de notre extrait, nous avons analysé sur colonne HPLC les fractions obtenues à différentes étapes de purification. Le système HPLC utilisé a été optimisé après avoir testé différents principes de séparation : adsorption hydrophobe, échange d'ions, exclusion et adsorption polaire. C'est ce dernier principe qui a permis une séparation optimale et que nous avons adopté. La séparation se fait donc sur une colonne de silice neutre non greffée Si60, utilisée dans les conditions décrites dans le chapitre 3.3.2. L'élution est suivie par la mesure de l'absorbance à 220, 260 et 280 nm ; seuls les chromatogrammes obtenus à 280 nm sont représentés.

La figure 25 représente les chromatogrammes obtenus en injectant l'extrait brut (EB) ainsi que les fractions issues de la chromatographie d'exclusion (GF) et de la concentration des fractions issues de la chromatographie d'échange d'anions (EIL). Le chromatogramme de la fraction EB présente deux ensembles principaux de pics larges et d'amplitude généralement supérieure à 0,2 uDO. Le premier massif est élué au cours du lavage à l'acétonitrile (temps de rétention compris entre 1,5 et 4 minutes) alors que le deuxième est élué durant le gradient de polarité croissante entre 7 et 16 minutes. Le chromatogramme de la fraction GF présente deux ensembles de pics d'amplitude inférieure à 0,15 uDO. Le premier ensemble comprend deux pics élués au cours du lavage et ayant un temps de rétention de 1,5 minutes et de 3 minutes respectivement. Le second ensemble de pics, mal résolu, est élué au cours du gradient entre 7 et 11 minutes. On remarque que la chromatographie d'exclusion a permis d'éliminer de fortes quantités de matériel élué ici principalement au cours du gradient. Enfin, le chromatogramme de la fraction EIL présente un pic élué à 1,5 minutes ainsi qu'un ensemble de quatre pics mal résolus élués entre 7 et 11 minutes.



**Figure 25 :** Chromatogrammes HPLC des fractions obtenues au cours de la purification des agents inactivateurs.

Le gradient d'élution est schématisé en pointillés sur le chromatogramme de l'extrait brut (EB)

Le système HPLC est décrit au chapitre 3.3.2.

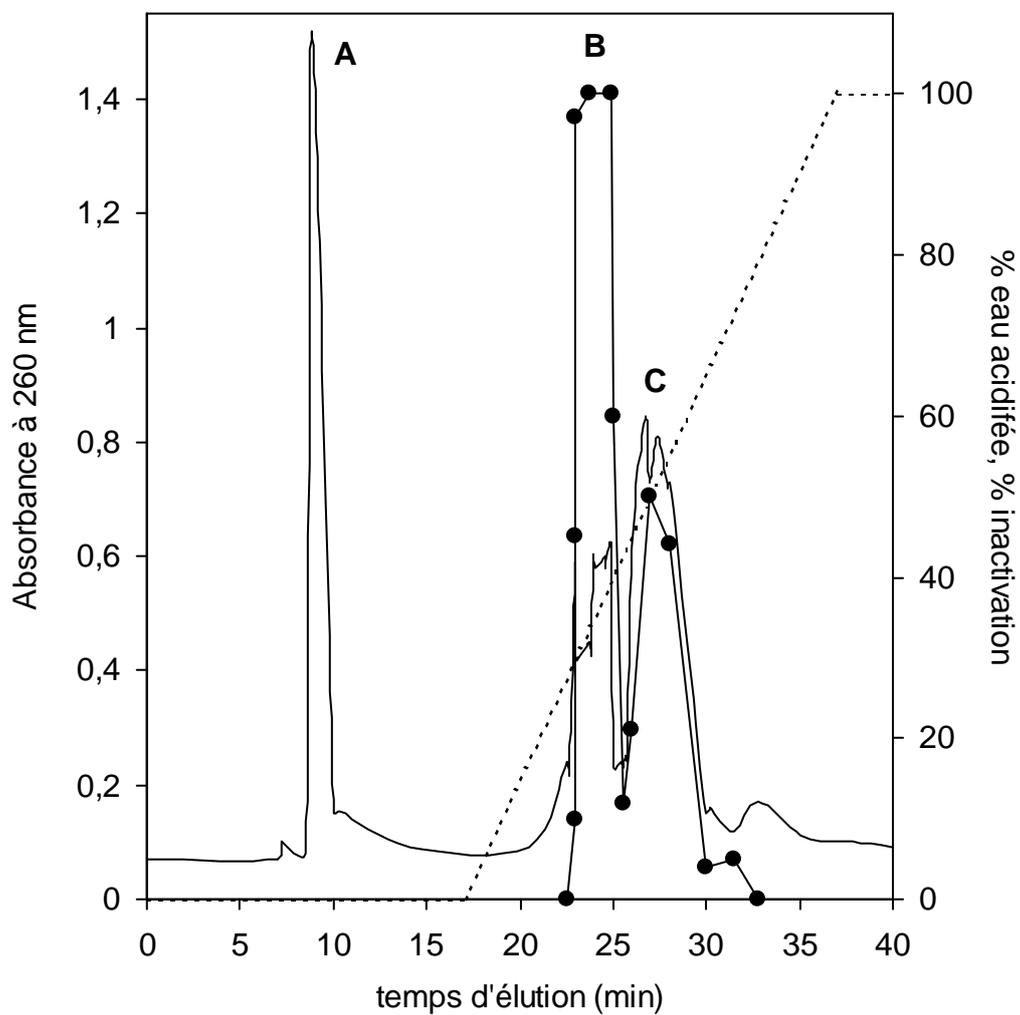
Les chromatogrammes montrent que d'importantes quantités de matériel présentes dans la préparation commerciale de papaine sont éliminées au cours de la purification. Ce protocole de purification permet donc d'obtenir une fraction inactivatrice avec un rendement satisfaisant et contenant vraisemblablement peu de matériel inactif. La mise en œuvre répétée de ce protocole de purification va nous permettre d'obtenir les quantités de composés inactivateurs nécessaires pour l'étude du mécanisme d'inactivation de la PPO et pour leur identification.

#### **2.6.4. HPLC semi-préparative.**

Avant de débiter les analyses structurales des agents inactivateurs de PPO, il s'est avéré nécessaire de mettre en place une étape de séparation des composés présents dans la fraction EIL sur une colonne HPLC semi-préparative. Nous avons testé différentes matrices HPLC en phase inverse associées à des solvants de polarité variable, sans résultat intéressant. Seul l'emploi d'une matrice de silice neutre non-greffée a permis une séparation satisfaisante.

Un spectre réalisé préalablement sur la fraction EIL présente un pic d'absorption dont le maximum est à 260 nm, alors que l'absorbance à 280 nm est très faible. Suite à ce constat, nous choisissons de suivre l'élution à 260 nm afin de mieux visualiser le matériel élué. Les fractions éluées font l'objet d'un dosage du pouvoir inactivateur vis-à-vis de la PPOS de scarole. La figure 26 représente le profil chromatographique obtenu en injectant 250  $\mu$ L de fraction EIL sur une colonne HPLC semi-préparative Si 60. Un lavage réalisé après l'élution nous a permis de vérifier que la totalité du matériel injecté était élue durant les 40 minutes d'enregistrement. Un premier pic nommé A est élué lorsque la phase mobile est constituée d'acétonitrile, puis deux massifs de pics mals résolus nommés B et C sont élués au cours du gradient pour une teneur en acétonitrile allant de 90 à 25 %. Cependant, la réalisation d'un gradient plus long n'améliore pas la séparation. L'activité inhibitrice est détectée dans les fractions coïncidant avec ces deux ensembles de pics B et C. Les fractions regroupées coïncidant avec le massif B (élué entre 22 et 25 minutes et représentant un volume de 8 mL) inhibent 97 % de l'activité PPO au bout de 10 minutes d'incubation, alors que celles coïncidant avec le massif C (élué entre 26 et 29 minutes, représentant également un volume de 8 mL) inhibent 40 % de l'activité PPO (au bout de 10 minutes). La durée du gradient de polarité croissante a été allongée afin de tenter de séparer les pics de ces deux ensembles, sans succès. Il reste donc à déterminer si les composés présents dans chacun de ces deux pics sont de familles différentes ou bien des isomères.

Les fractions correspondant aux ensembles de pics B et C sont alors recueillies et assemblées en deux fractions nommées respectivement B et C. La chromatographie est renouvelée jusqu'à



**Figure 26 :** Chromatogramme HPLC obtenu en déposant 250  $\mu$ L de la fraction inhibitrice EIL sur une colonne semi-préparative de silice non-greffée. L'élution est suivie par détection de l'absorbance à 260 nm (-) et de l'activité inhibitrice (●), le gradient est symbolisé en pointillés.

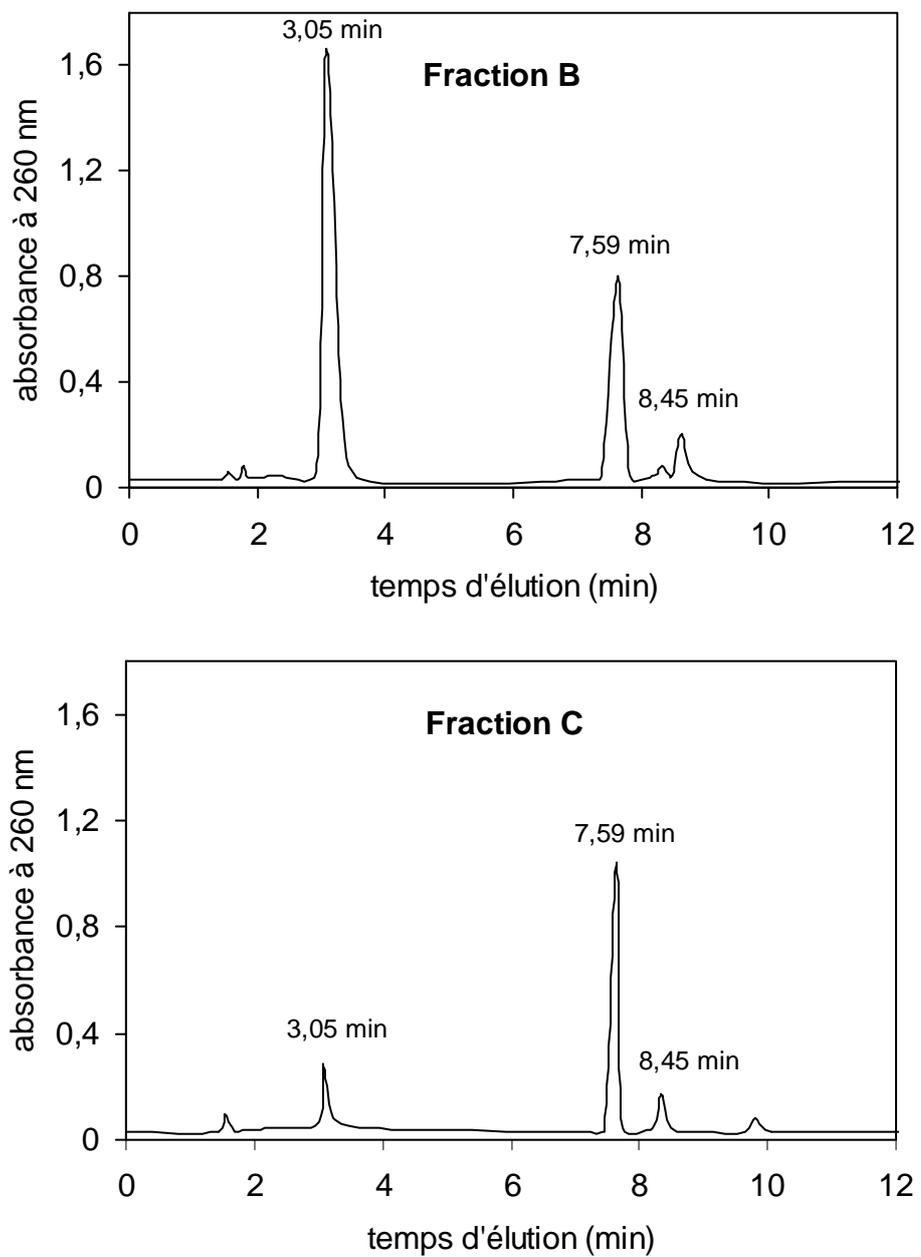
obtention de 120 mL de chacune de ces deux fractions. Ces fractions sont ensuite concentrées 100 fois à l'aide d'un Rotovapor puis analysées à l'aide du système HPLC analytique décrit dans le chapitre 3.3.2. Les chromatogrammes obtenus sont représentés dans la figure 27. Les fractions B et C présentent des profils similaires et étonnamment simples puisque constitués de 3 pics. Les composés présents dans ces deux fractions se caractérisent par des temps de rétention identiques. Seules les surfaces de pics varient d'une fraction à l'autre.

D'autre part, les deux fractions sont amenées à pH 2 ou à pH 10 par ajout d'acide chlorhydrique ou de soude avant injection sur HPLC (chromatogrammes non figurés). L'acidification se traduit par une augmentation de la surface du pic élué à 3,05 minutes et une diminution de la surface du pic élué à 7,59 minutes. L'ajout de soude dans les fractions produit l'effet inverse. Nous pouvons donc considérer que le pic élué à 3,05 minutes correspond à une forme protonée de composés alors que le pic élué plus tardivement est une forme anionique et que ces deux formes sont en équilibre dans nos conditions de pH. Rappelons que la chromatographie d'échange d'ions a révélé le caractère anionique des composés inactivateurs à pH 4,4. Nous pouvons donc supposer que les composés présents dans les fractions B et C sont de même famille, et qu'ils présentent des fonctions ayant un caractère mono-acide faible avec un  $pK_a$  inférieur à 4,4.

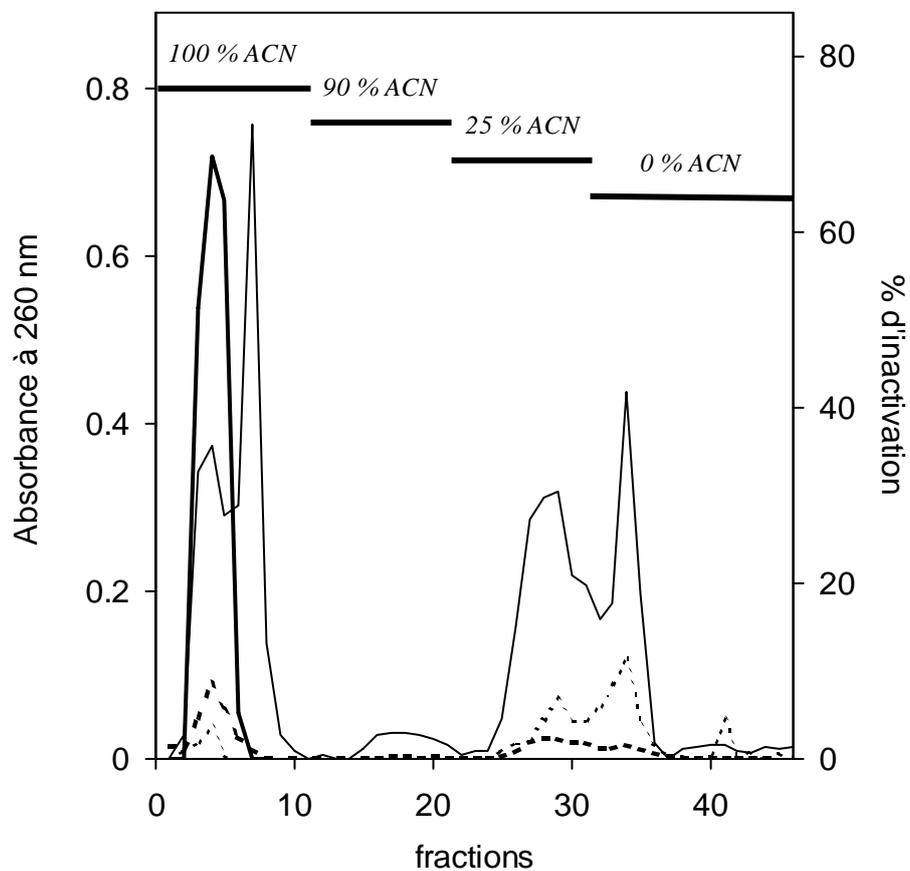
Les résultats obtenus à partir de la chromatographie semi-préparative précisent les observations que nous avons faites à partir des résultats de la chromatographie d'exclusion ; les agents inactivateurs sont probablement des polymères ou différents dérivés d'une même famille de molécules à caractère acide. L'analyse sur HPLC des fractions B et C témoigne, par la faible quantité de pics, d'un degré de pureté assez satisfaisant pour envisager une analyse en résonance magnétique nucléaire. La fraction B sera choisie pour cette analyse car elle inactive plus fortement la PPOS de scarole que la fraction C.

### **2.6.5. Séparation sur cartouche Sep Pak.**

Dans un souci de rapidité, nous avons adapté la séparation obtenue sur colonne HPLC semi-préparative aux cartouches Sep-Pak. Celles-ci rendent la séparation simple et rapide à mettre en œuvre tout en obtenant d'importantes quantités d'échantillon. Les cartouches utilisées contiennent une résine de silice neutre avec une granulométrie entre 8 et 15 fois supérieure à celle de la résine de silice neutre de la colonne HPLC semi-préparative. Les différents paliers de polarité choisis pour l'élution ont été définis à partir des résultats de la séparation sur HPLC semi-préparative. L'élution est suivie par la mesure de l'absorbance à 260 nm et du pouvoir inactivateur de chaque fraction.



**Figure 27 :** Profils chromatographiques HPLC des fractions B et C provenant de la séparation sur colonne HPLC semi-préparative. L'analyse HPLC se fait avec le système décrit au chapitre 3.3.2.



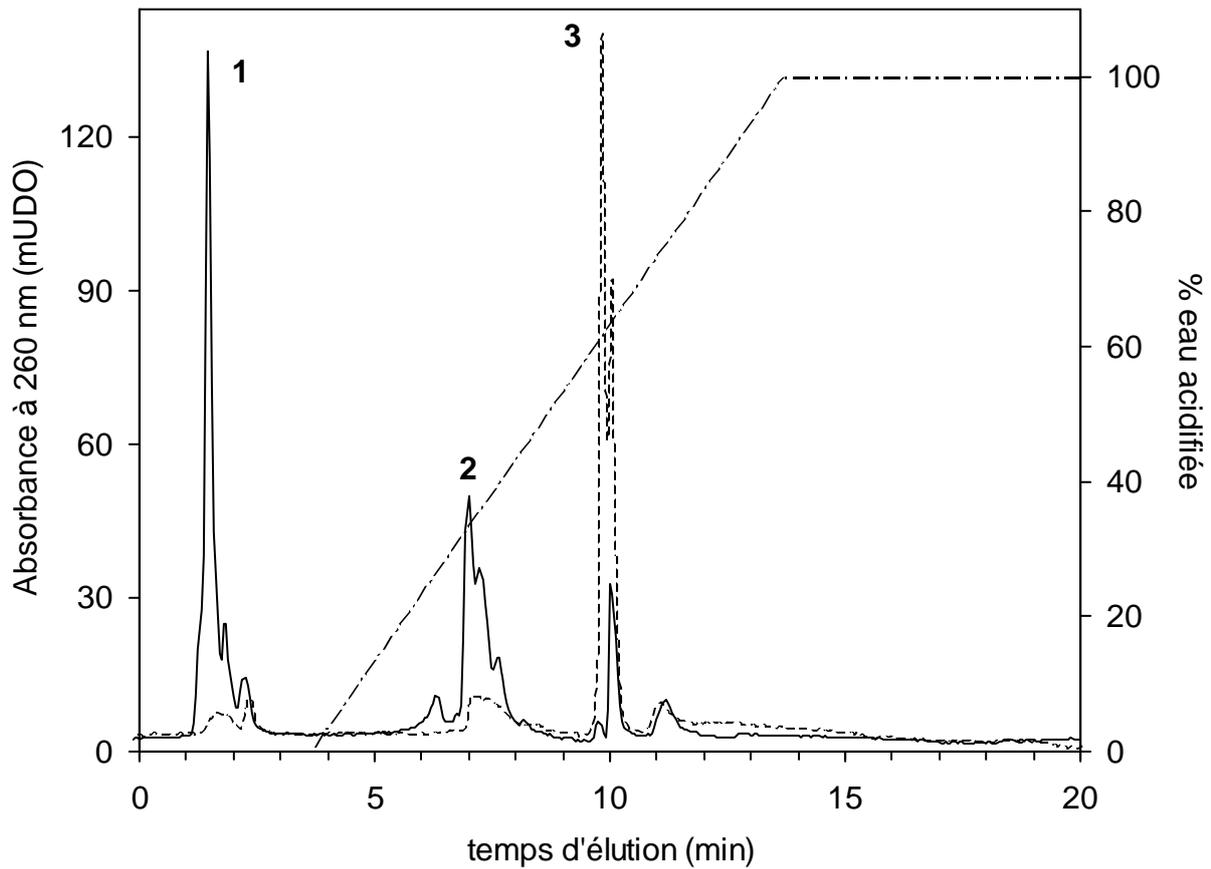
**Figure 28** : Profil d'élution de la fraction EIL sur cartouche Sep Pak Si 60.  
 (—) inhibition de la PPOS après 20 min d'incubation, absorbance à 260 nm (—)  
 , à 560 nm pour le test à la ninhydrine (.....) et à 412 nm pour le test d'Ellman (.....).

Parallèlement, les fractions ont fait l'objet de détections des groupements sulfhydryls (test d'Ellman) et des amines primaires (test à la ninhydrine).

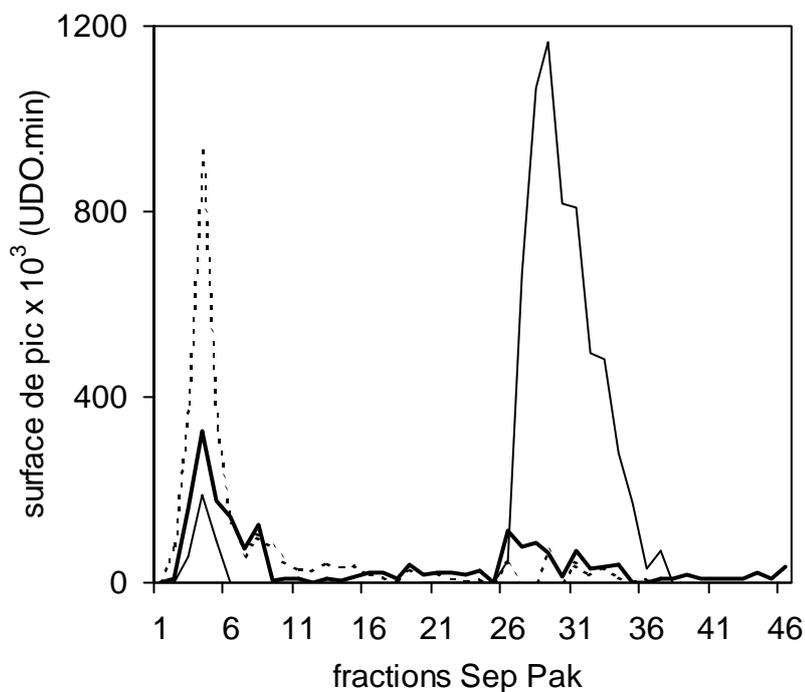
Le profil d'éluion obtenu en déposant 500 µL de fraction EIL sur cartouche Sep Pak est présenté sur la figure 28. Un premier pic est élué au cours du lavage, suivi d'un ensemble de pics élués par le solvant contenant 25 % d'acétonitrile. Cependant, la totalité de l'activité inhibitrice est éluee dès le lavage de la cartouche, alors que le matériel élué au cours des différents plateaux de polarité croissante est inactif. Contrairement à nos prévisions, le profil obtenu sur cartouche Sep-Pak ne correspond donc pas à celui obtenu sur HPLC semi-préparative. La différence de granulométrie entre les deux résines ainsi que la différence de géométrie de la colonne et de la cartouche peuvent en être la première cause. En second lieu, les deux techniques de séparation impliquent des conditions de température et de pression différentes.

Le pic de fraction inactivatrice coïncide avec une réponse positive au test d'Ellman et au test à la ninhydrine. Ce dernier test indique que la fraction la plus inactivatrice (fraction n°4) contient des amines primaires à raison de 0,04 mM équivalent cystéine, alors que le test d'Ellman y révèle la présence de groupements sulfhydryls à raison de 0,1 mM équivalents cystéine. Notons que RICHARD-FORGET *et al.* (1998) avaient estimé par la même méthode la teneur en groupements sulfhydryls à 5,5 mM en équivalents cystéine dans l'extrait GF.

Chaque fraction obtenue par Sep-Pak a été analysée sur le système HPLC décrit au chapitre 2.3.2. La figure 29 représente les chromatogrammes obtenus en injectant une fraction inactivatrice (fraction n°4) et une fraction sans effet sur la PPOS de scarole (fraction n°29). On remarque trois principaux ensembles de pics élués autour de 1,51, 7,06 et 10,05 minutes et nommés respectivement 1, 2 et 3. Leur surface et amplitude varient selon la fraction injectée. Ces profils chromatographiques rappellent fortement ceux obtenus en injectant les fractions B et C issues de HPLC semi-préparative. La fraction inactivatrice se caractérise par une surface importante des massifs 1 et 2, alors que le massif 3 semble plus caractéristique de la fraction inactive. Pour confirmer ce résultat, les surfaces des massifs 1, 2 et 3 de chaque fraction Sep Pak ont été reportées sur la figure 30. Il apparaît que les massifs 1 et 2 sont majoritairement présents dans les fractions inactivatrices alors que le massif 3 est majoritairement présent dans les fractions issues du lavage de la cartouche.



**Figure 29 :** Profil d'élution sur HPLC de fractions éluées de la cartouche Sep-Pak. Sont représentés les profils obtenus lorsque la fraction 4 (—) et la fraction 29 (- - -) sont déposées. Le gradient est schématisé en grands pointillés (- · - ·). Le système HPLC est décrit au chapitre 3.3.2.



**Figure 30 :** Surfaces des massifs 1 (pointillés), 2 (trait gras) et 3 (trait plein) obtenues par analyse des fractions Sep Pak à l'aide du système HPLC décrit au chapitre 3.3.2.

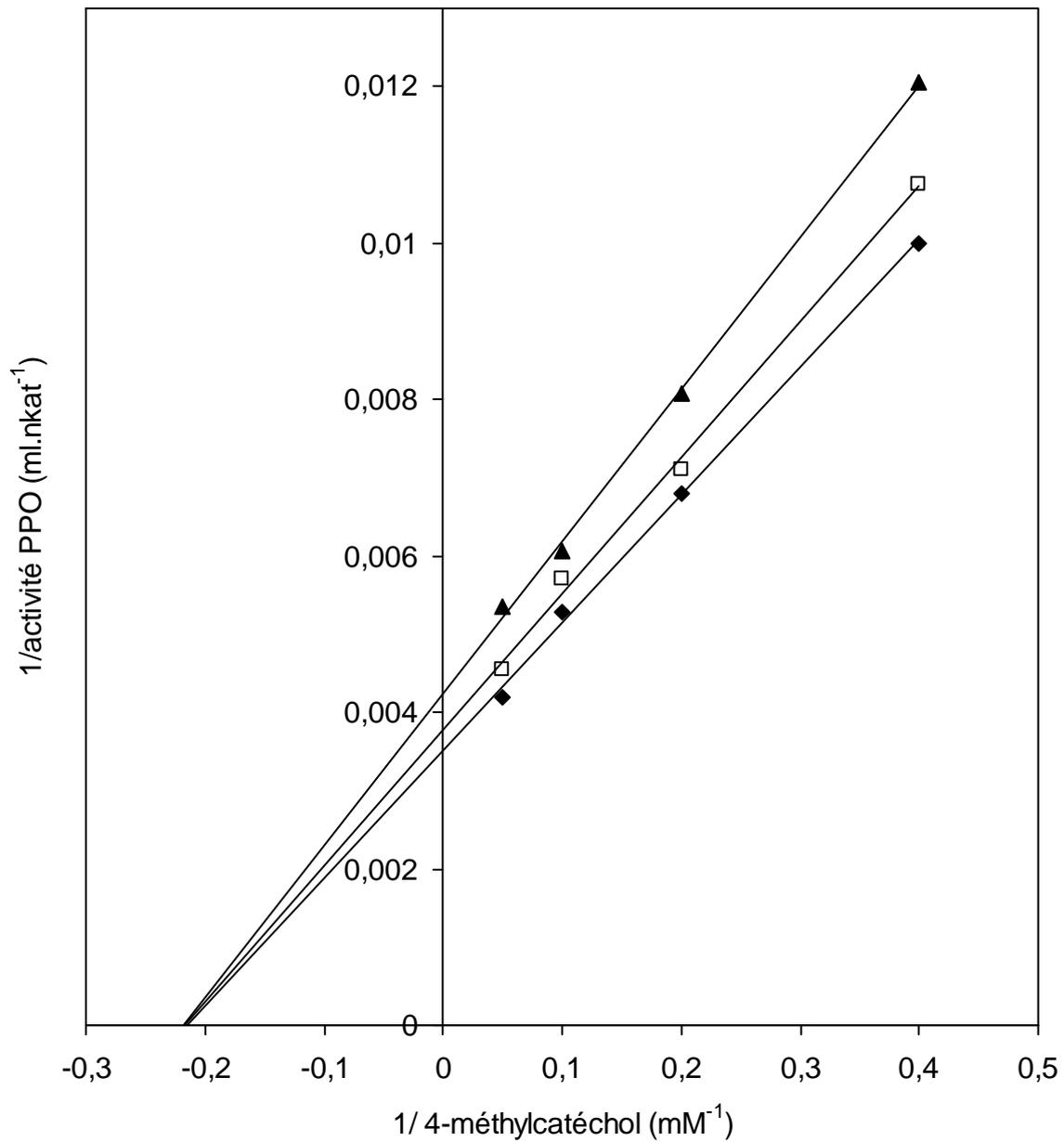
## 2.7. ETUDE DU MECANISME D'INACTIVATION DE LA PPO DE SCAROLE PAR LES COMPOSES PRESENTS DANS LA PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE.

Deux types de mécanismes sont étudiés ; un effet inhibiteur vis-à-vis de l'activité polyphénoloxydasique et un mécanisme d'inactivation ou dénaturation de la PPO.

### 2.7.1. Effet inhibiteur vis-à-vis de l'activité polyphénoloxydasique de scarole.

L'activité de la PPOS de scarole est dosée en présence de différentes concentrations d'agent inactivateur. Les dosages sont réalisés avec une concentration saturante en oxygène et à pH 4. Deux extraits de papaine plus ou moins purifiés sont testés. Le premier extrait utilisé consiste en la fraction GF et le second est la fraction inactivatrice issue de la séparation sur Sep-Pak. Dans la figure 31 sont reportés en double-inverse (selon LINEWEAVER et BURK) les valeurs d'activité mesurées en présence de différentes dilutions de la fraction GF. Le faisceau de droites convergentes sur l'axe des abscisses caractérise une inhibition de type non compétitive.

Parmi les inhibiteurs non-compétitifs des PPO cités dans la littérature se trouvent principalement les aldéhydes conjugués. Le cuminaldéhyde et l'acide cumique (KUBO et KINST-HORI, 1998a), l'ansaldéhyde et le benzaldéhyde (KUBO et KINST-HORI, 1998b) et des alkénals présents dans l'huile d'olive (KUBO et KINST-HORI, 1999a) sont tous des inhibiteurs non compétitifs de la tyrosinase de champignon. Deux mécanismes d'inhibition sont proposés par les auteurs. Ces composés seraient capables de réduire les atomes de cuivre du site actif de la PPO et seraient capables de former des liaisons covalentes avec les amines primaires portées par des acides aminés pouvant être proches du site actif de l'enzyme. Le chlorure de sodium est également un inhibiteur non compétitif de PPO de pomme (JANOVITZ-KLAPP *et al.*, 1990a) et de cœur de palmier (ROBERT *et al.*, 1998). Dans les deux cas, le pouvoir inhibiteur est accru lorsque la valeur de pH des milieux réactionnels est abaissée. Outre un effet inhibiteur des protons sur la PPO, les auteurs expliquent qu'à pH acide les ions chlorures (X) en solution se complexent avec une forme



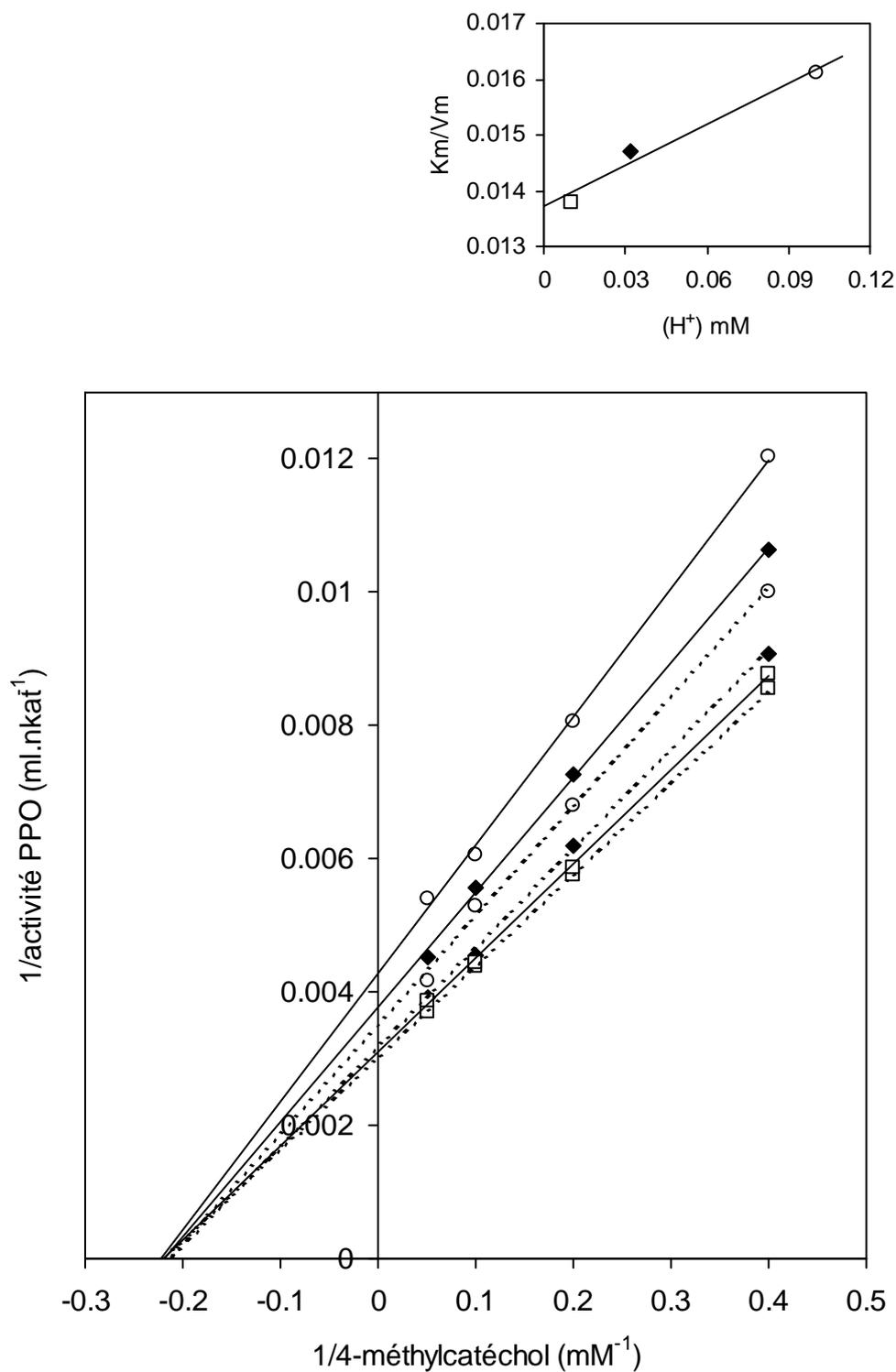
**Figure 31** : Effet inhibiteur apparent de la fraction GF sur l'oxydation du 4MC par la PPO de Scarole PPOS à pH 4 (Représentation selon LINEWEAVER et BURK).  
 Dilution de la fraction GF : 1x (▲) ; 2x (□) ; tampon acétate pH 4,4 (◆).  
 L'oxydation est réalisée avec 27 nkat de PPO.

protonnée de l'enzyme (EH) ou du complexe enzyme-substrat (EHS) pour conduire aux formes inactives EHX ou EHSX respectivement.

Nous avons testé l'activité PPO de scarole en présence de différentes quantités d'extrait inhibiteur dans différentes conditions de pH. Les représentations en double-inverse reportées dans la figure 32 montrent tout d'abord que la concentration en protons a un effet inhibiteur non compétitif sur la PPO de scarole, caractérisé par la convergence des droites (en pointillés) sur l'axe des abscisses. La constante d'inhibition apparente du proton vis-à-vis de la PPO de scarole calculée graphiquement (insert figure 32) est proche de 0,56 mM. Un effet similaire de la concentration en protons a été décrit vis-à-vis de la PPO de pomme par JANOVITZ-KLAPP *et al.* (1989), avec une constante d'inhibition apparente proche de 0,43 mM. De plus, on remarque que l'inhibition de la PPO de scarole par la fraction GF augmente lorsque la valeur de pH des milieux d'incubation diminue. JANOVITZ-KLAPP *et al.* (1990a) observaient un effet similaire du pH sur l'inhibition compétitive de la PPO de pomme par les acides sorbique, cinnamique, benzoïque. Les auteurs attribuent cet effet du pH principalement au fait que les formes protonnées de ces inhibiteurs ont une meilleure affinité pour l'enzyme que les formes anioniques.

GOUPY (1989) a montré que les sulfites, des dérivés benzoïques et des acides cinnamiques étaient des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis de la PPO de scarole en utilisant le pyrocatechol comme substrat, mais nous n'avons pas relevé dans la littérature d'inhibiteurs non-compétitifs vis-à-vis de PPO de salade. FERRAR et WALKER (1996) affirment toutefois que le mécanisme d'inhibition dépend du substrat et du type de PPO, et donc qu'un même inhibiteur peut se caractériser par plusieurs types apparents d'inhibition.

Aucune inhibition n'a été obtenue avec un extrait issu de la chromatographie d'échange d'ions ou de la cartouche Sep-Pak, quelles que soient les conditions de pH. Il apparaît donc que les composés inhibiteurs de la PPO sont perdus au cours de l'étape d'échange d'ions. On peut alors supposer que les propriétés inhibitrices et inactivatrices sont portées soit par un même composé qui subit des modifications physico-chimiques au cours de la purification et perd son pouvoir inhibiteur, soit par deux ou plusieurs types de composés dont certains sont éliminés au cours des différentes étapes de purification. KAHN et ANDRAWIS (1985) ont en outre observé que la tropolone était à la fois capable d'inactiver la tyrosinase de champignon et de se comporter comme un inhibiteur mixte de cette enzyme ; observation confirmée par VALERO *et al.* (1991) vis-à-vis de la PPO de raisin. Le même type de propriétés a été mis en évidence pour le 4-hexylrésorcinol vis-à-vis de la tyrosinase de champignon et de la PPO de pomme par FAYAD-EL DAHOUK (1998).



**Figure 32** : Effet du pH sur l'inhibition de la PPO de Scarole PPOS par la fraction GF (Représentation selon LINEWEAVER et BURK).

Les milieux réactionnels sont tamponnés à pH 4 (○), 4,4 (◆) et 5 (◻). Les droites en pointillés représentent les cinétiques réalisées en absence de fraction GF.

**Insert** : graphe secondaire des cinétiques réalisées en absence de fraction GF.

### **2.7.2. Mécanisme d'inactivation de la polyphénoloxydase de scarole.**

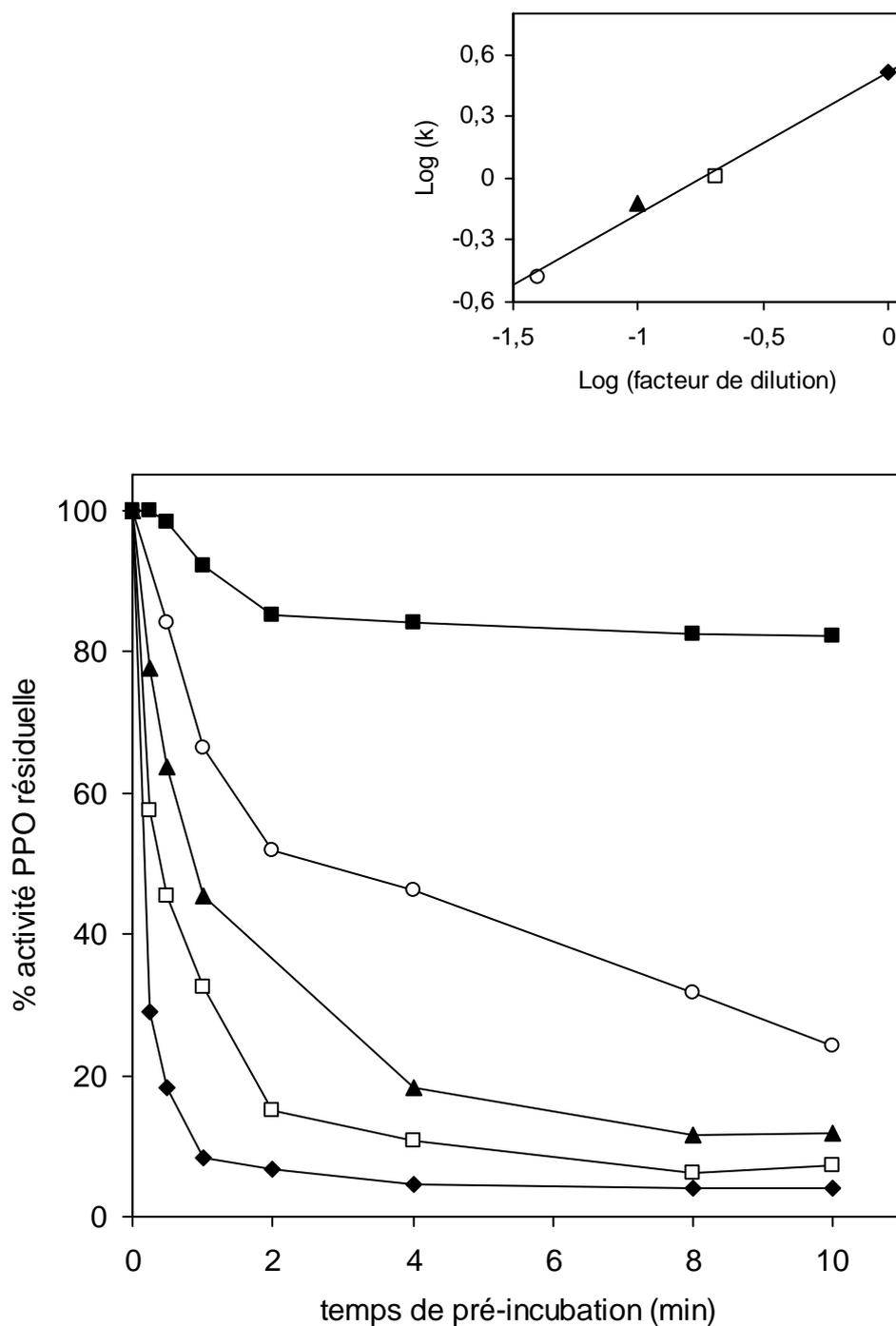
Différentes cinétiques d'inactivation ou de dénaturation de la PPOS de scarole ont été obtenues au cours de sa pré-incubation en présence d'agents inactivateurs issus de la chromatographie d'échange d'anions (fraction EI).

#### ***2.7.2.1 Influence de la concentration en agent inactivateur.***

Une première expérience a consisté à pré-incuber 14 nkatal de PPOS avec différentes dilutions de la fraction EI à pH 4. Nous rappelons que les constantes de vitesse initiale d'inactivation ( $k$  exprimée en  $\text{minutes}^{-1}$ ) sont estimées graphiquement à partir de la valeur absolue de la pente initiale des courbes représentant le logarithme népérien de l'activité PPO résiduelle en fonction du temps de pré-incubation. Les résultats reportés dans la figure 33 montrent que la vitesse initiale d'inactivation de la PPO augmente avec la concentration de la fraction inactivatrice et que l'inactivation se fait selon le processus biphasique décrit précédemment. Les logarithmes décimaux des vitesses initiales d'inactivation sont reportés dans l'insert de la figure 33 en fonction du logarithme décimal des facteurs de dilution de la fraction inactivatrice EI. On obtient un alignement des points sur une droite dont la pente est proche de 1. Une réaction de premier ordre relie donc la constante de vitesse d'inactivation à la concentration en agent inactivateur. La vitesse d'inactivation est donc directement proportionnelle à la concentration en agent inactivateur. Nous confirmons ainsi les résultats obtenus avec un extrait brut de papaine par FAYAD-EL DAHOUK (1998) qui ne propose pas d'explication claire à ce mécanisme d'inactivation. D'après YONG *et al.* (1990), l'inactivation de la tyrosinase par différentes concentrations d'acide oxalique obéit à une loi de deuxième ordre. Ce dernier composé serait capable en effet de piéger un des deux atomes de cuivre du site actif de la PPO.

#### ***2.7.2.2. Influence de la quantité de PPO présente initialement dans le milieu réactionnel.***

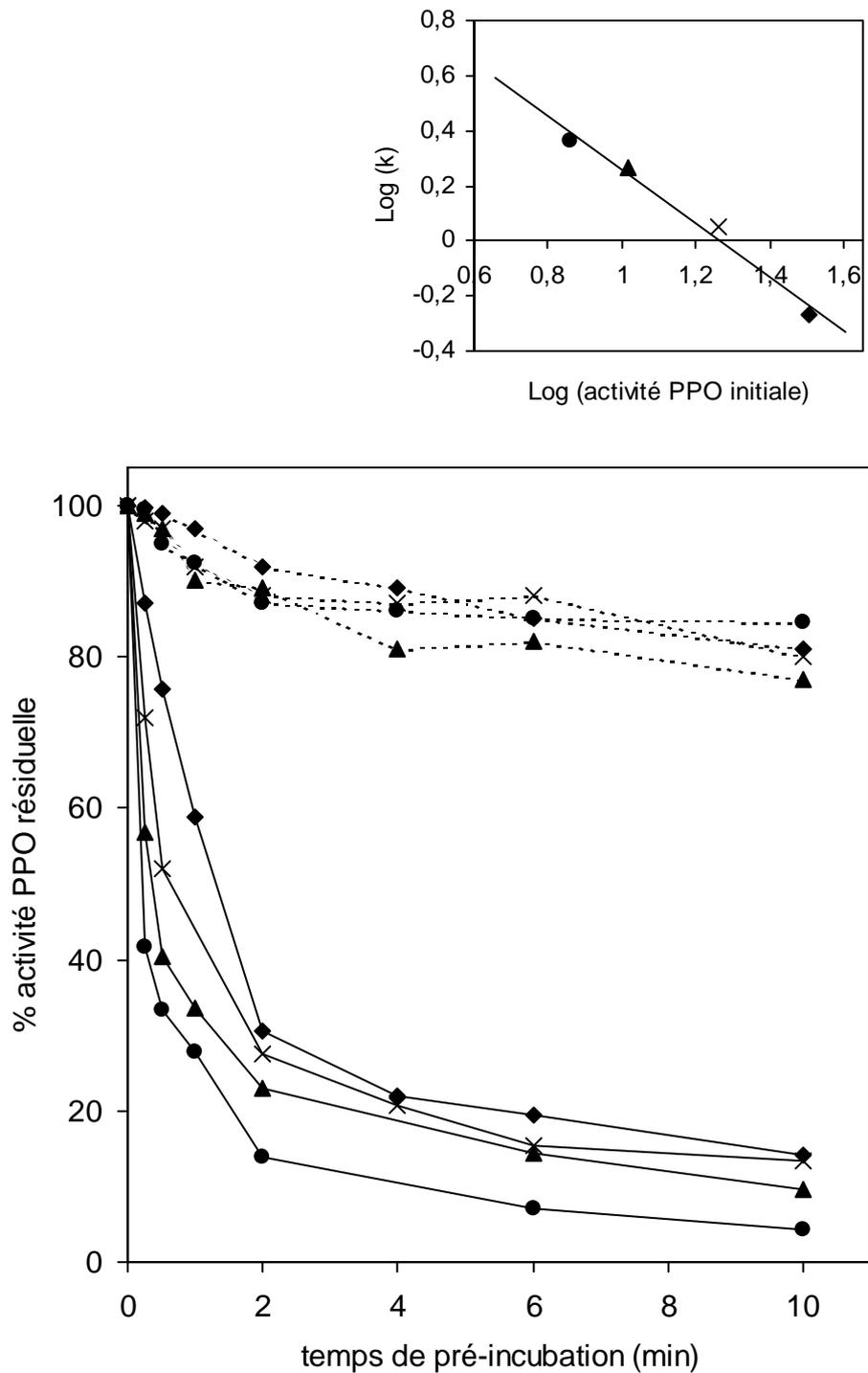
La deuxième expérience a consisté à pré-incuber différentes activités initiales de PPOS avec la fraction EI à pH4. Les résultats sont reportés dans la figure 34. Les courbes témoin montrent que l'activité PPO est stable dans nos conditions expérimentales. L'inactivation est d'autant plus importante que l'activité PPO initiale est plus faible. La constante de vitesse initiale d'inactivation ( $k$  exprimée en



**Figure 33 :** Effet de la concentration de la fraction inactivatrice EI sur la PPOS.

Conditions : 14 nkatal de PPOS sont pré-incubés à 20°C avec 50  $\mu$ L d'une solution de tampon acétate pH 4 (v), la fraction EI est diluée dans cette dernière solution 25 fois ( $\mu$ ), 10 fois ( $\sigma$ ), 5 fois ( $\square$ ) et non diluée ( $\nu$ ), le tout tamponné à pH4. L'activité PPO résiduelle est mesurée polarographiquement sur des aliquotes de 100  $\mu$ L.

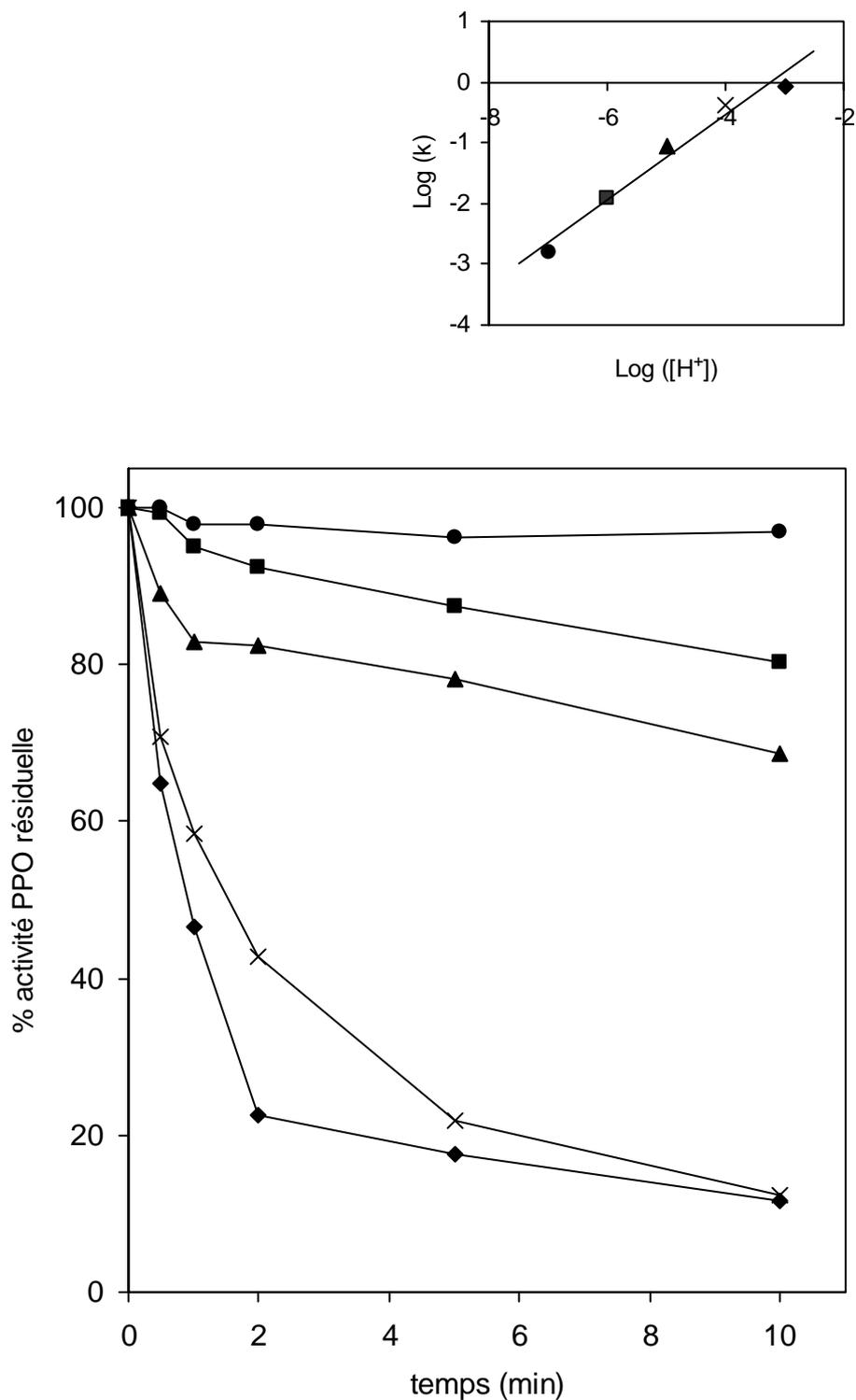
**Insert :** Log (vitesse initiale d'inactivation = k) en fonction du Log (facteur de dilution).



**Figure 34 :** Effet de la concentration initiale de PPO sur son inactivation par la fraction EI.

Conditions : 32 ( $\nu$ ), 18 ( $\varsigma$ ), 10 ( $\sigma$ ) et 7 ( $\lambda$ ) nkatals de PPOS sont pré-incubés à 20°C et à pH 4 avec la fraction EI (ou une solution de tampon acétate à pH 4 ; courbes en pointillés). L'activité PPO résiduelle est mesurée polarographiquement sur des aliquotes de 100  $\mu\text{L}$ .

**Insert :**  $\log$  (constante de vitesse initiale d'inactivation =  $k$  en  $\text{min}^{-1}$ ) en fonction du  $\log$  (activité PPO initiale).



**Figure 35 :** Effet apparent du pH sur l'inactivation de la PPOS.

Conditions : 14 nkat de PPOS sont pré-incubés avec 50  $\mu\text{L}$  d'une fraction EI à 20°C en présence de 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de tampon phosphate-citrate à pH 3 ( $\upsilon$ ), 4 (5), 5 ( $\sigma$ ), 6 ( $\nu$ ) et 7 ( $\lambda$ ). L'activité PPO résiduelle est mesurée polarographiquement sur des aliquotes de 100  $\mu\text{L}$ .

**Insert :**  $\log$  (vitesse initiale d'inactivation =  $k$ ) en fonction du  $\log$  ( $[\text{H}^+]$ ).

minutes<sup>-1</sup>) augmente également de manière significative quand l'activité PPO initiale diminue. Lorsque l'on reporte le logarithme décimal des vitesses initiales d'inactivation en fonction du logarithme à base 10 de l'activité PPO initiale, on déduit un ordre de réaction égal à  $-1$ , c'est-à-dire que la vitesse d'inactivation est inversement proportionnelle à l'activité PPO initiale. Ce mécanisme paraît donc différent de celui mis en jeu dans l'inactivation de la tyrosinase par l'oxalate, dans lequel l'inactivation est directement proportionnelle à la concentration en enzyme (YONG *et al.*, 1990).

### **2.7.2.3. Influence du pH du milieu réactionnel.**

La troisième expérience consiste à pré-incuber 14 nkatals de PPOS avec la fraction EI dans des conditions de pH allant de 3 à 7. La figure 35 montre que l'inactivation de la PPO est fortement affectée par le pH. La constante de vitesse initiale d'inactivation est calculée de la même manière que précédemment mais seulement après avoir soustrait la perte d'activité PPO due aux conditions de pH. Les cinétiques témoin (courbes non représentées) montrent toutefois que la chute d'activité PPO liée aux conditions de pH ne dépasse pas 10 % de l'activité PPO initiale. L'abaissement du pH conduit à augmenter la vitesse initiale d'inactivation ; celle-ci est notamment multipliée par 7 en passant de pH 5 à 4. La droite représentée en insert de la figure 35 permet de déduire une réaction du premier ordre entre la vitesse initiale d'inactivation et la concentration en proton dans l'incubat. L'influence du pH est également très forte dans le cas de l'inactivation de la PPO par le sulfite (SAYAVEDRA-SOTO et MONTGOMERY, 1986) et par l'acide oxalique (YONG *et al.*, 1990). Ces auteurs expliquent que l'influence du pH résulterait des changements d'ionisation des agents inactivateurs et/ou des chaînes latérales des acides aminés ionisables de l'enzyme. ROUET-MAYER et PHILIPPON (1986) et JANOVIKZ-KLAPP *et al.* (1990) observent un effet similaire de l'acidification sur la dénaturation de la PPO par les ions chlorures. Ils supposent que ces ions sont capables de complexer les groupements imidazoles des histidines du site actif lorsque ceux-ci sont sous forme protonnée. De manière générale, l'influence du pH est la résultante de l'état d'ionisation des agents inactivateurs et de l'enzyme avec pour conséquence de modifier les interactions moléculaires entre ces intervenants (CONRAD *et al.*, 1994).

La vitesse d'inactivation de la PPO de scarole par la fraction EI est proportionnelle à la concentration en agents inactivateurs et en protons et inversement proportionnelle à l'activité PPO initiale. Elle peut donc s'écrire :

$$dA/dt = \alpha \cdot [\text{Inactivateur}] \cdot [\text{H}^+] \cdot [\text{PPO}]^{-1}$$

où :  $dA/dt$  = évolution de l'activité PPO résiduelle au cours du temps de pré-incubation

$\alpha$  = nombre réel.

### **2.7.3. Effet d'un traitement thermique de la préparation de papaine sur son efficacité inactivatrice.**

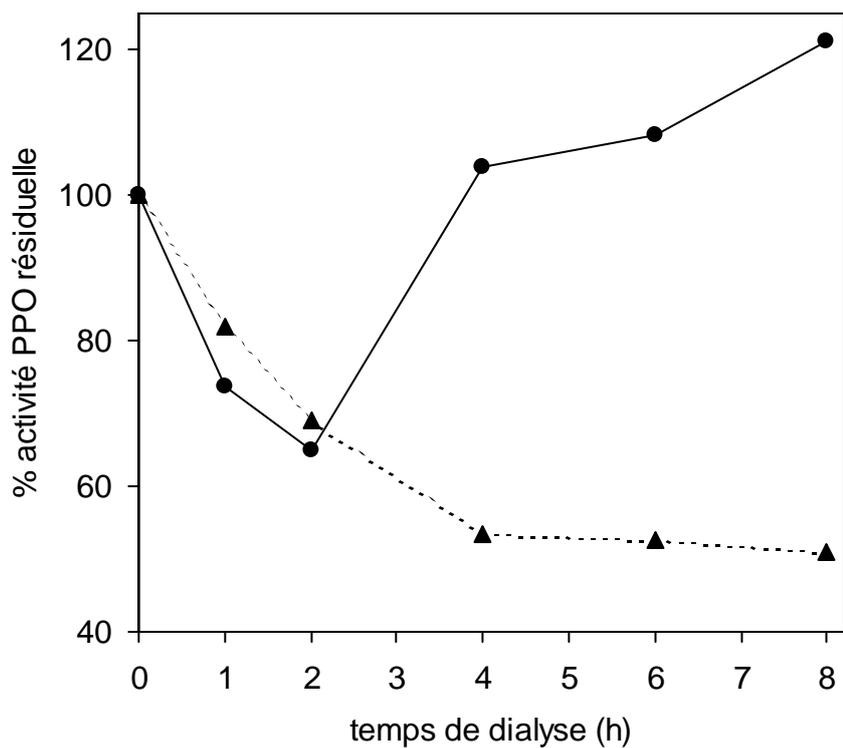
Nous avons réalisé en parallèle 2 cinétiques d'inactivation de la PPO de scarole par un extrait brut de papaine préalablement chauffé ou non pendant 20 minutes à 100°C (résultats non figurés). Il est apparu que la valeur de vitesse initiale d'inactivation n'est pas affectée par le traitement thermique. Il est donc probable que les agents inactivateurs soient stables dans ces conditions expérimentales ou bien qu'ils subissent des modifications structurales n'altérant pas leur activité.

### **2.7.4. Réversibilité de l'inactivation de la PPO de scarole.**

#### **2.7.4.1. Après dialyse.**

La réversibilité de l'inactivation de la PPO de scarole est dans un premier temps vérifiée par simple dialyse. Notons que l'extrait enzymatique PPOS utilisé est un extrait dialysé pendant 12 h contre une solution de Tampon phosphate monosodique (0,1 M) à pH6. Dix nkatals de PPO dialysée ont été pré-incubés avec la fraction EI pendant 10 minutes à pH 4. L'incubat est ensuite dialysé contre une solution de tampon phosphate-citrate à pH 4 pendant 8 h. L'évolution du volume du dialysat ainsi que l'évolution de l'activité PPO résiduelle sont suivies. Cette dernière est exprimée en  $\text{nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$  de dialysat. Le témoin est réalisé en dialysant un extrait PPO dilué de telle sorte que son activité initiale soit proche de celle de la PPO pré-incubée 10 minutes avec la fraction EI.

L'évolution au cours de la dialyse de l'activité PPO résiduelle préalablement incubée ou non avec la fraction EI est reportée dans la figure 36. On remarque une régénération de l'activité PPO pré-incubée avec la fraction EI à partir de 4 h après le début de la dialyse pour atteindre 120 % de



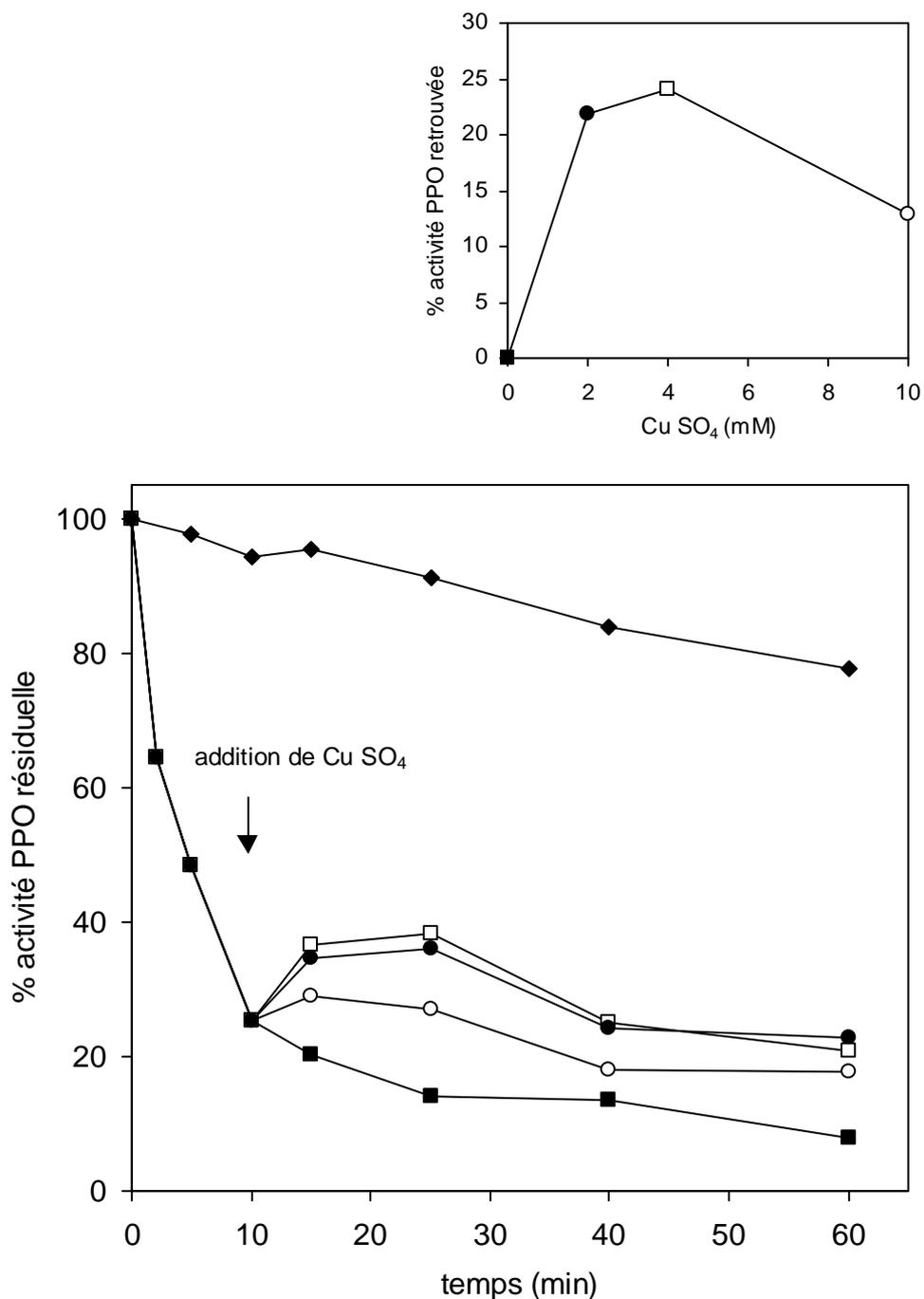
**Figure 36 :** Effet de la dialyse sur la PPO partiellement inactivée par la fraction EI.

Conditions : 10 nkatal de PPOS sont pré-incubés avec 400  $\mu$ L de fraction EI ( $\lambda$ ) ou de solution tampon acétate à pH 4 ( $\sigma$ ) dans 800  $\mu$ L d'une solution de tampon phosphate-citrate à pH 4 pendant 10 min. Les incubats sont ensuite dialysés contre 250 mL d'une solution de tampon phosphate-citrate à pH 4 renouvelée 4 h après le début de la dialyse. L'activité PPO est dosée polarographiquement sur des aliquotes prélevées au cours de la dialyse.

l'activité initiale. Notons cependant que cette régénération est faible puisqu'elle correspond à 5 % de l'activité PPO mesurée avant pré-incubation. Parallèlement, l'activité du témoin chute lentement pour atteindre 60 % de l'activité PPO initiale en fin d'expérience. L'inactivation de la PPO de scarole par l'extrait de papaine semble donc partiellement réversible par dialyse. Il en est de même pour l'inactivation de la tyrosinase de champignon par la tropolone (KAHN et ANDRAWIS, 1985) ou l'acide kojique (KAHN *et al.*, 1995). Dans ces 2 derniers cas une partie de l'activité est retrouvée après une simple dialyse ou un dessalage sur Sephadex G-100. YONG *et al.* (1990) affirment également que l'inactivation de la tyrosinase par l'acide oxalique est partiellement réversible. Ces auteurs expliquent que l'inactivation est consécutive à l'arrachement d'un atome de cuivre de l'enzyme. Celle-ci se retrouve donc sous sa forme *metapo* inactive qui serait capable de capter un nouvel atome de cuivre au cours de la dialyse pour régénérer la forme active (YONG *et al.*, 1990). Notons cependant que l'inactivation de la tyrosinase par des composés réducteurs comme le dithiothréitol, le bisulfite de sodium, l'acide ascorbique et le glutathion ne paraît pas réversible par simple dialyse (GOLAN-GOLDHIRSH et WHITAKER, 1984a). Ces composés réducteurs provoqueraient dans ce cas un changement irréversible de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme en réduisant les ponts dissulfures.

#### **2.7.4.2. Effet de l'ajout de sulfate de cuivre après inactivation de la PPO de scarole.**

Notre étude se poursuit par une expérience dans laquelle 10 nkatals de PPO de scarole sont pré-incubés avec la fraction EI à pH 4. Dix minutes après le début des incubations, des solutions plus ou moins concentrées (entre 10 et 50 mM correspondant respectivement à 2 et 10 mM dans l'incubat) de sulfate de cuivre sont ajoutées. Les résultats sont reportés figure 37. Au bout de 10 minutes de pré-incubation avec les agents inactivateurs, 80 % de l'activité PPO initiale sont perdus. L'ajout de sulfate de cuivre dans l'incubat (après les 10 minutes de pré-incubation) s'accompagne d'une récupération partielle et transitoire de l'activité PPO. La réversibilité de l'inactivation de la PPO est cependant maximale pour une concentration en sulfate de cuivre de 4 mM dans l'incubat (insert de la figure 37). En effet, plus de 20 % de l'activité PPO initiale est retrouvée 15 minutes après l'ajout de cette solution de sulfate de cuivre. Une influence comparable du sulfate de cuivre vis-à-vis de l'inactivation de la tyrosinase et de la PPO de raisin par la tropolone a été observée par KAHN et ANDRAWIS (1985) et VALERO *et al.* (1991). Ces auteurs affirment que pour de fortes concentrations en sulfate de cuivre, celui-ci exerce une inhibition sur la PPO, ce qui expliquerait que l'activité PPO récupérée soit moindre. Cependant, aucune inhibition de la PPO par le sulfate de cuivre n'a été notée dans nos conditions expérimentales (résultats non figurés).



**Figure 37 :** Influence de l'addition de sulfate de cuivre sur la PPOS partiellement inactivée par la fraction EI.

Conditions : 10 nkatal de PPOS sont pré-incubés avec 50  $\mu$ L de fraction EI (ou de solution de tampon à pH 4 pour le témoin (v)) à pH 4 et à 20°C. 50  $\mu$ L d'eau distillée (v), de solution de sulfate de cuivre 10 mM ( $\lambda$ ), 20 mM ( $\square$ ) et 50 mM ( $\circ$ ) sont ajoutés après 10 min de pré-incubation. L'activité PPO résiduelle est mesurée polarographiquement.

**Insert :** activité PPO récupérée 15 min après l'addition de sulfate de cuivre en solution en fonction de la concentration en sulfate de cuivre.

Il apparaît donc que l'inactivation de la PPO de scarole par les composés présents dans la fraction EI est partiellement réversible. Cette inactivation est probablement induite par la fixation de composés chélateurs de métaux aux atomes de cuivre du site actif de l'enzyme. Une étude par spectroscopie de résonance électronique du groupement prosthétique de la PPO inactivée nous permettrait de préciser le mécanisme d'inactivation. Par ce type de méthode, YONG *et al.* (1990) ont en effet déterminé que dans le cas de l'inactivation de la tyrosinase par l'acide oxalique, l'enzyme perdait un atome de cuivre vraisemblablement suite à une complexation de ce dernier avec l'acide oxalique. D'autre part, il aurait été intéressant d'analyser si la modification des conditions de pH entraîne ou non une régénération de l'activité PPO.

#### ***2.7.4.3. Séparation des composés inactivateurs par chromatographie de chélation de métaux.***

Les résultats des études de réversibilité de l'inactivation de la PPO ont permis d'envisager d'utiliser le pouvoir chélateur de ces composés pour les isoler par chromatographie de chélation de métaux. Les essais ont été réalisés sur micro-colonnes contenant 2 mL de Chelating Sepharose sur lesquelles ont été préalablement fixés du cuivre ou du zinc (introduits sous forme de sulfate). L'équilibrage a été réalisé avec des solutions de tampon acétate à pH allant de 4 à 6 contenant différentes concentrations de NaCl. Dans tous les cas, les colonnes chargées de zinc ne retiennent pas les agents inactivateurs. Les colonnes chargées de cuivre retiennent les agents inactivateurs à pH 5,5 en présence de 0,5M de NaCl. Cependant, quelle que soit l'élution (gradient de pH, de NaCl, ou ajout d'histidine) on ne détecte aucun pouvoir inactivateur dans les fractions recueillies. Des résultats similaires ont été obtenus sur un préparatif de deux colonnes montées en série. On remarque en outre que durant l'élution, le sulfate de cuivre est lentement décroché ; sa présence dans les fractions recueillies pourrait expliquer le fait que l'on ne détecte pas d'inhibition dans celles-ci. Les agents inactivateurs ont vraisemblablement une affinité plus importante pour le cuivre sous forme dissoute que pour les atomes de cuivres liés au site actif de la PPO. Cette étude confirme cependant le pouvoir chélateur de cuivre de nos agents inactivateurs.

Cette étude du mécanisme d'inactivation de la PPO par des composés présents dans une préparation commerciale de papaine a mis en évidence la présence dans cette préparation de deux activités distinctes. La première correspond à une inhibition non-compétitive vis-à-vis de la PPO de

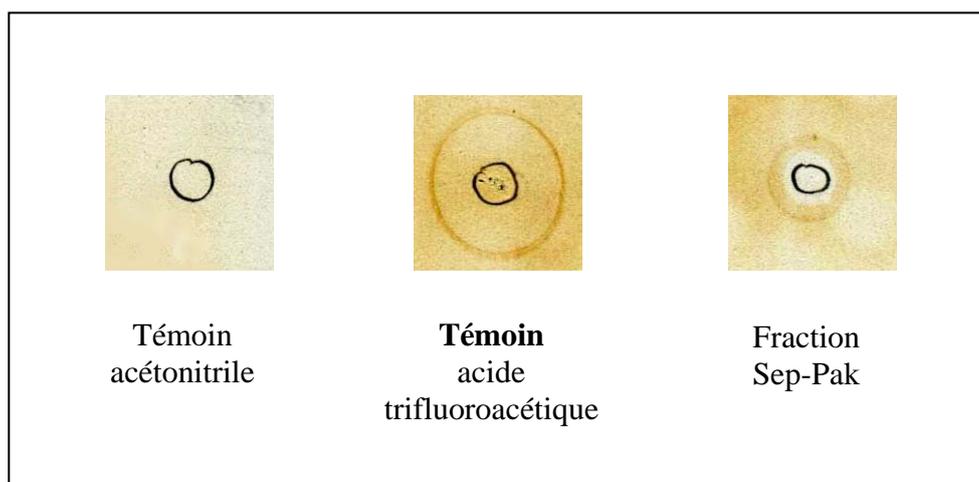
scarole, mais elle est perdue au cours de la chromatographie échangeuse d'anions. La seconde inactive lentement la PPO. Les résultats concernant l'inactivation de la PPO permettent de proposer l'hypothèse suivante. Des composés anioniques présents dans l'extrait de papaine formeraient un complexe avec les atomes de cuivre du site catalytique de l'enzyme, produisant un complexe PPO-inactivateur similaire à une forme *metapo* et dépourvu d'activité catalytique. Une diminution de la valeur de pH résulterait en la protonation des groupements imidazoles des résidus histidines du centre actif de la PPO. Cette protonation faciliterait alors la chélation de l'atome de cuivre par les agents inactivateurs. Un mécanisme similaire a été proposé par OSMIANSKI et LEE (1990) concernant l'inactivation de la PPO par le miel. Ce mécanisme fut également partiellement démontré pour l'inactivation de la tyrosinase (YONG et al., 1990) et de la PPO de pomme (FORGET- RICHARD, 1992) par l'acide oxalique.

## 2.8. IDENTIFICATION DES AGENTS INACTIVATEURS PRESENTS DANS LA PREPARATION COMMERCIALE DE PAPAINE.

### 2.8.1. Tests chimiques.

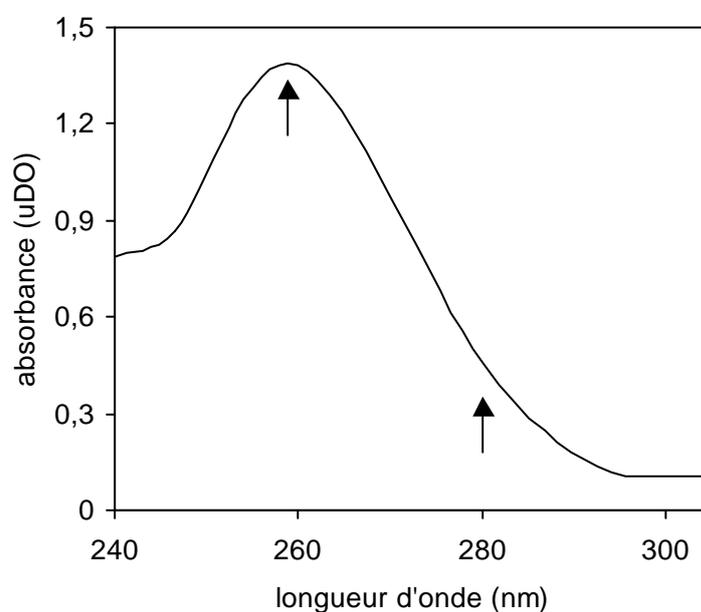
Une série de tests chimiques simples a été réalisée sur des échantillons de la fraction inactivatrice issue de la séparation sur cartouche Sep-Pak. Rappelons que le test à la ninhydrine a révélé que la fraction contenait des amines primaires à raison de 0,04 mM équivalent cystéine. D'autre part, le test d'Ellman a révélé la présence de groupements sulfhydryls à raison de 0,1 mM équivalent cystéine. Cependant, les composés piègeurs de quinones sont séparés de l'extrait au cours de la chromatographie échangeuse d'anions, ce qui supposait l'absence de groupements sulfhydryls dans les échantillons issus de cette chromatographie. Il est probable que des composés portant des fonctions sulfhydryls soient produits au cours de la mise en présence de composés soufrés présents dans les échantillons avec le méthanol ou d'une forte concentration en sulfate d'ammonium.

Deux tests qualitatifs ont été réalisés après dépôt des échantillons sur plaque de silice. Le premier a consisté à révéler la présence éventuelle de phénols par pulvérisation d'une solution de ferricyanure de potassium et de chlorure ferrique. Aucune coloration ni fluorescence sous U.V. n'a été observée, indiquant que la fraction ne semblait pas contenir de phénols. Notons qu'une réponse positive (coloration bleue et fluorescence sous U.V.) a été obtenue dans les mêmes conditions pour une solution d'acide chlorogénique à 0,02 mM.



**Figure 38 :** Test de Schweppe.

Cinq  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon sont déposés sur une plaque de silice, puis une solution de glucose ( $0,1 \text{ g.mL}^{-1}$ ) et d'aniline (1 %) dans le butanol est vaporisée. Les photographies montrent les plaques après un chauffage de 10 min à  $70^\circ\text{C}$ . Les cercles noirs représentent le diamètre des dépôts.



**Figure 39 :** Spectre UV de la fraction inactivatrice issue de la séparation sur cartouche Sep-Pak.

Le second test qualitatif a consisté en la pulvérisation d'un réactif à base de glucose et d'aniline (réactif de Schweppe) sur un dépôt de 5  $\mu\text{L}$  d'échantillon. Des dépôts de 5  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile et 5  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,05 % dans l'acétonitrile ont été testés en parallèle. Les résultats obtenus après chauffage de la plaque de silice sont représentés figure 38. Les auréoles brunes révèlent un résultat positif pour le TFA et pour la fraction Sep Pak. Notre échantillon contient donc des acides carboxyliques.

Les tests chimiques révèlent donc la présence dans la fraction inactivatrice de fonctions amines primaires, de groupements sulfhydryls et de fonctions acides carboxyliques. Cependant, aucun composé phénolique n'est détecté.

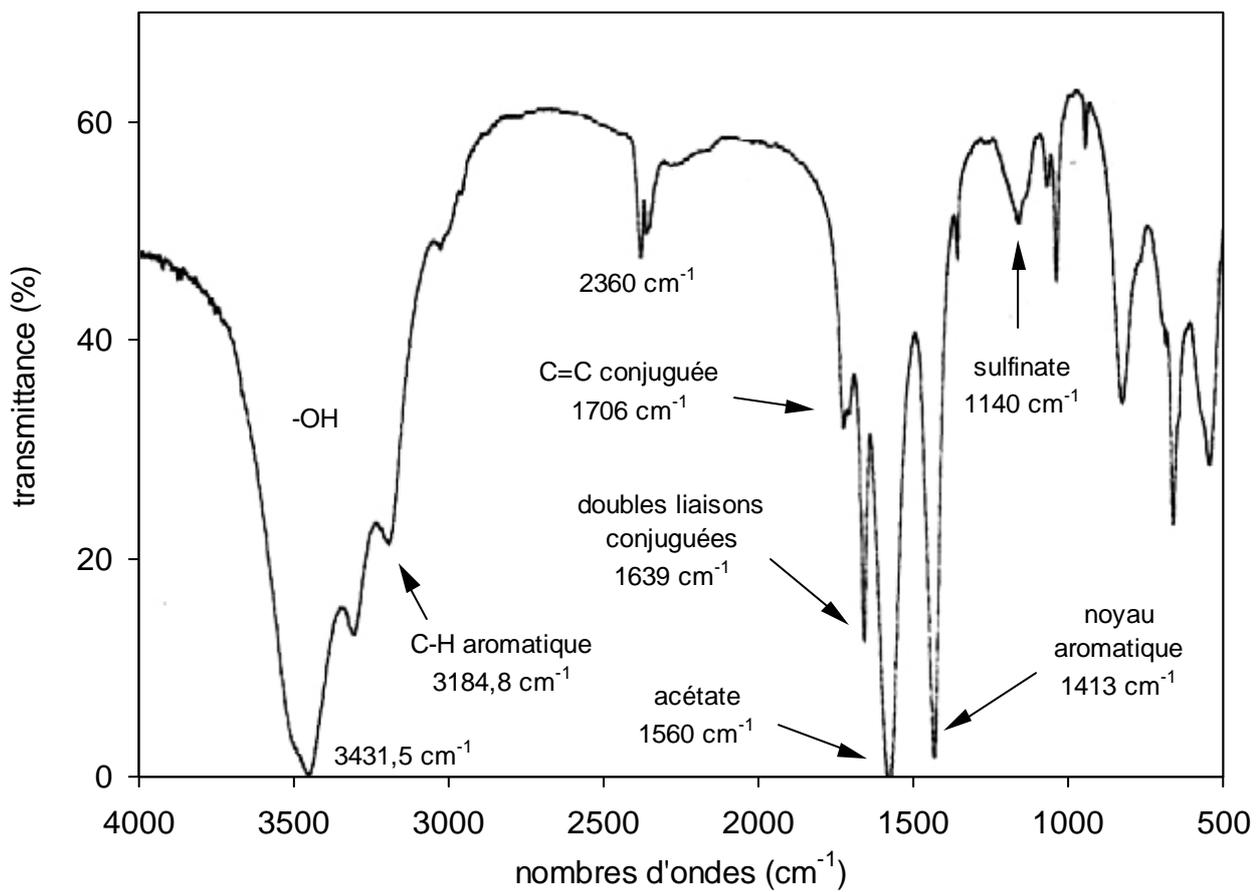
### **2.8.2. Analyse du spectre ultra-violet.**

La fraction inactivatrice issue de la cartouche Sep-Pak est analysée par spectrophotométrie Ultra-Violet. L'appareillage est un spectrophotomètre à barrette de diode Hewlett-Parckard 8452A. Le spectre obtenu pour les longueurs d'onde allant de 240 à 300 nm est représenté figure 39. On note une absorption maximale à 260 nm (1,38 uDO) alors qu'à 280 nm l'absorbance est de 0,43 uDO. Ce spectre peu spécifique suggère toutefois la présence de noyaux aromatiques substitués dans l'échantillon. Aucune absorption n'est détectée dans le visible.

### **2.8.3. Analyse du spectre infra-rouge.**

La fraction inactivatrice lyophilisée issue de la chromatographie d'échange d'anions est analysée par spectrométrie infra-rouge (analyse réalisée à l'Université d'Avignon). L'analyse consiste en l'étude du spectre d'absorption d'un échantillon excité par un rayonnement Infra-Rouge. Une partie de l'énergie du rayonnement est absorbée par l'échantillon sous forme de vibrations longitudinales (élongation des liaisons covalentes) ou transversales (déformation angulaire). La fréquence de l'énergie absorbée dépend du type de vibration produite et de la nature des molécules organiques analysées.

Le spectre obtenu est représenté dans la figure 40. Trois signaux intenses caractéristiques de liaisons très polaires sont observés. Le premier signal très intense est situé à 1560  $\text{cm}^{-1}$ . Il caractérise l'élongation de la double liaison covalente C=O d'un acide carboxylique comme l'acide acétique. L'absence de signal correspondant à une liaison O-H acide (généralement située entre 2000 et 3200  $\text{cm}^{-1}$ ) indique que le signal à 1560  $\text{cm}^{-1}$  est celui d'un sel d'acide acétique, qui correspond très



**Figure 40 :** Spectre infra-rouge de la fraction inactivatrice de la fraction issue de la chromatographie d'échange d'ions.

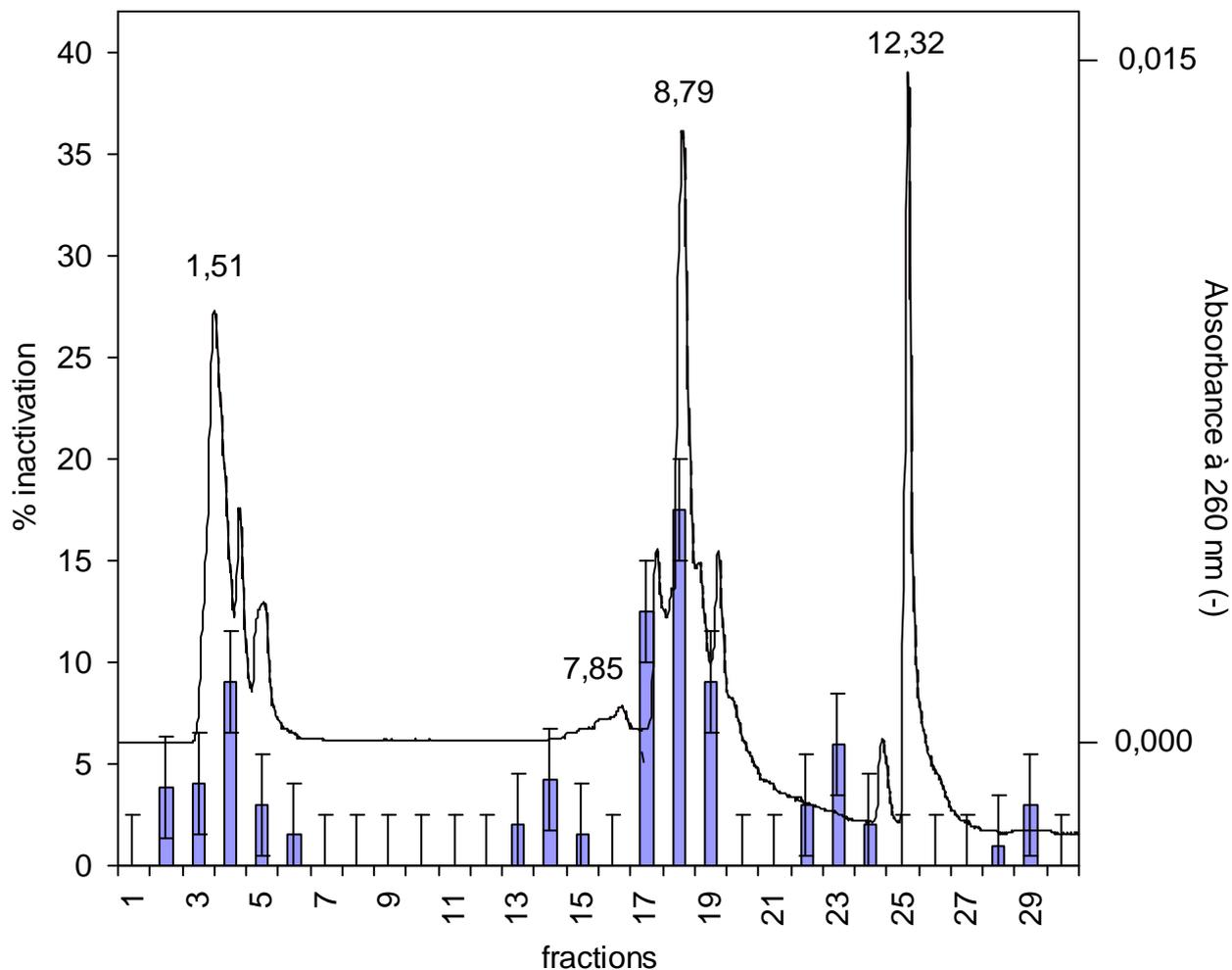
probablement à l'acétate de sodium présent dans notre solution de tampon. L'intensité de ce signal, accentuée par la forte quantité d'acétate de sodium dans l'échantillon, rend la lecture des autres signaux plus difficile. Le second signal intense s'étale de 3600 à 3100  $\text{cm}^{-1}$  et correspond au signal d'élongation d'une liaison O-H liée. La vibration nominale est de 3431,5  $\text{cm}^{-1}$ , soit inférieure à 3600  $\text{cm}^{-1}$ , ce qui indique qu'il s'agit probablement du signal d'un énol ( $\text{RC}=\text{CHOH}$ ). Ce résultat suggérant la présence de composés phénoliques est cependant contradictoire avec les résultats obtenus lors des tests chimiques (chapitre 2.9.1.) qui montraient l'absence de phénols dans l'échantillon issu de la Sep-Pak. Les composés phénoliques sont donc vraisemblablement éliminés au cours de la séparation sur Sep-Pak. D'autre part, le signal de la vibration O-H libre, théoriquement situé à 3600  $\text{cm}^{-1}$ , semble masqué dans notre cas. Ceci laisse supposer une forte dilution de ce composé dans l'échantillon. Le troisième signal intense, situé à 1413  $\text{cm}^{-1}$ , caractérise les liaisons C-C conjuguées d'un noyau aromatique substitué.

Parmi les signaux plus faibles, apparaît à 3184,8  $\text{cm}^{-1}$ , le signal d'élongation des liaisons C-H aromatiques, confirmant l'indication donnée par le signal situé à 1413  $\text{cm}^{-1}$ . On note également à 1706  $\text{cm}^{-1}$  la présence d'un signal pouvant être attribué soit à une double liaison C=C conjuguée, soit à une double liaison C=O d'une cétone ou d'une amide sous forme de trace. Rappelons toutefois que le signal produit par la double liaison C=O est théoriquement assez intense ; ce qui rend la deuxième hypothèse peu probable. Le signal situé à 1639  $\text{cm}^{-1}$  pourrait être dû à des doubles liaisons conjuguées C=C, C=O ou C=N. Enfin, à la différence des signaux précédents difficilement exploitables, le signal obtenu à 1140  $\text{cm}^{-1}$  est significatif des groupements sulfinates.

Notons que les quantités d'échantillon nécessaires à cette analyse nous ont poussé à employer un échantillon provenant de la chromatographie échangeuse d'anions. Cette fraction contient un mélange de composés, rendant l'interprétation du spectre très difficile. Toutefois, il est possible d'affirmer que cet échantillon contient outre l'acétate de sodium, des composés phénoliques et des sulfinates. Les composés phénoliques ne sont cependant pas détectés dans les fractions issues de la Sep-Pak et sont alors probablement éliminés au cours de cette étape. Ils ne seraient donc pas responsables de l'inactivation de la PPO.

#### **2.8.4. Analyses LC/MS-MS.**

L'analyse est réalisée sur un échantillon issu de la cartouche Sep-Pak.



**Figure 41** : Détection du pouvoir inactivateur au long de la séparation HPLC.

Conditions : 50  $\mu$ L de fraction inactivatrice issue de la Sep Pak sont injectés sur une colonne Si 60 analytique. Des fractions de 400  $\mu$ L sont recueillies, concentrées 32 fois avant d'être l'objet d'un dosage polarographique du pouvoir inactivateur.

Les temps de rétention des principaux pics sont exprimés en min et indiqués au-dessus de chacun d'entre eux.

#### **2.8.4.1. Détermination des pics à analyser en spectrométrie de masse.**

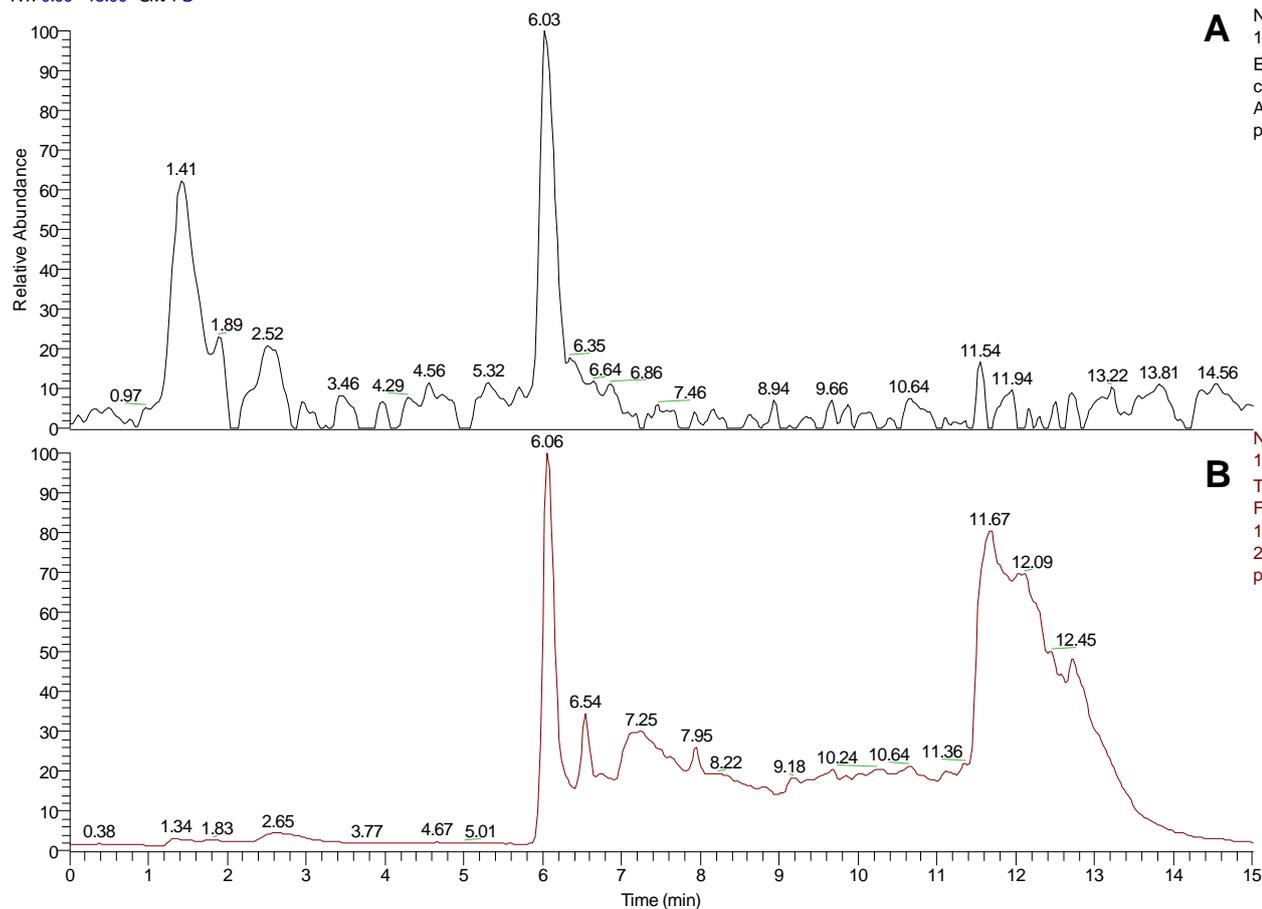
Nous rappelons que l'analyse sur HPLC de la fraction inactivatrice issue de la cartouche Sep Pak a révélé la présence de plusieurs pics dans le chromatogramme et donc de différentes entités dans l'échantillon. Les analyses spectrométriques sont donc réalisées en couplage avec une chromatographie liquide HPLC. Une expérience préliminaire, réalisée au laboratoire de la Station de Technologie, a consisté à déterminer quels pics présents sur le chromatogramme coïncident avec le pouvoir dénaturant. Pour cela, plusieurs injections consécutives de la fraction issue de la Sep Pak ont été réalisées sur le système HPLC analytique (chapitre 2.3.2). A chaque injection, des fractions de 400  $\mu$ L sont recueillies, rassemblées d'une injection à l'autre puis concentrées 32 fois par évaporation au Speed-Vacc. Les résultats des dosages du pouvoir inactivateur des fractions concentrées après 1 h de pré-incubation avec la PPOS sont reportés dans la figure 41. Tout d'abord, il apparaît que les pourcentages d'inactivation sont très faibles (inférieurs à 20 %) malgré un temps de pré-incubation avec la PPO considérable. Ce phénomène peut être attribué à la forte dilution des fractions au cours de la chromatographie. Les barres d'erreur révèlent que l'inactivation n'est significative qu'au delà de 5 %. Néanmoins, trois fractions coïncidant avec le massif élué autour de 8,79 minutes présentent un pouvoir inactivateur significatif. C'est sur cette zone du chromatogramme que nous focaliserons nos analyses en spectrométrie de masse.

#### **2.8.4.2. Analyse en mode positif.**

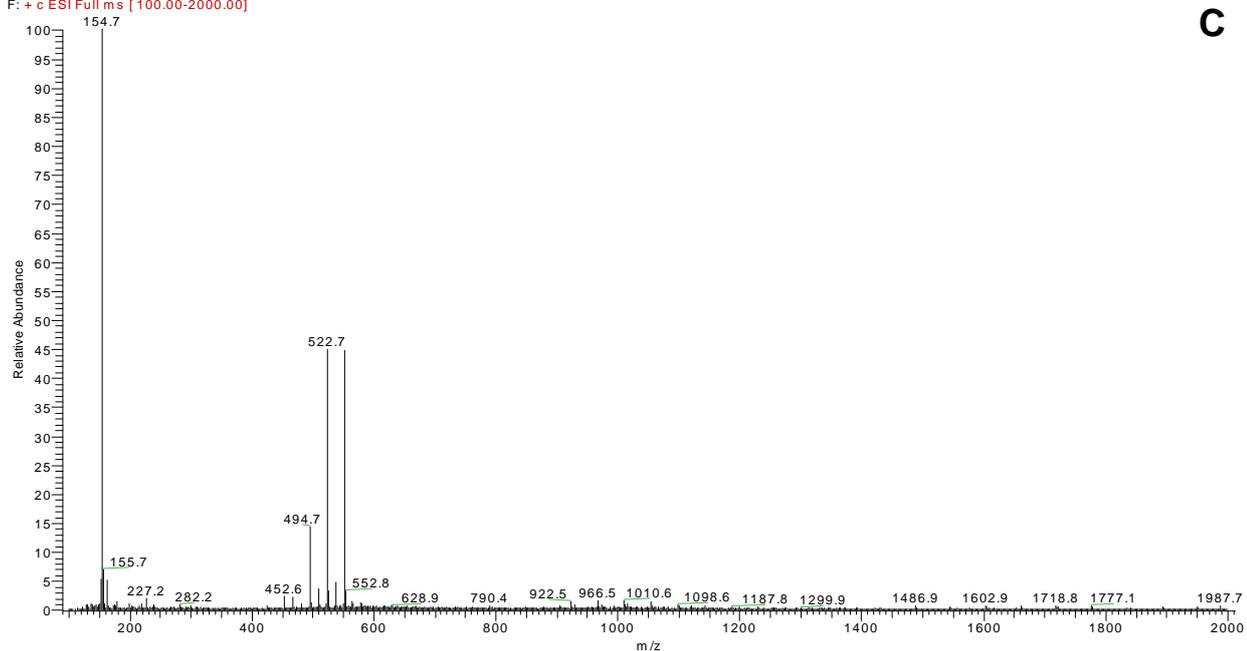
Les analyses ont été réalisées au laboratoire de xénobiotiques de l'INRA de Toulouse, en collaboration avec le Dr Laurent DEBRAUWER. Rappelons que le principe de l'analyse par spectrométrie de masse est basé sur la formation d'espèces mono ou multi chargées (positivement ou négativement) en phase gazeuse. Les abondances relatives des ions produits sont mesurées sous un vide poussé en fonction du rapport masse de l'ion sur le nombre de charges noté  $m/z$  (dans notre cas  $z = 1$ ). Les analyses sont réalisées en couplage avec un système HPLC analytique dont la colonne et les conditions d'élution sont identiques à celles décrites dans le chapitre 2.3.2.

Les résultats obtenus en injectant 50  $\mu$ L de fraction inactivatrice issue de la Sep Pak sont reportés figure 42. L'analyse Ultraviolet (figure 42A) présente un profil chromatographique similaire à celui de l'expérience préliminaire, mais avec des temps de rétention inférieurs, notamment pour le pic d'intérêt qui est dans ce cas élué au bout de 6,03 minutes au lieu de 8,8 minutes. Cette différence peut être attribuée à l'emploi de deux appareillages différents. On remarque également que

RT: 0.00 - 15.00 SM: 7G



papaine0600#207-273 RT: 6.83-8.56 AV: 67 NL: 6.03E6  
F: + c ESI Full ms [ 100.00-2000.00]



**Figure 42 :** Analyse LC-MS en mode positif de la fraction inactivatrice issue de la Sep-Pak.

**42A :** Profil chromatographique obtenu par détection UV.

**42B :** Profil chromatographique obtenu par détection du courant ionique total.

**42C :** Ions détectés entre 6,83 et 8,58 min (Full MS).

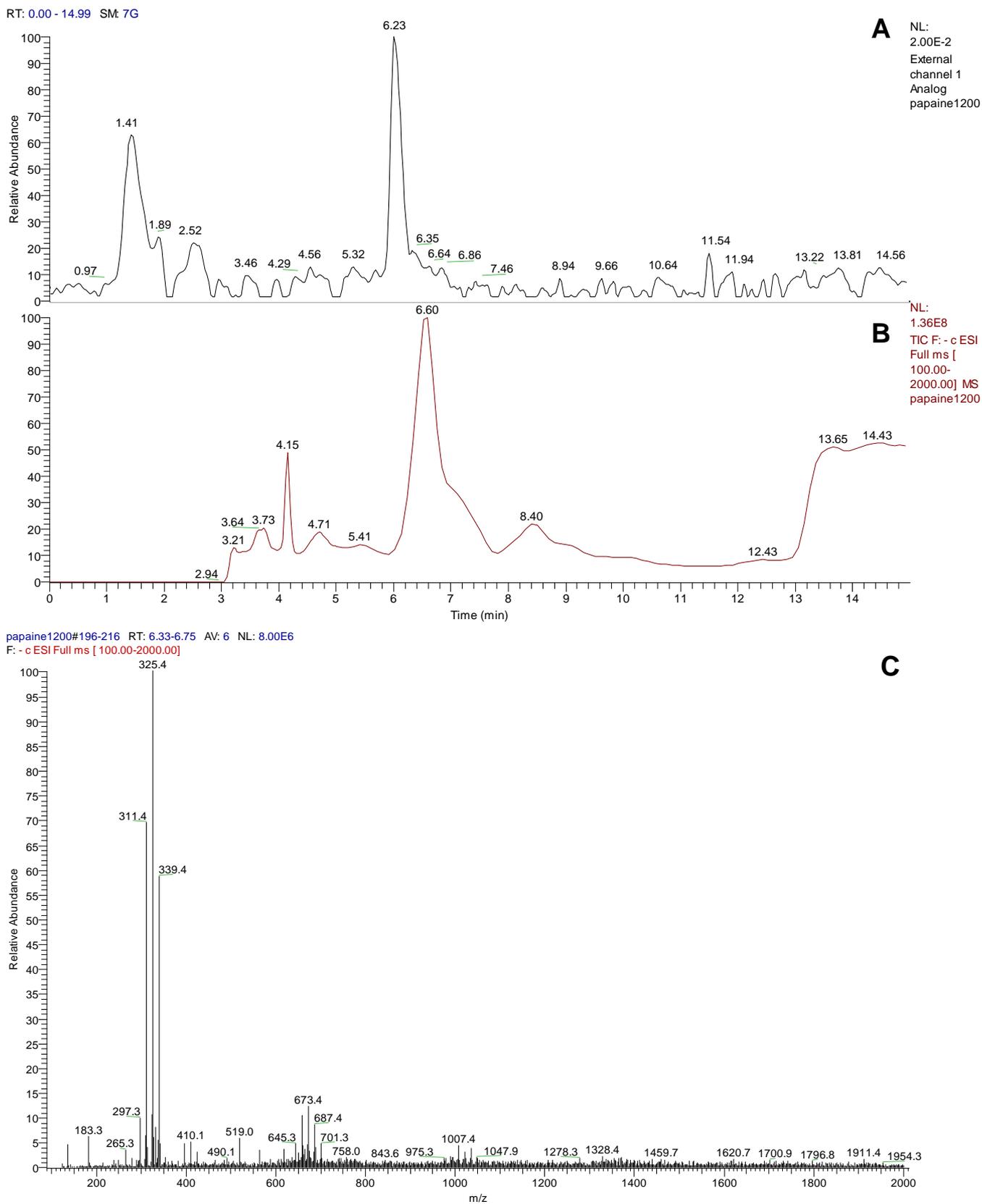
le pic élué à 11,5 minutes a une amplitude très inférieure à celle obtenue dans l'expérience préliminaire. L'intensité du profil du courant ionique total (figure 42B) montre qu'une quantité satisfaisante d'ions est formée en mode positif. Lorsque l'on s'intéresse aux ions formés sous le pic à 6,06 minutes, le spectre de masse obtenu présente un important bruit de fond rendant l'interprétation difficile. On remarque cependant qu'entre 6,83 et 8,56 minutes sont formés des ions dont le signal est intense, principalement situés à  $m/z$  154, 495, 523 et 551 (figure 44C). Notons qu'en ionisation positive on protonne la molécule, l'espèce moléculaire est donc sous la forme  $[M+H]^+$ . Par ailleurs, les fragmentogrammes reconstitués pour les espèces moléculaires  $m/z$  523 et surtout 551 révèlent que la majorité de ces ions est présente dans le pic qui nous intéresse à 6,03 minutes (résultats non figurés). D'autre part, on remarque sur le courant ionique total la présence d'un pic large élué entre 11,57 et 12,93 minutes, sous lequel se trouvent une espèce moléculaire  $m/z$  227 et une série de 23 ions répartis entre  $m/z$  363 et  $m/z$  1858, avec 68 unités de masse d'écart entre chaque espèce (résultats non figurés). Ceci correspond probablement à la répartition statistique d'un polymère caractérisé par un faible coefficient d'absorption à 260 nm.

Globalement, l'analyse en mode positif n'apporte que peu d'informations sur les composés présents dans le pic qui nous intéresse. Tous les composés présents dans l'échantillon n'ont pas été ionisés dans les conditions utilisées, c'est du moins le cas de ceux élués à 1,45 minutes. Il est alors nécessaire de procéder de manière identique en ionisation négative pour tenter d'obtenir davantage de résultats.

#### **2.8.4.3. Analyse en mode négatif.**

Selon le même procédé, les analyses sont effectuées en ionisation négative. Il s'agit de confirmer la présence des espèces chimiques détectées en mode positif et d'optimiser l'ionisation des composés présents dans le pic élué à 6,03 minutes. En ionisation négative, un proton est arraché à la molécule étudiée, l'ion formé est alors sous la forme  $[M-H]^-$ .

Les résultats de l'injection de 50  $\mu$ L d'échantillon sont représentés figure 43. On remarque tout d'abord un important pic à 6,60 minutes (figure 43B) coïncidant avec le pic d'intérêt ( $RT = 6,23$  minutes). L'intensité du courant ionique total indique que l'ionisation est aussi efficace que précédemment. Sur la figure 43C, on observe le spectre de masse correspondant aux espèces ionisées éluées entre 6,33 et 6,75 minutes. Trois ensembles de signaux apparaissent situés autour de valeurs de  $m/z$  de 325, 673 et 1021. Les poids moléculaires de ces espèces sont donc en accord avec la gamme de poids moléculaire caractérisée lors de la chromatographie d'exclusion.



**Figure 43 :** Analyse LC-MS en mode négatif de la fraction inactivatrice issue de la Sep-Pak.

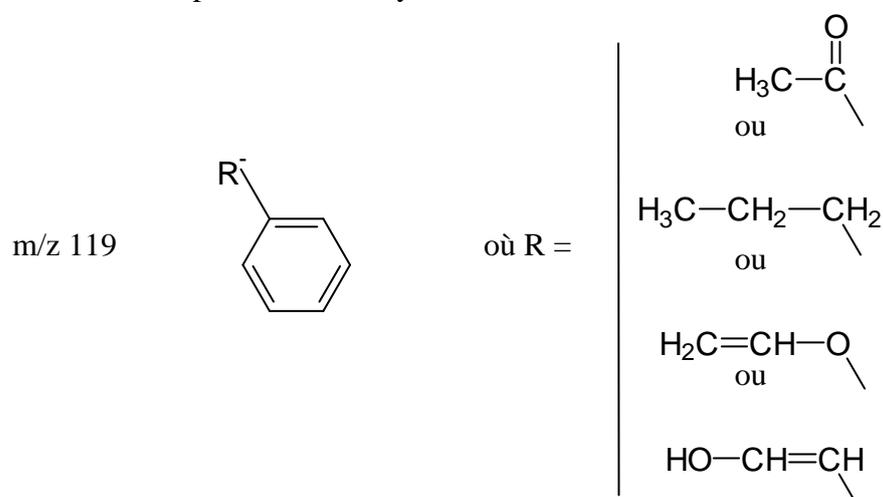
**43A :** Profil chromatographique obtenu par détection UV.

**43B :** Profil chromatographique obtenu par détection du courant ionique total.

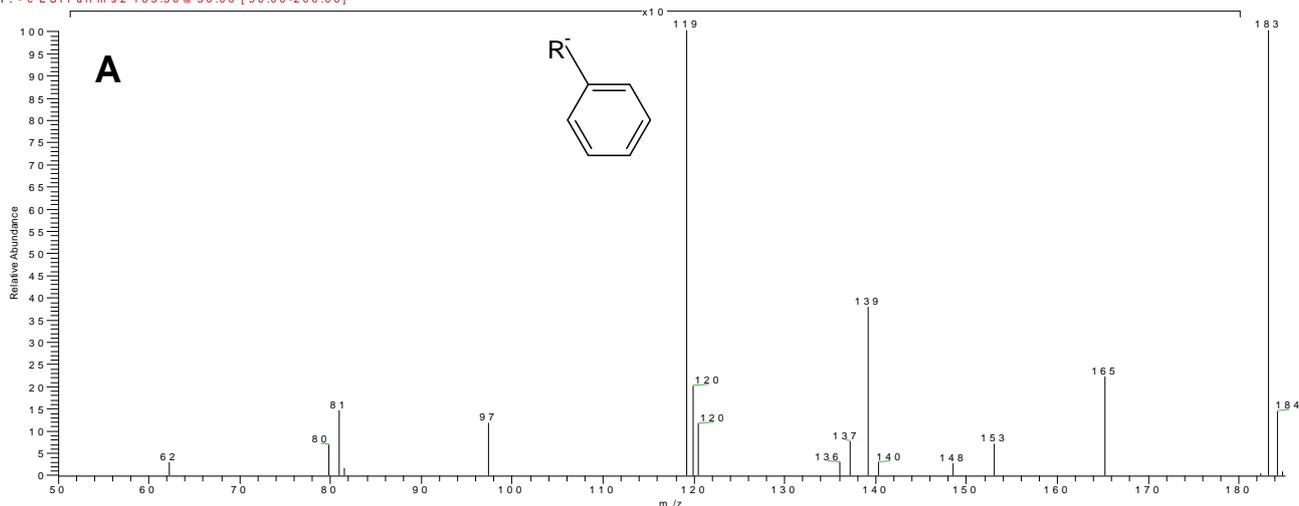
**43C :** Ions détectés entre 6,33 et 8,75 min (Full MS).

Ces ensembles de signaux suggèrent la présence d'espèces moléculaires ( $m/z$  297, 311, 325, 339) formant des adduits avec une ( $m/z$  645, 659, 673, 701) puis deux ( $m/z$  993, 1007, 1021, 1035) molécules de poids moléculaire 348. Les espèces  $m/z$  311, 325 et 339 sont prépondérantes. Ces ions paraissent donc spécifiques du pic observé en UV et sont donc à étudier de manière plus approfondie. Les ions  $m/z$  311 et 325 d'une part, 325 et 339 d'autre part, ont une différence de masse de 14 unités et pourraient donc appartenir à une même famille. Cette différence de masse pourrait provenir d'une différence d'une unité  $\text{CH}_2$  sur chaîne aliphatique. D'autre part, les espèces obtenues ici sont caractérisées par des valeurs  $m/z$  différentes de celles des ions engendrés en mode positif. Elles seraient donc issues de composés différents de ceux ionisés en mode positif.

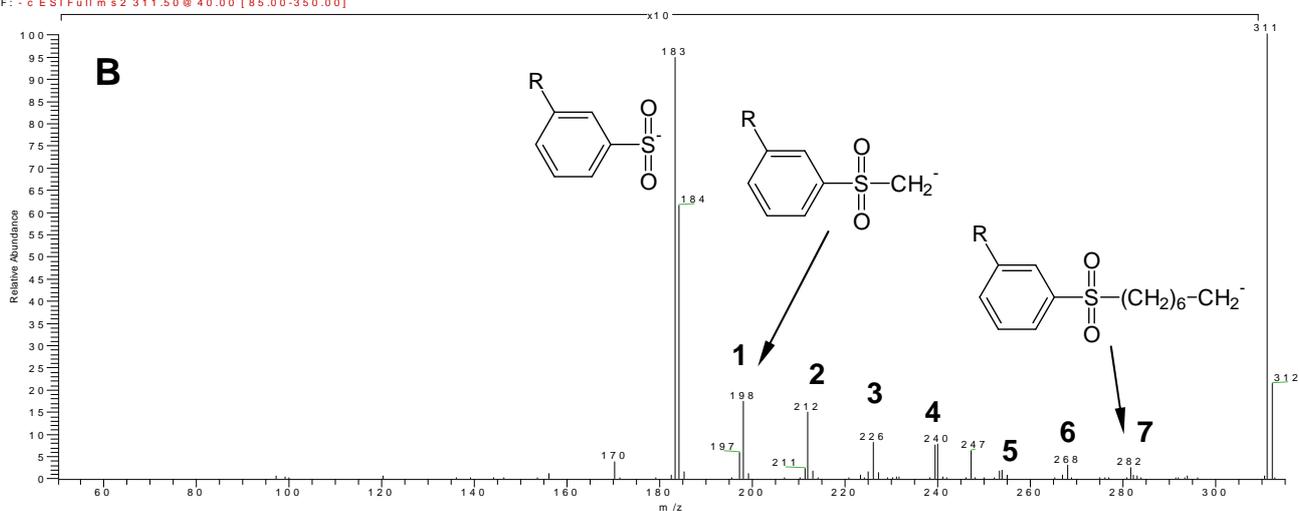
Une analyse par spectrométrie de masse en tandem ( $\text{MS}^2$ ) va nous permettre d'appréhender la structure des ions  $m/z$  183, 311 et 325 choisis comme les plus représentatifs dans notre étude. Cette technique consiste à sélectionner et isoler un ion parent en indiquant son rapport  $m/z$ . Les autres ions ayant un rapport  $m/z$  différent sont éliminés. L'ion parent est alors excité par l'application d'un voltage sur les électrodes du piège, puis se fragmente lorsqu'il rentre en collision avec les molécules d'un gaz (dans notre cas l'hélium) présent dans la trappe ionique. Des ions fils sont alors engendrés puis éjectés de la trappe d'ions pour être détectés. Nous choisissons d'analyser par cette méthode les ions  $m/z$  183, 311 et 325 obtenus en mode négatif. D'une part ces ions sont plus abondants que ceux obtenus en mode positif et, d'autre part, ils sont spécifiques du pic observé en UV qui nous intéresse. L'analyse en  $\text{MS}^2$  des ions  $m/z$  183 (figure 44A) montre que l'ion parent se fragmente principalement en ion fils à  $m/z$  119. D'autre part, les ions  $m/z$  311 (figure 44B) et 325 (figure 44C) engendrent des ions fils à  $m/z$  183. Toutes ces espèces semblent donc appartenir à la même famille. Il est possible que l'ion  $m/z$  183 (figure 44C) soit déjà un fragment des ions  $m/z$  297 à 339 généré par la source électrospray. A ce stade de l'analyse, nous pouvons proposer quelques hypothèses de structure. En considérant que les ions  $m/z$  119 représentent le noyau de base :



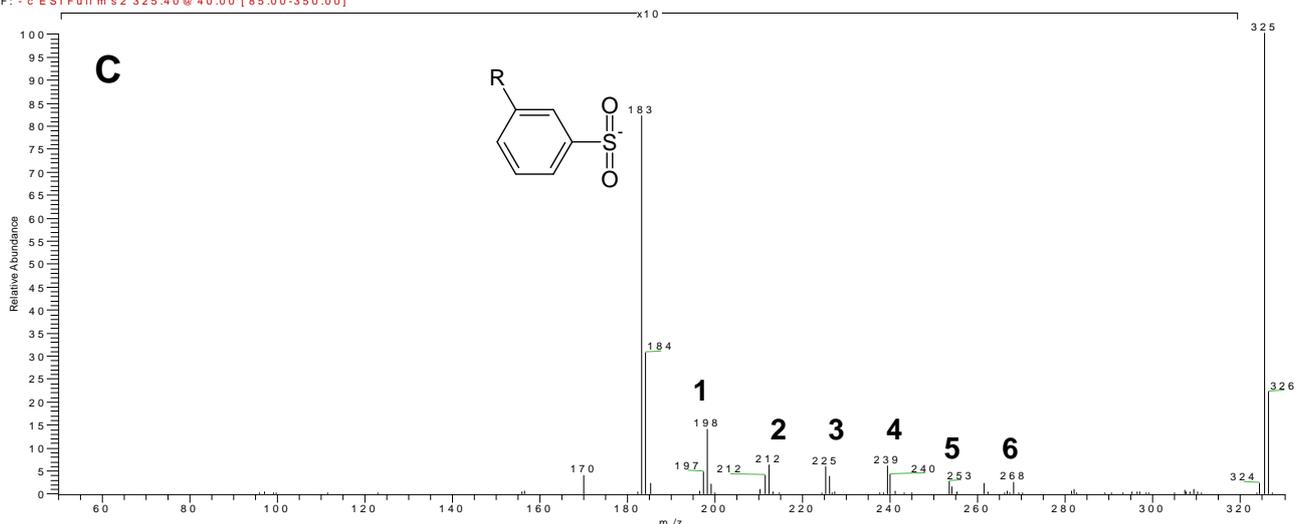
papaine1200#193-225 RT: 6.26-6.95 AV: 9 NL: 3.78E4  
F: -c ESI Full m s 2 183.30 @ 30.00 [50.00-200.00]



papaine1200#194-230 RT: 6.28-7.07 AV: 10 NL: 3.07E6  
F: -c ESI Full m s 2 311.50 @ 40.00 [85.00-350.00]



papaine1200#195-227 RT: 6.31-7.00 AV: 9 NL: 4.33E6  
F: -c ESI Full m s 2 325.40 @ 40.00 [85.00-350.00]



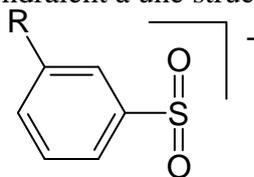
**Figure 44** : Analyse par spectrométrie de masse en tandem ( $MS^2$ ) d'ions créés en mode négatif.

**44A** : Spectre  $MS/MS$  obtenu à partir de l'ion parent sélectionné à  $m/z$  183

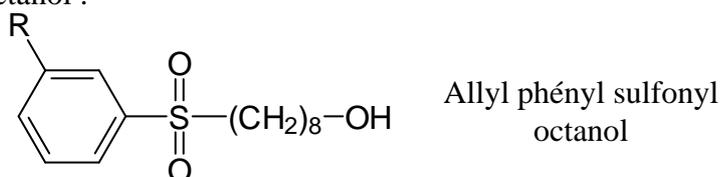
**44B** : Spectre  $MS/MS$  obtenu à partir de l'ion parent sélectionné à  $m/z$  311

**44C** : Spectre  $MS/MS$  obtenu à partir de l'ion parent sélectionné à  $m/z$  325

Les ions  $m/z$  183 correspondraient à une structure de type allyl phényl sulfone :



Les ions  $m/z$  311 se fragmentent en ions fils  $m/z$  183 correspondant vraisemblablement aux allyl phényl sulfones, mais également en 8 espèces séparées des ions 183 par une différence de 14 unités de masse atomique (voir figures 46B et 46C). Ceci laisse supposer la présence d'une chaîne aliphatique d'au moins 8 atomes de carbone. L'espèce  $m/z$  311 pourrait donc correspondre à la forme ionisée d'un allyl sulfonyl octanol :

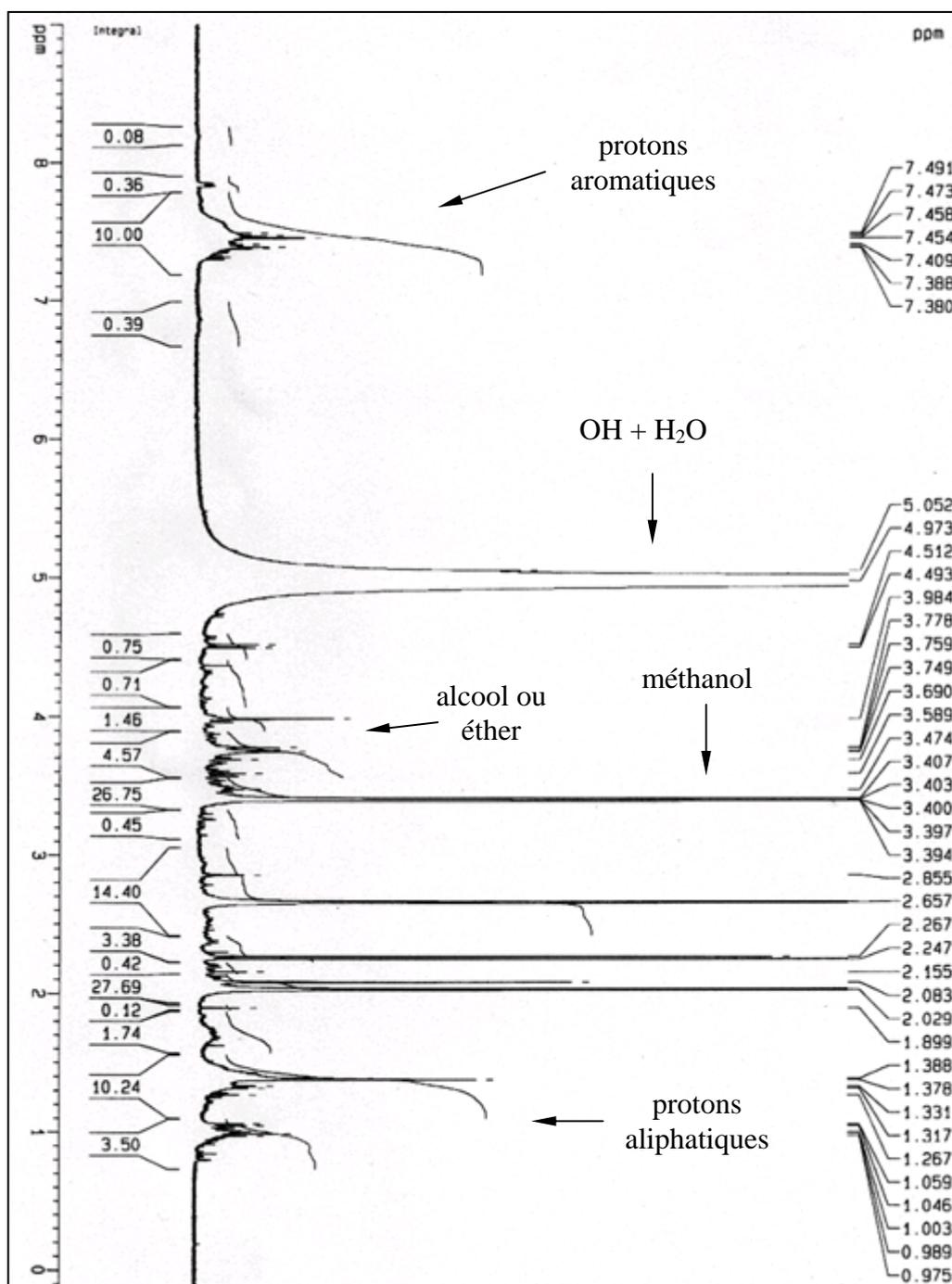


On retrouve le même type de motif aliphatique lorsque l'espèce  $m/z$  325 est fractionnée. Les ions  $m/z$  297, 311, 325 et 339 pourraient alors correspondre à des allyl phényl sulfonyls dont la chaîne aliphatique compte respectivement 7, 8, 9 et 10 atomes de carbone.

### 2.8.5. Analyse RMN $^1\text{H}$ .

Une analyse RMN du proton a été réalisée sur la fraction inactivatrice (notée B) lyophilisée issue de la séparation HPLC semi-préparative Si 60 (chapitre 2.7.4.). Le choix de cet échantillon est dû principalement à la quantité nécessaire pour ce type d'analyse. Cette étude a été réalisée sous la direction de Mr GANCET au groupement de Recherches ELF-ATOCHEM de Lacq. Le principe de résonance magnétique nucléaire consiste à détecter les renversements de spins de noyaux (dans notre cas les protons) suite à une impulsion électromagnétique dans un champ magnétique intense. Le signal obtenu dépend de l'effet électro-attracteur des noyaux environnant les protons et de l'effet de champ des liaisons covalentes (blindage) d'une part et de la position et du nombre de protons voisins du proton produisant le signal (couplage) d'autre part.

Le spectre obtenu est représenté figure 45 et détaillé figure 46. Un signal singulet très intense à 5 ppm correspond aux protons des molécules d'eau résiduelle présentes dans l'échantillon. Ce signal intense rend difficile l'interprétation des autres signaux. Le signal singulet situé à 3,4 ppm correspond aux protons du groupe méthyle du méthanol deutéré. Entre 2 et 2,7 ppm, on observe trois



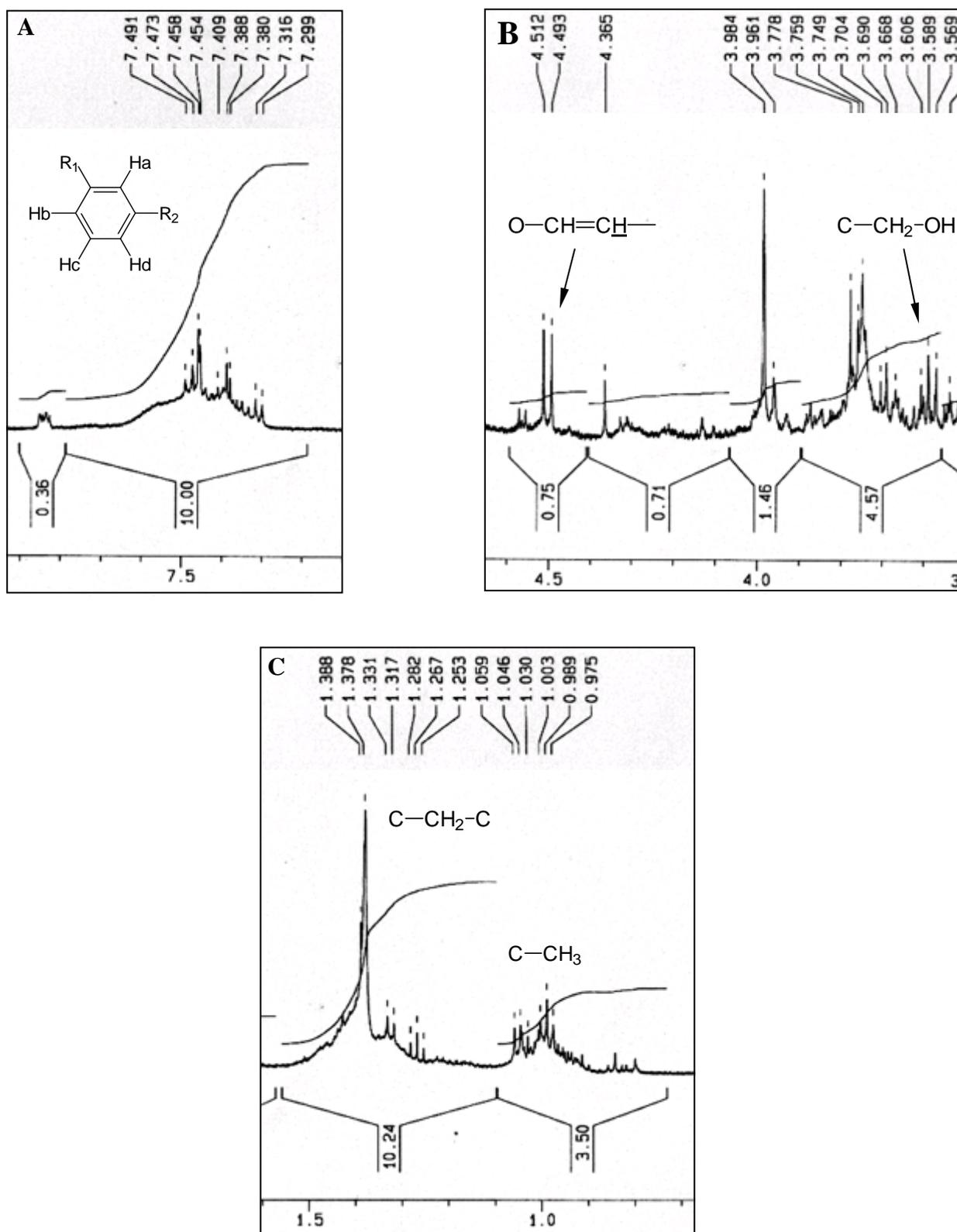
**Figure 45 :** Spectre RMN de la fraction inactivatrice (fraction B) issue de la chromatographie HPLC semi-préparative Si 60.

signaux singulets intenses qui pourraient être dus à la présence de solvants organiques dans l'échantillon. Ainsi, le singulet à 2,029 ppm peut-il être attribué aux protons du groupement méthyle de l'acétate de sodium également détecté en spectrométrie Infra-Rouge. Le singulet à 2,657 ppm provient vraisemblablement des protons du groupement méthyle de l'acétonitrile pouvant subsister dans l'échantillon. Le singulet à 2,247 ppm pourrait être le signal des protons d'un groupement méthyle déblindés par un groupement soufré ( $\text{CH}_3\text{-S-}$ ).

Suit une série de signaux plus faibles mais cependant plus dignes d'intérêt que ceux qui précèdent. Tout d'abord, entre 7,29 et 7,49 ppm se trouve un massif de pics (figure 46A). Il s'agit là de signaux dus à des protons aromatiques. La base très élargie de ce massif indique que les noyaux aromatiques sont présents dans différents composés parmi lesquels peuvent se trouver des formes polymériques. L'absence de couplage entre les signaux indique que les noyaux aromatiques sont disubstitués en *ortho*- ou en *mé*ta-. Pour ce type de substitution, on remarque que chaque proton a un environnement différent, on a donc 4 types différents de protons (a,b,c,d) dans ce noyau. Or, si on considère que l'unité d'intégration est de 0,75, d'après les signaux observés à 4,5 et 4,3 ppm, l'intégration du massif indique que la préparation contient 14 types de protons aromatiques différents. L'échantillon contiendrait donc un mélange de composés aromatiques mono ou disubstitués. Ceci serait en accord avec les structures allyl phényl sulfones proposées suite aux analyses par spectrométrie de masse.

Entre 0,975 et 1,059 ppm on observe deux triplets dus à environ 4 types de protons différents (figure 46C). Le triplet indique que chaque proton possède deux protons voisins de même type. Il s'agit là probablement de protons d'un groupement méthyle à l'extrémité d'une chaîne aliphatique ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$ ). Le triplet situé entre 1,03 et 1,059 ppm est vraisemblablement déblindé par la présence d'une fonction éther ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-}$ ). Le singulet situé à 1,378 ppm correspondrait aux protons méthylènes d'une chaîne aliphatique ( $\text{-C-CH}_2\text{-C-}$ ), et son intégration indique qu'il en existe 14 types différents. Il pourrait s'agir d'une chaîne aliphatique contenant au moins 7 atomes de carbone. Là encore, cette observation est en accord avec le type de structure détecté en spectrométrie de masse. Notons la présence d'un singulet à 1,899 ppm qui pourrait correspondre à des protons d'un groupement acéto ; groupement proposé comme substitution du noyau aromatique en spectrométrie de masse. Cependant, l'intégration de ce signal est inférieure à 1 unité alors qu'elle devrait être en théorie de  $n \times 3$  unités.

Un triplet apparaît à 3,589 ppm, il serait dû aux protons méthylènes d'une fonction alcool ( $\text{-C-CH}_2\text{-OH}$ ). Le triplet indique la présence de deux protons voisins de même type pour chaque proton, cette fonction alcool pourrait donc être à l'extrémité d'une chaîne aliphatique ( $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ ). Ces dernières observations semblent confirmer la présence d'un substituant de type alcanoylé détecté par



**Figure 46 :** Détails du spectre RMN de la fraction inactivatrice (fraction B) issue de la chromatographie HLPC semi-préparative Si 60.

ce composé, elle est du même type que celle déterminée dans nos études de mécanisme (chapitre 2.7.), à savoir :

$$dA/dt = \alpha \cdot [\text{Inactivateur}] \cdot [\text{H}^+] \cdot [\text{PPO}]^{-1}$$

Il est cependant très probable que l'efficacité inactivatrice des allyl phényl sulfonyles augmente avec la longueur et le caractère hydrophobe de la chaîne alliphatique substituée, comme cela est le cas pour les dérivés de résorcinol (MAC EVILY *et al.*, 1991) ou les alcools (VALERO *et al.*, 1990 ; KUBO *et al.*, 2000). Aussi, il est tout à fait probable que le pouvoir inactivateur de composés de type allyl phényl sulfonyl octanol et décanol soit nettement supérieur à celui du méthyl sulfonyl acétophénone. La vérification de ces hypothèses ne pourra se faire qu'après obtention des dérivés considérés (après synthèse chimique). Une fois ces composés disponibles, nos études s'attacheront alors à vérifier la similitude entre notre détermination et les caractéristiques des allyl phényl sulfonyl octanol et décanol, à savoir les spectres de masse, les temps de rétention sur HPLC et les spectres d'absorption.

Dans la littérature, les composés sulfonylés sont cependant cités comme très instables et souvent en équilibre avec les esters d'acide sulfonique (BAUD *et al.*, 1949 ; PIHLAJA *et al.*, 2000). Des modifications de structure de nos agents inactivateurs se produiraient probablement au cours des différentes étapes de purification et analyse. Ces modifications sont certainement à l'origine des difficultés que nous avons rencontré au cours de ce travail d'identification.

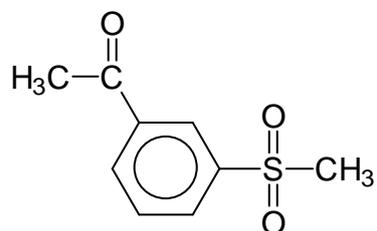
La présence d'allyl phényl sulfonyl alcools dans une préparation de latex de papaye peut paraître surprenante, d'autant plus que la littérature ne fait pas mention à notre connaissance de la présence de tels composés dans la papaye ou le latex. Selon BAUD *et al.* (1949), ce type de composé serait issu de l'addition d'un composé volatil sur un acide sulfonique lorsque l'on applique une température de 150°C durant plusieurs heures. Il est probable que certains composés aromatiques naturellement présents dans le latex soient ainsi modifiés au cours des procédés de préparation de la poudre commerciale. Rappelons que ces procédés consistent généralement en l'addition de sulfites dans le latex, suivi d'un séchage (REED et UNDERKOFER, 1966), mais le procédé de fabrication exact de la préparation de papaine employée dans ce travail ne nous a pas été communiqué. Il reste cependant à vérifier si le latex et le jus de papaye non traités présentent ou non un pouvoir inactivateur sur la PPO.

spectrométrie de masse. Enfin, parmi les signaux interprétables, se trouve le doublet à 4,5 ppm qui indique la présence de protons portés par un carbone sp<sup>2</sup> (insaturé) en position β d'un groupement énonol ou d'un éther (O-C<sub>α</sub>H=C<sub>β</sub>H-). Cependant, on ne retrouve pas le signal du proton porté par le carbone α, et qui devrait donner un doublet vers 6,5 ppm.

En conclusion, l'analyse par résonance magnétique nucléaire est rendue complexe par le fait que l'échantillon contient un mélange de composés et de traces d'eau et de solvants organiques. Il est donc difficile de préciser par ces derniers résultats ceux obtenus par spectrométrie Infra-rouge et de masse. Toutefois, nous confirmons la présence de composés aromatiques di-substitués (parmi lesquels peuvent se trouver les allyl phényl sulfones) et de chaînes aliphatiques portant une fonction alcool primaire. De plus, rien ne contredit la présence dans l'échantillon de composés de type allyl phényl sulfonyl octanol proposés à partir des résultats de spectrométrie de masse. A ce stade, nous ne pouvons pas non plus préciser la structure de la substitution sur le noyau aromatique située en position *mé*ta- par rapport à la substitution sulfonyle.

### 2.8.6. Discussion.

A l'issue de ce paragraphe, les résultats obtenus nous conduisent à associer le pouvoir inactivateur de la préparation de papaine à la présence de dérivés de type allyl phényl sulfones estérifiées par des chaînes aliphatiques plus ou moins longues (jusqu'à 10 atomes de carbone). La structure de ces composés, présentant de nombreuses similitudes avec celle des dérivés substitués des résorcinols (MAC EVILY *et al.*, 1991 ; FAYAD-EL DAHOUK, 1998) ou de l'acide fusarique (FUCH et SPITELLER, 1997) s'accorde tout à fait avec un fort pouvoir inactivateur vis-à-vis de la PPO. Pour le vérifier, nous avons cherché si des composés similaires étaient disponibles dans le commerce. Le composé commercial dont la structure est la plus proche est le méthyl sulfonyl acétophénone :



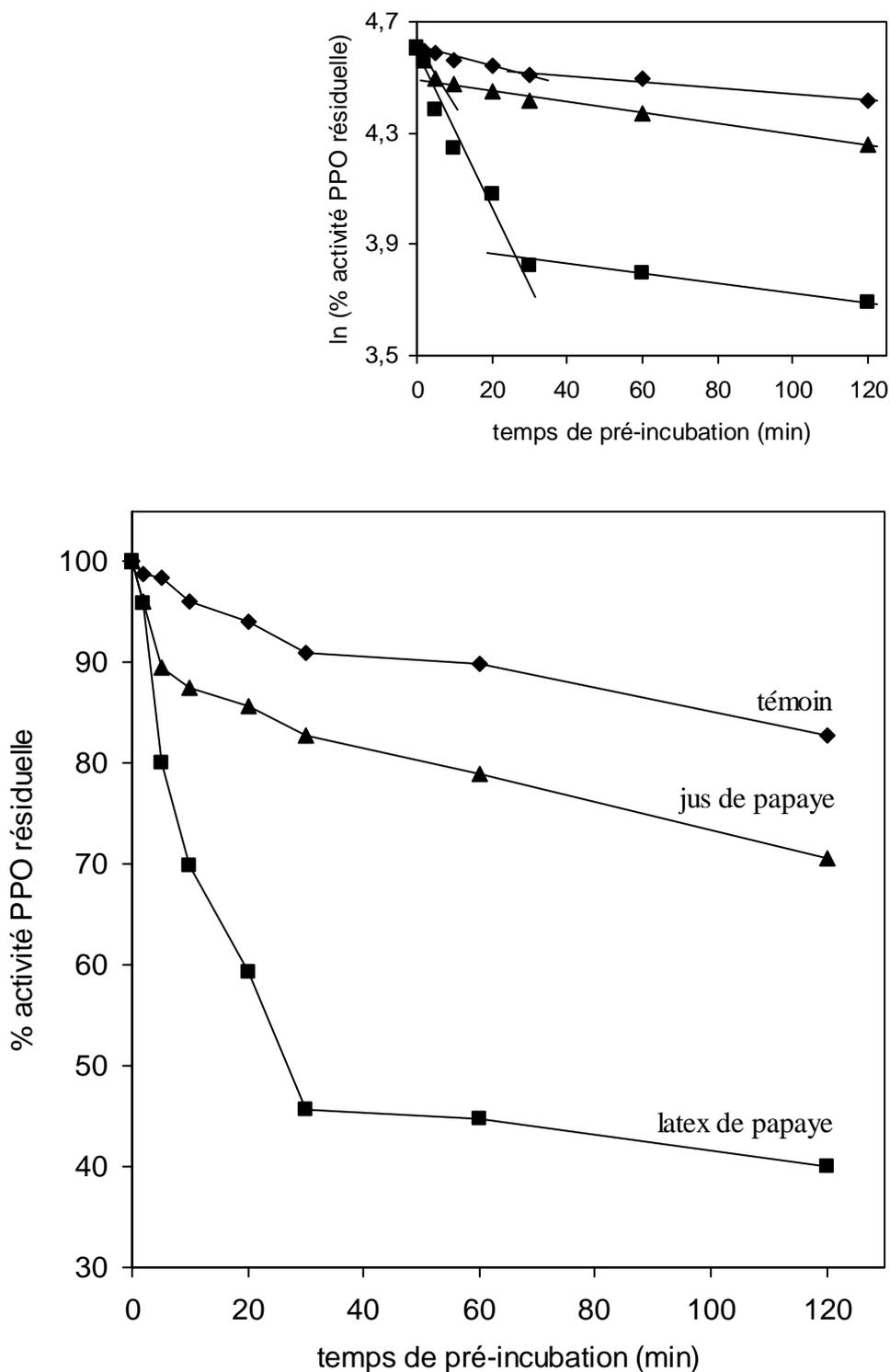
Ce composé est effectivement capable d'inactiver la PPO de scarole, mais apparaît cependant comme peu efficace. Pour une concentration de 50 mM, à pH 4 et 20 °C, seuls 20 % de l'activité PPO initiale (145 nkat.mL<sup>-1</sup>) sont inactivés. Nous avons vérifié la loi d'inactivation caractéristique de

## 2.9. LA PAPAYE CONTIENT-ELLE DES SUBSTANCES INACTIVATRICES ?

### 2.9.1. Détermination du pouvoir inactivateur du jus et du latex de papaye.

Un extrait polyphénoloxydasique de scarole PPOS est incubé à pH 4 et à 20 °C avec un jus de papaye verte mature filtré sur étamine ou une solution de latex de papaye verte immature (1 g.mL<sup>-1</sup>). L'évolution de l'activité PPO est comparée à celle d'incubats témoin dans lesquels l'extrait polyphénoloxydasique est mis en présence d'eau Milli Q. Les résultats sont reportés dans la figure 47. La courbe témoin révèle une légère perte d'activité qui atteint près de 17 % de l'activité initiale après 2 h de pré-incubation, avec une vitesse initiale d'inactivation  $k$  proche de 0,003 minutes<sup>-1</sup>. La présence de jus de papaye entraîne une inactivation lente de la PPO, dont la perte d'activité atteint 30 % de l'activité initiale en fin d'expérience. La solution contenant le latex de papaye inactive efficacement l'extrait polyphénoloxydasique puisqu'au bout de 30 minutes de pré-incubation, 55 % de l'activité initiale est perdue, avec une vitesse initiale d'inactivation de 0,025 minutes<sup>-1</sup> soit 1,2 fois plus importante que celle obtenue avec le jus. Les courbes représentées en insert montrent que l'inactivation se fait selon un processus biphasique, de la même manière que pour l'extrait brut de papaine. Les inactivations observées restent cependant plus faibles que celles observées lorsque l'extrait polyphénoloxydasique était pré-incubé avec une solution d'extrait brut de papaine à 0,25 g.mL<sup>-1</sup> puisque la vitesse initiale d'inactivation était 20 fois plus élevée que celle obtenue avec le latex et que l'inactivation atteignait près de 90 % après 20 minutes de pré-incubation. La lyophilisation du latex entraînant la concentration des agents inactivateurs est certainement à l'origine de cette différence.

Notons que la composition du latex et du jus de papaye diffèrent selon la variété et le stade de maturité du fruit (TANG, 1974 ; BROCKLEHURST *et al.*, 1981). Parmi les composés répertoriés dans le jus ou le latex de papaye, certains sont des inhibiteurs du brunissement enzymatique. Le latex est en effet riche en isothiocyanate de benzyle, un composé volatil, capable de réagir avec les groupements sulfhydryls des protéines (TANG, 1973 et 1974 ; FLATH et FORREY, 1977). Ainsi ce composé est-il susceptible de dénaturer les PPO.



**Figure 47 :** Effet du jus et du latex de papaye sur le système polyphénoloxydasique de scarole partiellement purifié.

Conditions : 3  $\mu$ katal de PPO de scarole (PPOS) sont pré-incubés avec 50  $\mu$ L d'eau Milli Q ou de jus de papaye ou d'une solution de latex dans l'eau Milli Q (1  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) à pH 4 et 20°C. L'activité PPO résiduelle est dosée polarographiquement en prélevant au cours du temps des aliquotes de 50 $\mu$ L.

**Insert :** ln (activité PPO résiduelle en pourcent de l'activité initiale) en fonction du temps de pré-incubation.

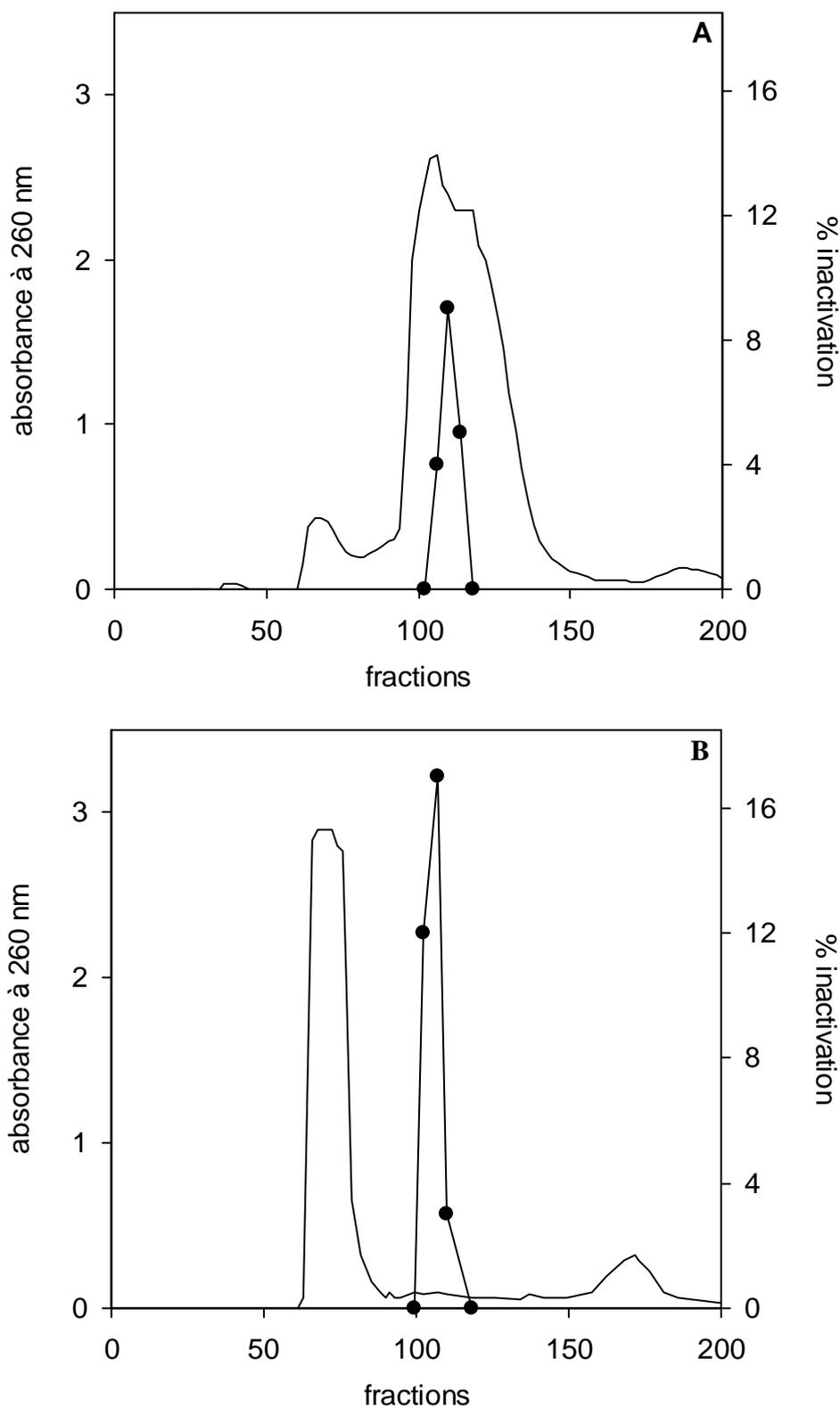
### **2.9.2. Détermination de la masse moléculaire apparente des agents inactivateurs présents dans le jus et le latex de papaye.**

Le poids moléculaire apparent des agents inactivateurs présents dans le jus et le latex de papaye est déterminé à l'aide d'une chromatographie d'exclusion. Six mL d'échantillon sont filtrés sur une matrice de Biogel P2, dans les conditions identiques à celles employées pour l'extrait brut de papaine. Rappelons que la matrice est caractérisée par une zone d'exclusion située entre 100 et 1800 g.mole<sup>-1</sup>. Le latex a été dilué dans de l'eau Milli Q à raison de 0,3 g.mL<sup>-1</sup> afin de pallier les problèmes de colmatage de la colonne. Les chromatogrammes obtenus sont représentés sur la figure 48. Dans les deux cas, on remarque la présence d'un pic unique et peu intense correspondant à l'inactivation de la PPO après 1 h de pré-incubation. Les sommets de chacun de ces deux pics correspondent à des poids moléculaires de 520 g.mole<sup>-1</sup> pour le jus de papaye et de 610 g.mole<sup>-1</sup> pour le latex. Des poids moléculaires de même ordre ont été observés pour les agents inactivateurs présents dans l'extrait brut de papaine commerciale, que ce soit à l'aide de la chromatographie d'exclusion ou de la spectrométrie de masse. Rappelons qu'OSZMIANSKI et LEE (1990) estimait le poids moléculaire des inhibiteurs du brunissement présents dans le miel à 600 g.mole<sup>-1</sup>.

Les résultats obtenus pour le latex et le jus de papaye indiquent que ceux-ci contiennent, à l'instar de la préparation commerciale de papaine, des substances inactivant la PPO. A l'issue de notre travail, nous ne pouvons affirmer s'il s'agit des dérivés déterminés précédemment, ces dérivés étant, selon nous, plus probablement générés au cours du processus de fabrication de l'extrait de papaine.

## **3. INHIBITION DU BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE PAR UN EXTRAIT D'HCQE.**

L'HCQE catalyse l'hydrolyse de l'acide chlorogénique conduisant à la production d'acide caféique. Ce dernier serait un « inhibiteur compétitif » de la PPO ou plutôt un substrat présentant un très faible caractère oxydable (JANOVITZ-KLAPP, 1989). Nous proposons donc d'étudier l'influence de l'activité HCQE sur la réaction catalysée par la PPO.



**Figure 48 :** Chromatographies d'exclusion de jus de papaye (A) et d'une solution de latex de papaye (B).

Conditions : les chromatographies sont réalisées dans des conditions identiques à celles décrites pour l'extrait brut de papaine. Six mL de chaque échantillon sont déposés (le latex est préalablement dilué dans l'eau Milli Q à raison de  $0,3 \text{ g.mL}^{-1}$ ). Une détection du pouvoir inactivateur vis-à-vis de la PPO de scarole (1 h de pré-incubation) est réalisée sur chaque fraction.

### 3.1. INHIBITION DE L'ACTIVITE PPO PAR ADDITION D'HCQE DANS LE MILIEU REACTIONNEL.

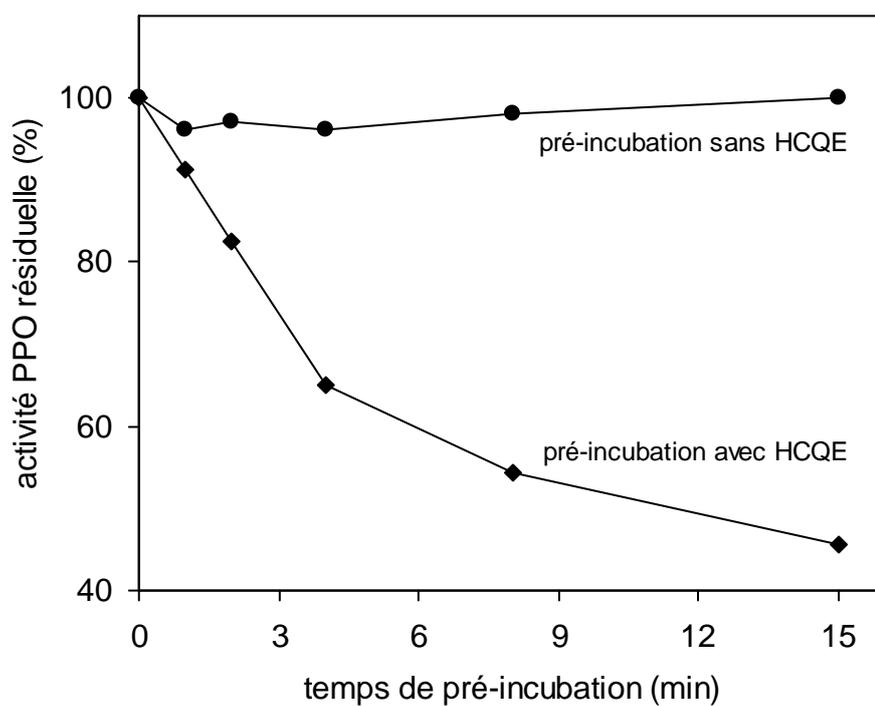
MADANI *et al.* (1997 et 1999a) ont observé que l'ajout d'HCQE dans un milieu réactionnel contenant un composé phénolique et la tyrosinase influençait l'évolution de la composition phénolique du milieu, ce qui conduisait à une inhibition de l'activité tyrosinase. Une première expérience consiste donc à vérifier quelle est l'influence de la pré-incubation d'un extrait d'HCQE avec de l'acide chlorogénique sur l'activité de la PPO d'abricot. L'évolution de l'activité PPO mesurée par polarographie est reportée dans la figure 49. L'activité PPO initiale est d'autant plus faible que le temps de pré-incubation de l'acide chlorogénique avec l'HCQE est plus long, alors que l'activité PPO des témoins est stable au cours de l'expérience. La vitesse initiale de la chute d'activité PPO est proche de  $0,05 \text{ minutes}^{-1}$  et conduit à une perte totale de 55 % lorsque la PPO est ajoutée 15 minutes après l'HCQE dans le milieu réactionnel. L'oxydation de l'acide chlorogénique par la PPO dépend donc fortement de la composition phénolique du milieu réactionnel, laquelle est modifiée par l'HCQE. L'activité PPO est d'autant plus inhibée que la quantité d'acide caféique (produit de l'hydrolyse de l'acide chlorogénique) est importante au moment de l'ajout de la PPO, en accord avec les résultats de JANOVITZ-KLAPP (1989). Des résultats similaires sont obtenus par spectrophotométrie (résultats non figurés), ce qui indique que les réactions secondaires et notamment les réactions d'oxydation couplée ne semblent pas avoir d'influence significative dans nos conditions expérimentales.

Il reste donc à déterminer les conditions nécessaires pour une inhibition optimale par l'HCQE.

### 3.2. PURIFICATION DE L'ACTIVITE HCQE.

#### 3.2.1. Choix de la source d'HCQE.

D'une manière générale, l'HCQE est synthétisée par des souches d'*Aspergillus niger* sélectionnées pour la production d'enzymes pectinolytiques à usage oenologique. Aussi nous choisissons, dans les gammes de préparations commerciales d'enzymes pectinolytiques, 6 extraits pour lesquels les fabricants signalent la présence d'activité HCQE. La méthode de dosage employée



**Figure 49 :** Influence de l'HCQE sur l'activité PPO.

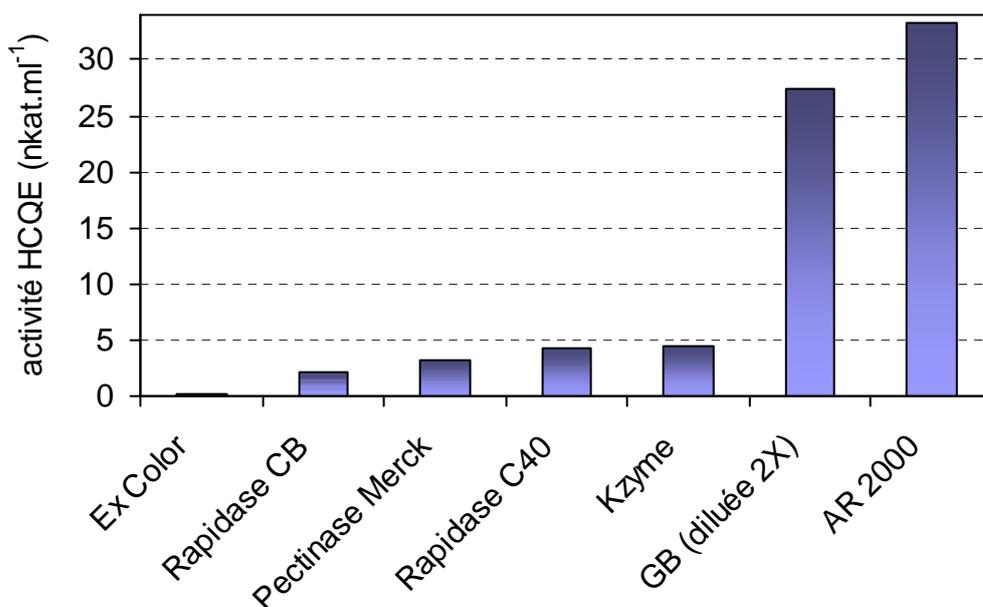
Conditions : 2500  $\mu$ L d'une solution d'acide chlorogénique (1 mM) tamponnée à pH 4 sont pré-incubés avec 1,5 nkat d'HCQE (◆) ou d'eau Milli Q (●) de 1 à 15 min dans la cuve du polarographe maintenue à 30°C. L'enregistrement polarographique débute dès l'ajout de 5 nkat de PPOA dans l'incubat.

est adaptée à partir de celle mise au point par VAROQUAUX *et al.* (1982). La première préparation testée, Pectinase MERCK (EC 3.2.1.15) est une préparation d' $\alpha$ -amylase purifiée puis séchée à usage biochimique. Cinq préparations destinées à un usage œnologique et nommées rapidases C40, AR 2000, CB, Ex Color et Kzyme sont également testées. Enfin, une préparation expérimentale GB nous a été proposée par les laboratoires Gist-Brocadès. Il s'agit là d'un extrait de pectinase sous forme d'une solution à pH 4,5 contenant 30 à 40 % de glycérol.

Les préparations sous forme de poudre sont solubilisées dans une solution de tampon phosphate-citrate à pH 6 à raison de  $0,5 \text{ g.mL}^{-1}$  et la préparation GB, très visqueuse, est diluée 2 fois dans la solution de tampon phosphate-citrate à pH 6, avant les dosages. Les résultats des dosages d'activité HCQE sont représentés dans la figure 50. Seules la Rapidase AR 2000 ( $33 \text{ nkat.mL}^{-1}$ ) et la préparation GB diluée ( $27 \text{ nkat.mL}^{-1}$ ) présentent une activité supérieure à  $5 \text{ nkat.mL}^{-1}$ . Dans des conditions similaires de dosage, VAROQUAUX *et al.* (1982) obtenaient une activité de  $1 \text{ nkat.mL}^{-1}$  pour une solution de pectinase commerciale à  $0,5 \text{ g.mL}^{-1}$ , alors que MADANI *et al.* (1997) disposaient d'un extrait expérimental d'*Aspergillus niger* présentant une activité HCQE estimée à  $0,055 \text{ nkat.mL}^{-1}$ . Nous choisissons donc la préparation expérimentale GB comme source d'HCQE, d'autant plus que son activité s'est révélée stable sur plus de 6 mois lorsque la préparation est stockée à  $4^{\circ}\text{C}$ .

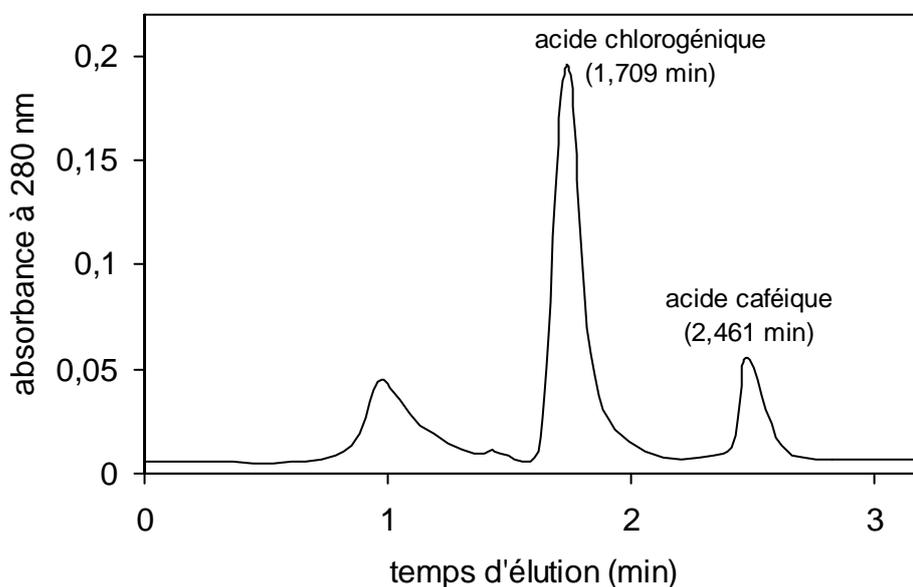
### **3.2.2. Optimisation des conditions de dosage de l'activité HCQE.**

L'hydroxycinnamoyl quinate estérase (HCQE) catalyse l'hydrolyse de l'acide chlorogénique en acide caféique et acide quinique. L'activité HCQE est alors classiquement mesurée en dosant la quantité résiduelle d'acide chlorogénique ou la quantité d'acide caféique formée au cours de la catalyse (LEWIS et THOMPSON, 1961 ; MADANI *et al.*, 1997). SCHÖBEL et POLLMANN (1980) et VAROQUAUX *et al.* (1982) furent les premiers à employer une séparation HPLC en phase inverse dans le dosage de la quantité d'acide caféique libérée. Notre méthode de dosage s'inspire donc largement de celle mise au point par cette dernière équipe. Un exemple de chromatogramme HPLC obtenu est présenté dans la figure 51. Les conditions d'élution permettent une séparation convenable de l'acide chlorogénique et de l'acide caféique puisque les sommets des deux pics (identifiés par l'injection de solutions étalon) sont séparés de près de 45 secondes et ces mêmes pics ne se chevauchent pas. Des systèmes d'élution similaires sont classiquement employés pour la séparation de composés phénoliques (RICHARD *et al.*, 1991 ; AMIOT *et al.*, 1992 ; de RIGAL *et al.*, 2000). Notons que VAROQUAUX *et al.* (1982) employaient une solution d'acide acétique comme



**Figure 50 :** Activités HCQE de différentes préparations commerciales d'enzymes pectinolytiques.

La Rapidase C40, le Kzyme, la Pectinase MERCK, l'AR 2000, la Rapidase CB et la Rapidase Ex Color sont solubilisées dans une solution de tampon phosphate-citrate à pH 6 à raison de 0,5 g.mL<sup>-1</sup>.



**Figure 51 :** Exemple de chromatogramme HPLC obtenu lors des dosages d'activité HCQE.

Conditions : 10  $\mu$ L de milieu d'incubation arrêté par l'ajout de 100  $\mu$ L d'acide chlorhydrique et additionné d'une goutte d'acide *o*-phosphorique sont injectés sur le système HPLC analytique en phase inverse décrit au paragraphe 3.1.1.2.

éluant alors que MADANI *et al.* (1997) optaient pour une solution de tampon phosphate-citrate progressivement enrichie en méthanol.

### **3.2.2.1. Reproductibilité de la méthode HPLC.**

Une étude de la reproductibilité du dosage d'acide caféique et chlorogénique par HPLC a été réalisée à partir de 10 injections successives. Les valeurs des coefficients de variation des surfaces des pics d'acides chlorogénique et caféique inférieures à 5 % témoignent de la reproductibilité satisfaisante de notre protocole de dosage de l'activité HCQE. Notre calcul d'activité se basera donc sur la surface du pic d'acide caféique formé au cours de l'incubation, surface pour laquelle le coefficient de variation est légèrement inférieur à celui des surfaces de pic d'acide chlorogénique. SCHÖBEL et POLLMANN (1980), VAROQUAUX *et al.* (1982) et MADANI *et al.* (1997) avaient également choisi de déterminer l'activité HCQE à l'aide du dosage de la quantité d'acide caféique formé au cours de l'hydrolyse.

Un étalonnage préalable de la colonne a été réalisé à l'aide de 5 solutions d'acide caféique (de 0,1 à 1 mM) préparées dans une solution de tampon phosphate-citrate à pH 6 et chacune injectée 3 fois. Dans nos conditions opératoires, la surface de pic est proportionnelle à la concentration d'acide caféique (résultats non figurés). La droite de régression a pour équation :

$$S = 1520000 \times [CF] + 634 \text{ avec un coefficient de régression de } 0,9998.$$

La concentration en acide caféique en mM dans les milieux d'incubation peut donc se calculer de la manière suivante :

$$[CF] = 6,54.10^{-7} \times \text{surface de pic (uDO.minute)}$$

L'activité HCQE est ensuite exprimée en katals soit en moles d'acide caféique formées par seconde dans le milieu d'incubation.

### **3.2.2.2. Concentration en acide chlorogénique.**

La concentration en acide chlorogénique est fixée à 1 mM. Nous nous situons dans des conditions proches de la saturation de l'enzyme puisque cette valeur est 6 fois supérieure à la valeur de  $K_m$  (voir chapitre 3.3.1.1. des résultats).

### **3.2.2.3. Température du milieu réactionnel.**

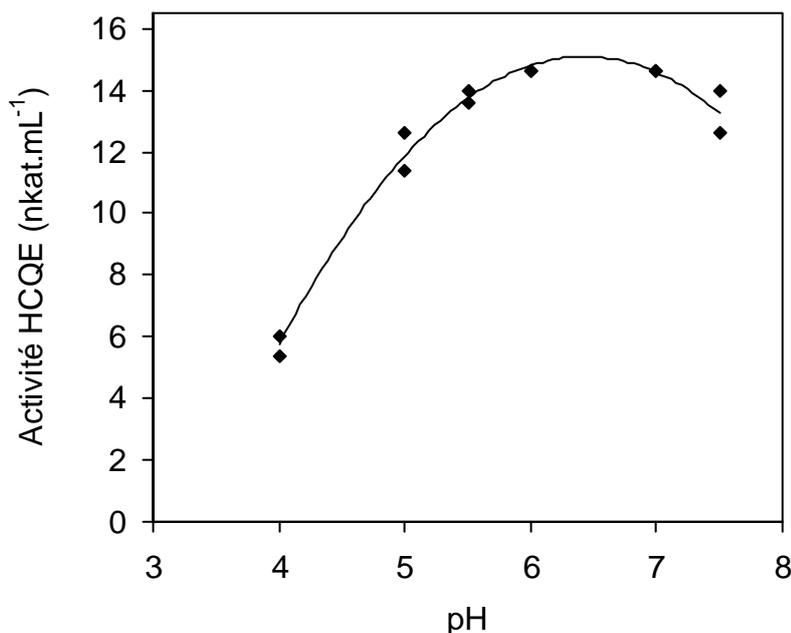
La température d'incubation des extraits enzymatiques avec la solution d'acide chlorogénique est fixée à 37°C, en accord avec les conditions déterminées par OKAMURA et WATANABE (1981), VAROQUAUX *et al.* (1982) et MADANI *et al.* (1997). Notons toutefois que SCHÖBEL et POLLMANN (1980) observaient une température optimale de 45°C.

### **3.2.2.4. pH du milieu réactionnel.**

Des dosages d'activité HCQE de la préparation GB diluée 4 fois dans l'eau sont réalisés en employant des solutions d'acide chlorogénique dont les pH sont compris entre 4 et 7,5. Les résultats sont reportés sur la figure 52. La courbe obtenue révèle une activité maximale pour une zone de pH allant de 6 à 7, puis l'activité chute rapidement lorsqu'on se déplace vers les pH acides. Nous choisissons donc de réaliser nos dosages à pH 6. Une gamme de pH optimaux similaires avait été observée pour des HCQE provenant d'*Aspergillus niger* (SCHÖBEL et POLLMANN, 1980 ; VAROQUAUX *et al.*, 1982), d'*Aspergillus oryzae* (LEWIS et THOMPSON, 1961) et d'*Aspergillus japonicus* (OKAMURA et WATANABE, 1981). Cependant, VAROQUAUX *et al.* (1982) puis MADANI *et al.* (1997) optèrent pour un dosage à pH 5. Rappelons que l'hydrolyse enzymatique est arrêtée par l'ajout d'acide chlorhydrique dans le milieu réactionnel. Le pH est ainsi abaissé à 1,7, valeur à laquelle l'HCQE est totalement inactive et nous avons vérifié qu'après arrêt de la réaction le milieu réactionnel n'évoluait plus (résultats non figurés).

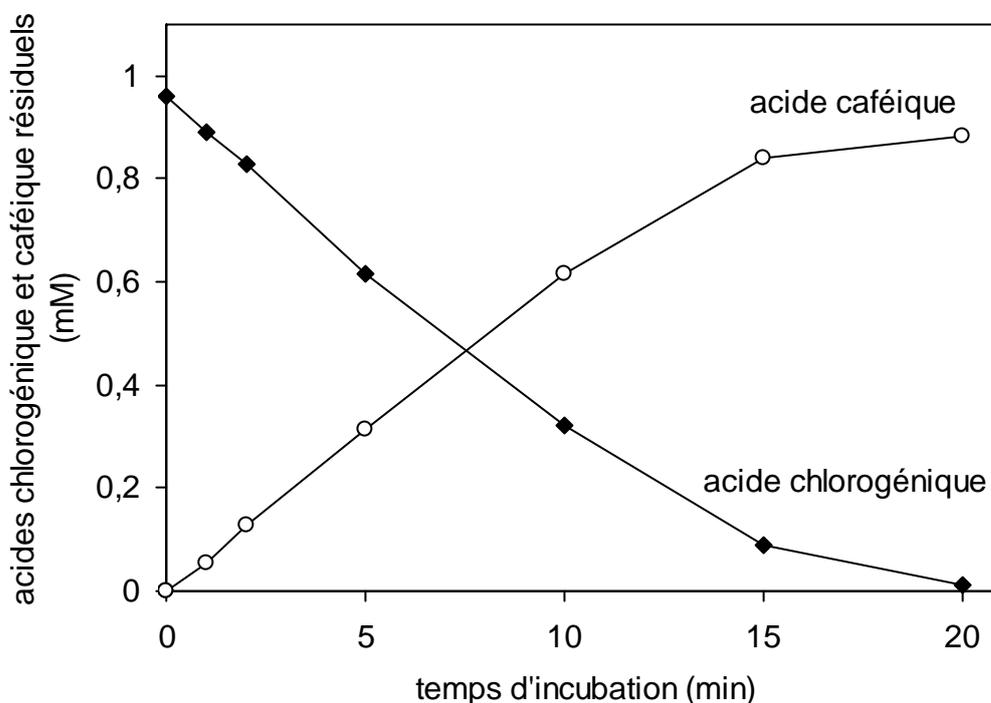
### **3.2.2.5. Durée de l'incubation.**

Une solution d'acide chlorogénique tamponnée à pH 6 a été incubée à 37°C avec la préparation GB diluée 2 fois. L'évolution des concentrations d'acide chlorogénique et caféique dans le milieu réactionnel a été suivie. Les courbes obtenues sont représentées sur la figure 53. On observe une consommation de d'acide chlorogénique corrélée à une apparition d'acide caféique dans le milieu réactionnel, ce qui est en accord avec le rapport stœchiométrique de la réaction qui est de 1 pour 1. Durant les 10 premières minutes d'incubation, les vitesses de consommation de CG et d'apparition de CF sont constantes. Au delà de 10 minutes, les vitesses varient du fait de l'épuisement du substrat. OKAMURA et WATANABE (1981) avaient observé dans des conditions expérimentales similaires un état quasi-stationnaire de 40 minutes du fait d'un extrait enzymatique



**Figure 52 :** Optimisation du pH du milieu d'incubation employé pour le dosage de l'activité HCQE.

Conditions : les dosages d'activité HCQE d'une préparation de GB diluée 4 fois dans l'eau sont réalisés en employant des solutions d'acide chlorogénique tamponnées à pH 4 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 7 et 7,5 à l'aide de solutions de tampon phosphate-citrate.



**Figure 53 :** Cinétique d'incubation d'une solution d'acide chlorogénique avec l'HCQE.

Conditions : 1,35 nkat d'HCQE sont incubés à 37°C avec 1 mL d'une solution d'acide chlorogénique (1 mM) tamponnée à pH 6 (solution de Tampon phosphate-citrate). La réaction est arrêtée par ajout de 100  $\mu$ L d'HCl puis l'acide chlorogénique résiduel (◆) et l'acide caféique (○) sont dosés par la méthode HPLC précédemment décrite.

moins actif que notre préparation GB. En outre, la durée de l'état quasi-stationnaire passait de 40 à 80 minutes lorsque l'extrait enzymatique était dilué 2 fois. Nous fixons donc le temps d'incubation à 5 minutes pour le dosage de l'activité HCQE, temps pour lequel l'activité est proportionnelle à la quantité d'acide caféique dosée.

### **3.2.2.6. Limite de proportionnalité de la méthode de dosage.**

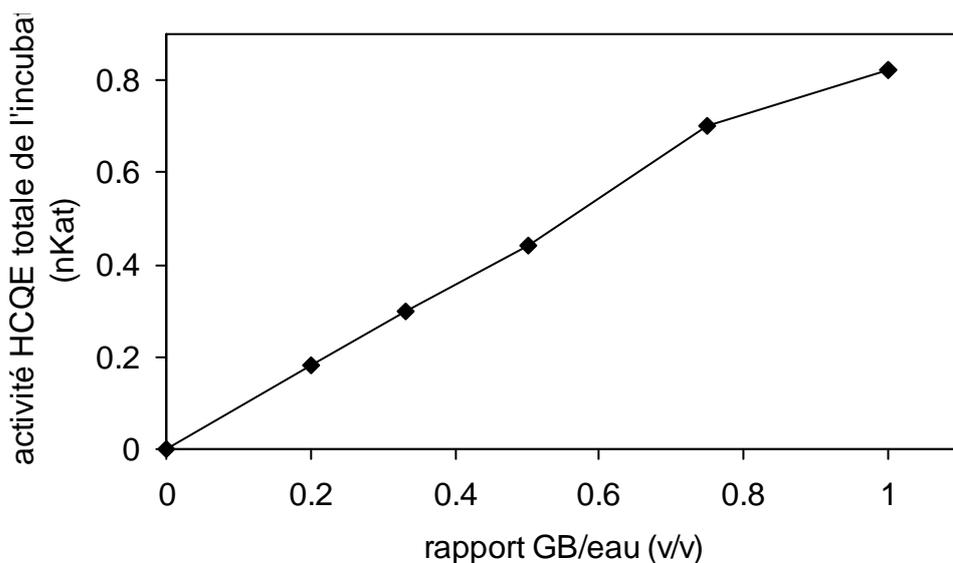
Différentes dilutions de la préparation GB ont fait l'objet d'un dosage d'activité HCQE. Les résultats obtenus sont reportés dans la figure 54. L'activité HCQE totale est proportionnelle à la quantité d'HCQE pour des valeurs inférieures à 0,75 nkat. Lors de nos prochains dosages, l'activité HCQE totale de l'incubation ne devra donc pas dépasser cette valeur afin de rester dans les conditions de proportionnalité.

Nous avons donc optimisé les conditions de dosage de l'activité HCQE, ce qui nous sera utile lors de la purification de l'enzyme et de nos études en milieu modèle. Ainsi, le pH du milieu d'incubation de l'acide chlorogénique avec l'extrait enzymatique est fixé à 6, la température à 37°C et le temps d'incubation à 5 minutes. L'activité ne doit pas dépasser 0,75 nkat dans le milieu réactionnel.

### **3.2.3. Chromatographie d'exclusion.**

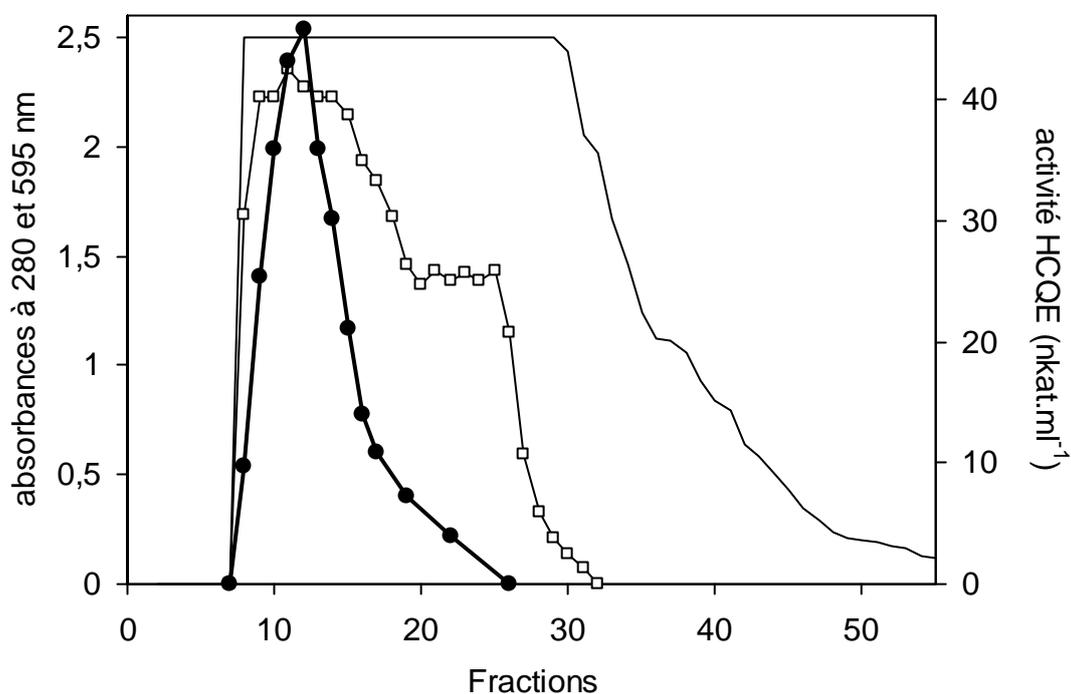
Afin d'éliminer le glycérol et les composés phénoliques présents dans l'extrait GB, nous avons réalisé une chromatographie d'exclusion sur un gel Sephadex G25 Fine dont le seuil d'exclusion est de 5 kDa. Le chromatogramme obtenu après avoir déposé 9 mL de préparation GB sur la colonne est présenté dans la figure 55. Le profil de l'absorbance à 280 nm indique que la quasi-totalité du matériel déposé est élué après 2 h 45 minutes de chromatographie. Le profil révélé par le dosage qualitatif de BRADFORD (1976) montre que les protéines sont totalement éluées après 1 h 30 minutes. Au pic de protéines coïncide un pic unique d'activité HCQE élué dans le volume exclu entre 21 et 75 minutes après le dépôt, avec une activité maximale proche de 46 nkat.mL<sup>-1</sup>. Ceci est en accord avec les résultats de SCHÖBEL et POLLMANN (1980) qui avaient estimé le poids moléculaire apparent de l'HCQE à 240 kDa. Cette étape nous permet également d'amener l'échantillon dans des conditions proches des conditions d'équilibrage de la chromatographie d'interactions hydrophobes.

Les fractions actives éluées entre 24 et 42 minutes sont assemblées puis nommées GF.



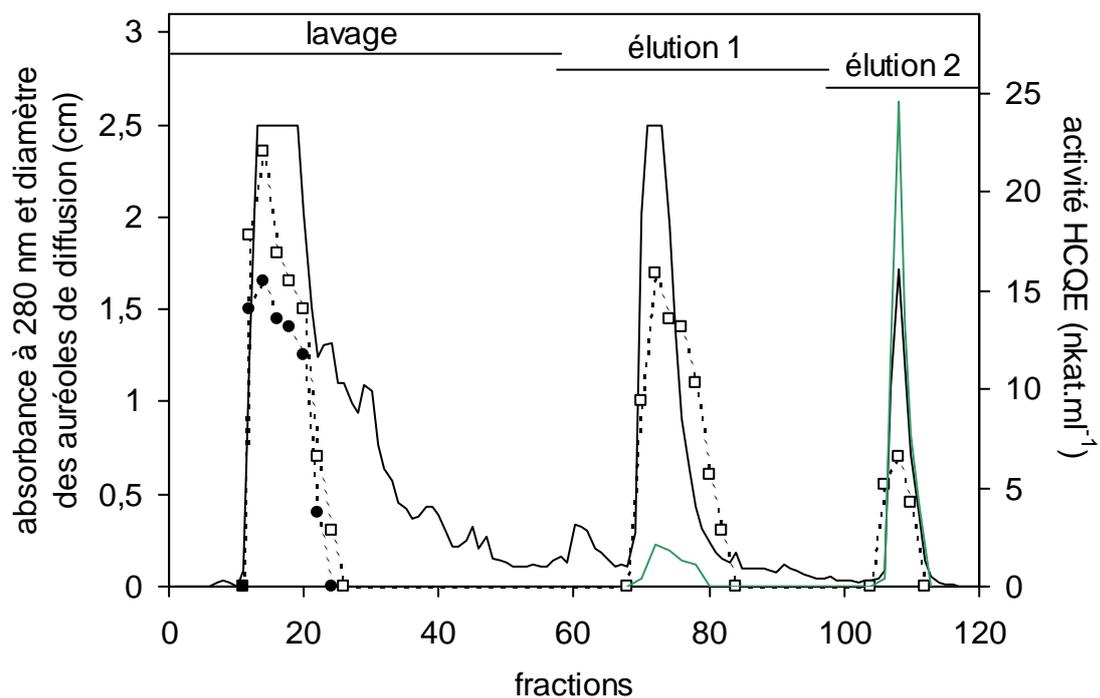
**Figure 54 :** Limite de proportionnalité de la méthode de dosage d'activité HCQE.

Conditions : cent  $\mu\text{L}$  de préparation GB diluée (1,4, 2, 3 ou 5 fois) ou non dans l'eau MilliQ sont incubés pendant 5 min à  $37^\circ\text{C}$  avec 1 mL d'une solution d'acide chlorogénique (1 mM) tamponnée à pH 6 (solution de Tampon phosphate-citrate). La réaction est arrêtée par ajout de 100  $\mu\text{L}$  d'HCl puis l'activité HCQE déterminée par la méthode HPLC décrite au chapitre 3.1.1.2 des matériels et méthode.



**Figure 55 :** Chromatographie d'exclusion d'une préparation GB d'HCQE sur Séphadex G25 Fine.

Une détection UV à 280 nm (-), des protéines (□) et de l'activité HCQE (●) a été réalisée sur chaque fraction.



**Figure 56 :** Chromatographie d'interactions hydrophobes de la fraction GF sur Phényl-Sépharose CL-4B.

Une détection UV à 280 nm (-) et de l'activité HCQE (-), pectine méthyl estérase (●) et polygalacturonase (□) a été réalisée sur chaque fraction.

### 3.2.4. Chromatographie d'interactions hydrophobes.

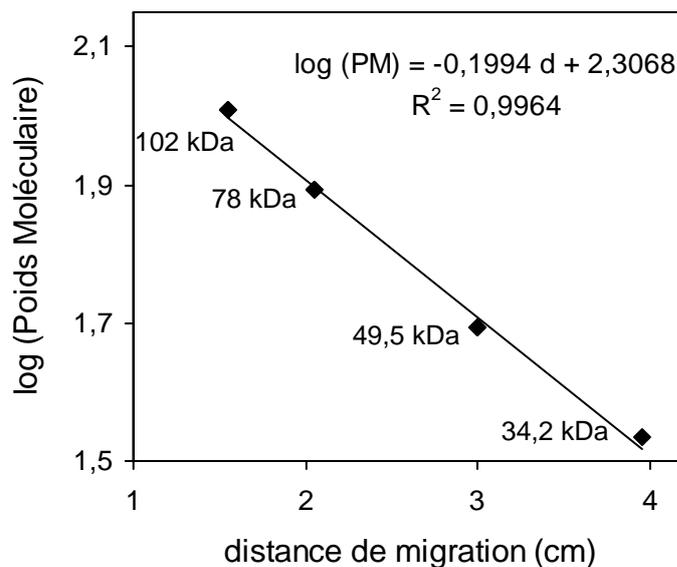
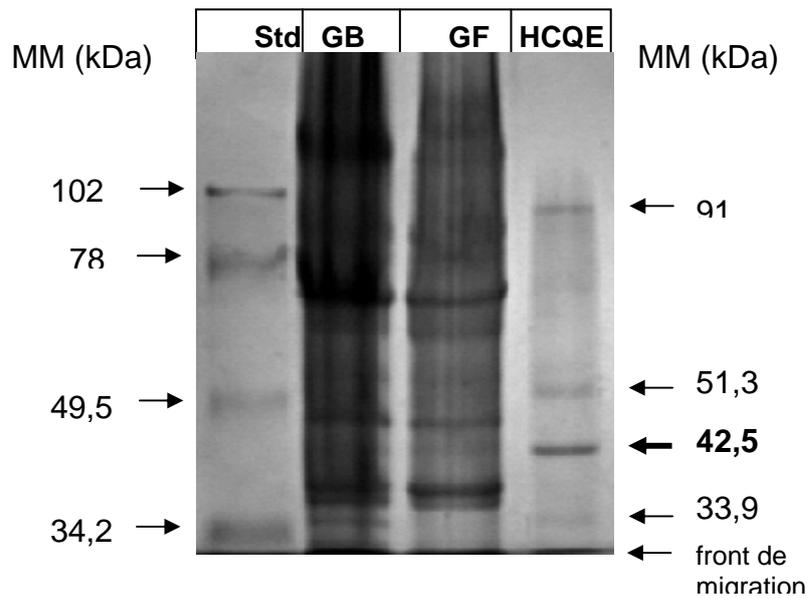
Le chromatogramme obtenu en déposant 14 mL de fraction GF sur la colonne est représenté figure 56. On remarque tout d'abord que l'activité HCQE est retenue par le gel dans les conditions d'équilibrage et qu'une faible partie de l'activité (10 % de l'activité totale déposée) est éluée par la solution contenant 0,1 M de chlorure d'ammonium et de sulfate d'ammonium (élution 1). Un lavage par l'eau (élution 2) permet d'éluier 68 % de l'activité HCQE déposée. Ce pic d'activité coïncide avec un pic d'absorbance à 280 nm. D'autre part, les activités pectine méthyl estérase et polygalacturonase de chaque fraction ont été estimées. La technique de diffusion sur gélose optimisée par REID (1950), DINGLE *et al.* (1953) puis par NGUYEN-THE (1985), est employée. Les activités enzymatiques sont alors estimées par le diamètre des auréoles de diffusion observées sur la gélose. Des essais préliminaires ont montré que cette technique permettait de détecter la présence de chacune de ces deux enzymes dans un échantillon purifié contenant au moins 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> de protéines. Cette technique paraît donc peu sensible, elle suffit cependant à estimer les activités pectinolytiques de nos fractions. Notons que VAROQUAUX *et al.* (1982) et MADANI *et al.* (1997) réalisaient un dosage de sucres réducteurs pour estimer l'activité polygalacturonasique et des mesures de l'évolution du pH pour les pectine méthyl estérasas.

La totalité de l'activité pectine méthyl estérasique présente dans la fraction GF est éliminée dès le lavage de la colonne. Seule une partie de l'activité polygalacturonasique est éliminée au cours du lavage. Malgré l'emploi de deux plateaux d'élution de polarité différente, une faible partie de l'activité polygalacturonasique encore associée à la matrice est co-éluée avec l'activité HCQE. Les fractions contenant l'activité HCQE éluée par l'eau sont rassemblées et nommées HCQE.

### 3.2.5. Bilan de purification.

Les résultats de la purification sont donnés dans le tableau 10. Notons tout d'abord que notre extrait brut GB possède une activité spécifique 900 fois plus importante que celle de la préparation commerciale de pectinase d'*Aspergillus niger* employée par MADANI *et al.* (1997).

Les deux étapes successives de chromatographie permettent d'obtenir un taux de purification de l'ordre de 8 avec un rendement global de 50 %. Ce rendement paraît satisfaisant au regard des résultats obtenus par MADANI *et al.* (1997) qui avaient réalisé une précipitation par le sulfate



**Figure 57 :** Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (8 %) dénaturant des fractions obtenues au cours de la purification de l'HCQE.

Conditions : 10  $\mu$ L de chaque échantillon (GB, GF et HCQE) et de solution de protéines standards (Std) sont additionnés de SDS, de glycérol et de  $\beta$ -mercapto éthanol puis dénaturés à 95°C pendant 4 min puis déposés sur le gel de concentration (stacking) à 5 % d'acrylamide et 0,1 % de SDS. Le gel de stabilisation contient 8 % d'acrylamide et 0,1 % de SDS. La migration est réalisée à 150 Volts durant 45 min et suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

d'ammonium. Ces auteurs obtenaient alors un rendement de 25 % pour un taux de purification de 2. La réalisation de précipitations fractionnées avec des taux de saturation en sulfate d'ammonium allant de 30 à 80 % n'a pas donné de meilleurs résultats que notre chromatographie d'exclusion (résultats non figurés).

**Tableau 10 :** Résultats obtenus au cours de la préparation de l'extrait enzymatique HCQE à partir de 9 mL d'une préparation expérimentale d'*Aspergillus niger* (GB).

Etapes	Volume total (mL)	Protéines totales (mg)	Activité totale (nkat)	Activité spécifique (nkat.mg <sup>-1</sup> )	Rendement %	Facteur de purification
GB	9	170,6	630	3,69	100	1
GF	14	107,2	466	4,35	74	1,2
HCQE	27	10,3	316	30,72	50	8,3

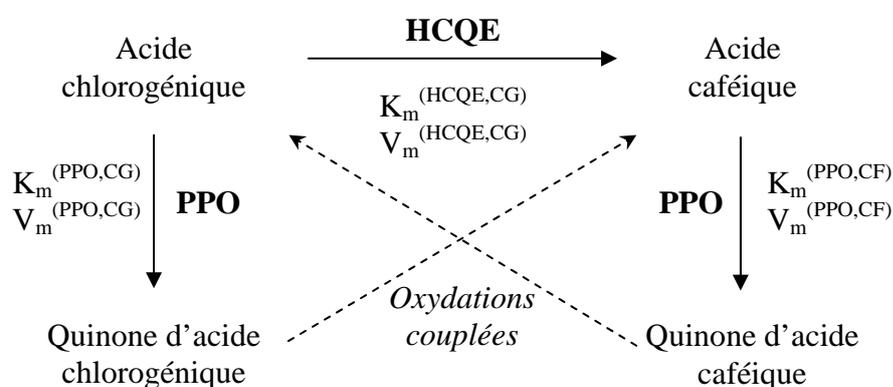
En outre, si 63 % des protéines totales sont encore présentes dans la fraction GF, la majorité du glycérol et des phénols présents dans la préparation GB est éliminée. D'autre part, la chromatographie d'interactions hydrophobes est très efficace puisque son rendement est proche de 68 % et le taux de purification est proche de 7. Cette étape permet en outre d'éliminer les pectine méthyl estérases ainsi que la majorité des polygalacturonases présentes dans l'extrait GB. L'emploi d'une matrice avec des propriétés hydrophobes différentes serait envisageable pour tenter de séparer l'activité polygalacturonase associée à l'HCQE. Notons enfin que les précipitations au sulfate d'ammonium testées par MADANI *et al.* (1997) n'ont pas permis de séparer les activités pectinolytiques de l'HCQE.

Les fractions obtenues au cours de la purification sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant. Le profil obtenu après coloration des protéines au bleu de Coomassie est représenté figure 57. Les pistes dans lesquelles ont été déposés l'extrait GB et la fraction GF issue de la chromatographie d'exclusion présentent une traînée dans laquelle on distingue quelques bandes protéiques. La coloration de la piste correspondant au dépôt de la fraction HCQE issue de la chromatographie d'interactions hydrophobes révèle la présence de 4 bandes protéiques distinctes. La simplicité de ce dernier profil comparée avec celui de la fraction GF témoigne de l'efficacité de la chromatographie d'interactions hydrophobes. La bande majoritaire correspond à une masse moléculaire apparente de 42,5 kDa calculée d'après la courbe d'étalonnage présentée figure 59. Une bande correspondant à un poids moléculaire identique est également retrouvée dans les pistes correspondant aux extraits GB et GF. Sachant qu'une première estimation réalisée au laboratoire par chromatographie d'exclusion fixait à 40 kDa la masse moléculaire apparente de l'HCQE, nous

pouvons supposer que notre bande associée à une masse moléculaire de 42,5 kDa correspond à cette même enzyme. Cette hypothèse serait à confirmer en réalisant une révélation colorée spécifique ou une immuno-empreinte (Western Blot) à l'aide d'anticorps spécifiques de l'HCQE. Notons que SCHÖBEL et POLLMANN (1980) avaient estimé par chromatographie d'exclusion la masse moléculaire de l'HCQE d'*Aspergillus niger* à 240 kDa, ce qui paraît surprenant. Ces auteurs pourraient avoir caractérisé une forme polymérique de l'enzyme.

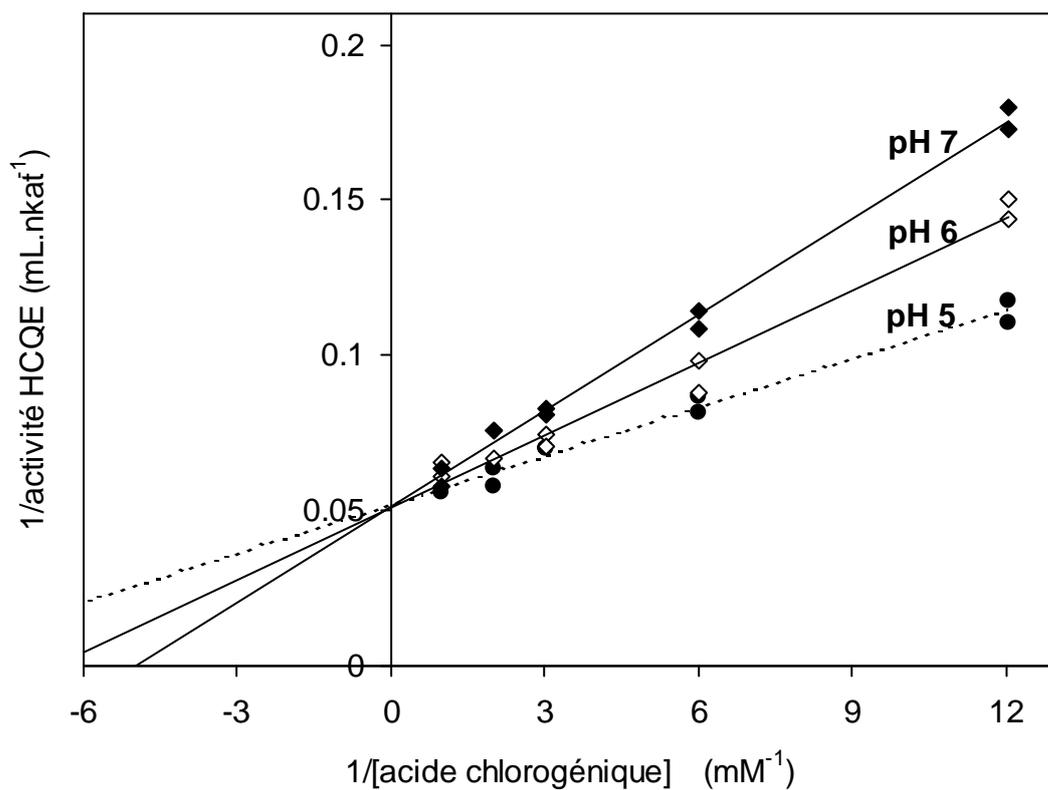
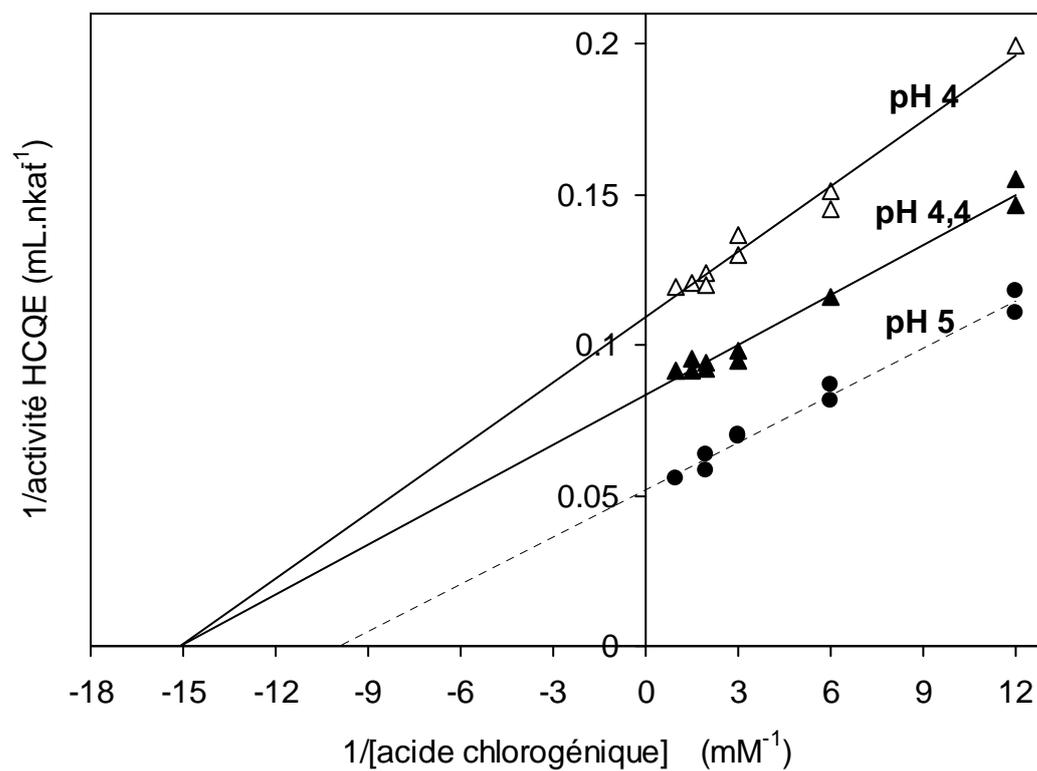
### 3.3. INFLUENCE DE L'HCQE SUR L'OXYDATION DE L'ACIDE CHLOROGENIQUE PAR LA PPO D'ABRICOT.

L'introduction d'HCQE dans un milieu réactionnel devrait permettre de substituer progressivement l'acide caféique, phénol faiblement oxydable voire inhibiteur compétitif des PPO, à l'acide chlorogénique, l'un des meilleurs phénols-substrats des PPO. Ce comportement de l'acide caféique vis-à-vis de la PPO serait dû à sa structure particulière dans laquelle coexiste une fonction carboxylique avec une fonction *o*-diphénolique (JANOVTIZ-KLAPP *et al.*, 1990b ; SAPERS, 1993 ; KERMASHA *et al.*, 1993). La figure 58 montre le schéma des réactions enzymatiques susceptibles de se produire dans un milieu contenant initialement de l'acide chlorogénique, de l'HCQE et la PPO.



**Figure 58 :** Schéma des réactions se produisant un milieu contenant initialement de l'acide chlorogénique, de l'HCQE et la PPO.

Dans des conditions expérimentales données, l'acide chlorogénique est consommé par l'HCQE d'une part et par la PPO d'autre part, avec les paramètres cinétiques correspondant à chacune des deux enzymes. Il en résulte la formation de quinones d'acide chlorogénique (suite à l'oxydation par la PPO) et d'acide caféique (suite à l'hydrolyse par l'HCQE). Or l'acide caféique ainsi apparu est



**Figure 59** : Effet du pH sur l'hydrolyse de l'acide chlorogénique par l'HCQE. (Représentations selon LINEWEAVER et BURK).

oxydé a son tour par la PPO, réaction caractérisée par les paramètres cinétiques correspondants. L'intérêt d'un tel modèle est conditionné par une synthèse rapide d'acide caféique et par une inhibition efficace de la PPO par ce dernier, afin d'éviter ou de retarder de manière optimale l'apparition de quinones conduisant à la formation de pigments colorés. Cependant, l'évolution de la teneur en phénols dépend également des phénomènes d'oxydation couplée susceptibles de se produire entre les quinones d'acide chlorogénique et l'acide caféique d'une part, et les quinones d'acide caféique et l'acide chlorogénique d'autre part (flèches pointillées de la figure 58).

Ces réactions conduisent à la régénération du phénol parental. Selon FORGET-RICHARD (1992), l'orientation de ces réactions dépend des différences de potentiel d'oxydo-réduction des couples (CG, Quinone de CG) et (CF, Quinone de CF). L'établissement de la modélisation des réactions enzymatiques nous permettra d'estimer l'influence de ces phénomènes d'oxydation couplée. Nous choisissons d'employer un extrait de PPO d'abricot partiellement purifié qui se caractérise principalement par sa forte activité.

Le but final de cette modélisation est de caractériser l'influence de l'HCQE sur l'oxydation, via la PPO, de phénols en milieu modèle afin de prévoir les quantités d'HCQE nécessaires pour inhiber l'activité polyphénoloxydasique.

### **3.3.1. Détermination des constantes cinétiques de l'HCQE et de la PPO d'abricot.**

Une étape préliminaire indispensable à cette modélisation consiste donc à déterminer les paramètres cinétiques des deux systèmes enzymatiques employés. Les extraits enzymatiques que nous utiliserons sont la fraction HCQE issue de la purification à partir de la préparation GB d'*Aspergillus niger* et la fraction PPOA issue de la purification réalisée à partir d'abricots Bergeron.

#### ***3.3.1.1. Influence du pH sur les constantes cinétiques de l'HCQE.***

0,75 nkat d'HCQE sont incubés avec différentes concentrations de CG comprises entre 0,083 et 1 mM dans des conditions de pH allant de 4 à 7. L'influence du pH sur le  $K_m$  et la  $V_m$  a été analysée à l'aide d'une représentation en double inverse selon LINEWEAVER et BURK (figure 59). Deux graphiques différents ont été utilisés pour représenter les effets observés pour des pH inférieurs à 5 (figure 59A) et ceux observés pour des pH supérieurs (figure 59B). Pour chaque concentration en CG testée, le maximum d'activité est situé à pH 5. Notons que nous avons déterminé une activité

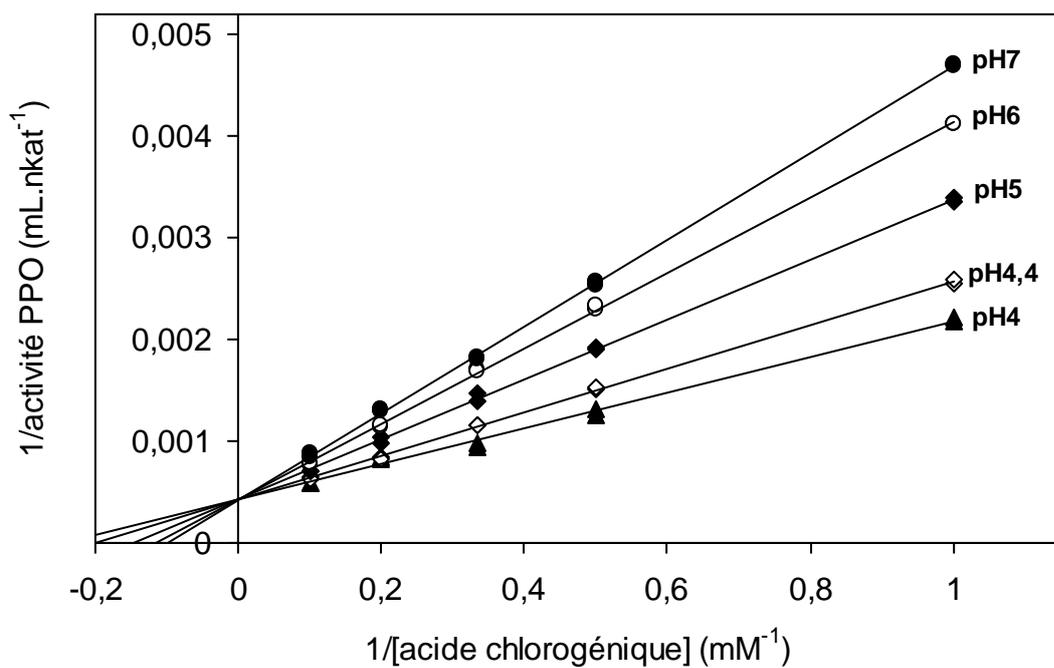
maximale à pH 6 pour l'extrait non purifié GB (paragraphe 3.1.3.1.1). Or la courbe indiquait que les différences d'activité observées dans la zone de pH allant de 5 à 7,5 n'excédaient pas 13 %. Les droites de la figure 59 montrent que pour des concentrations supérieures à 0,5 mM, les activités à pH 5 et 6 sont également très proches. Dans la zone acide, les droites obtenues pour les pH 4 et 4,4 convergent sur l'axe des abscisses, indiquant que l'ion H<sup>+</sup> peut être considéré comme un inhibiteur non compétitif qui n'affecte pas l'affinité de l'HCQE pour l'acide chlorogénique. Les droites obtenues pour les pH 4,4 et 5 sont parallèles, ce qui indiquerait que le proton agit comme un inhibiteur incompétitif dont la fixation est conditionnée par la fixation du substrat sur le site catalytique. Il serait nécessaire de réaliser d'autres cinétiques à pH différents pour affiner ces résultats. Dans la zone de pH proche de la neutralité, les droites obtenues convergent sur l'axe des ordonnées. Ces effets du pH sont vraisemblablement associés à des changements de conformation de l'HCQE selon les conditions de milieu. Le changement d'ionisation de la fonction carboxylique du CG, se produisant autour de pH 5, est susceptible de modifier fortement les valeurs de Km ou Vm vis-à-vis de l'HCQE. Ce type de phénomène a été notamment observé lors d'études sur l'effet du pH vis-à-vis de l'oxydation de l'acide caféique par la PPO de pomme (JANOVITZ-KLAPP, 1989).

L'ensemble des valeurs de Km et Vm obtenues est reporté dans le tableau 11. Lorsque l'on compare les paramètres cinétiques à pH 5 avec ceux obtenus dans des conditions expérimentales similaires par VAROQUAUX *et al.* (1982) on constate que ces auteurs disposaient d'une préparation d'HCQE d'*Aspergillus niger* non purifiée ayant une efficacité enzymatique (estimée par le rapport V<sub>m</sub>/K<sub>m</sub>) 1000 fois inférieure à celle de notre extrait purifié.

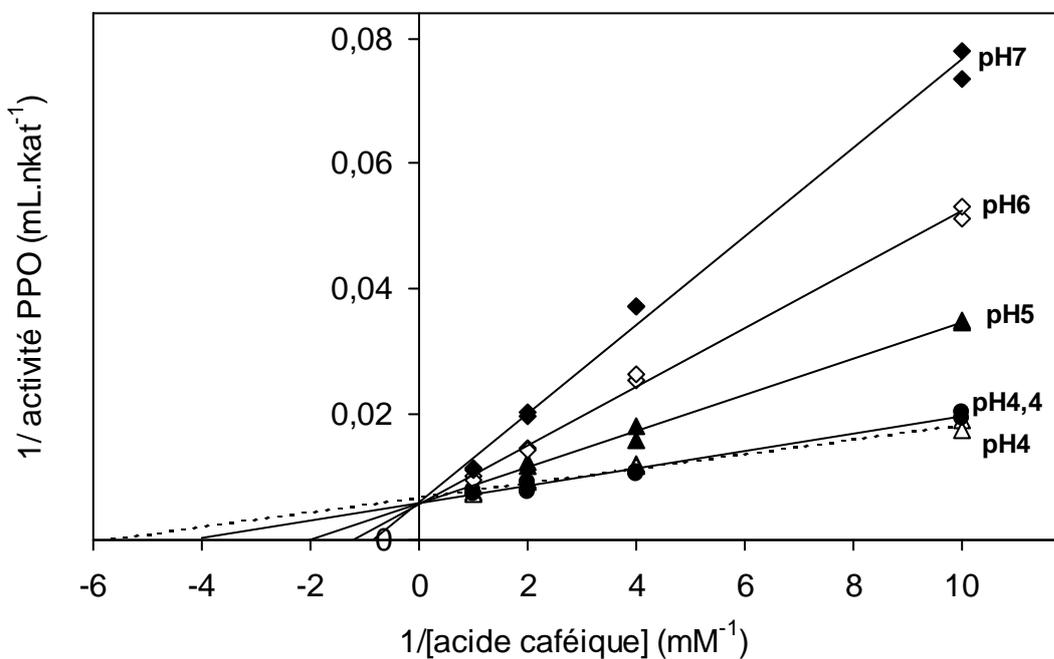
**Tableau 11 :** Effet du pH sur les paramètres cinétiques de l'HCQE pour l'acide chlorogénique.

pH	K <sub>m</sub> <sup>(HCQE,CG)</sup> (mM)	V <sub>m</sub> <sup>(HCQE,CG)</sup> (nkat.mL <sup>-1</sup> )	V <sub>m</sub> <sup>(HCQE,CG)</sup> %
4	0,066	9,18	48
4,4	0,066	12,01	62
5	0,100	19,31	100
6	0,150	19,31	100
7	0,197	19,31	100

Quel que soit le pH du dosage d'activité, les valeurs des constantes d'affinité sont 5 à 15 fois inférieures à la concentration d'acide chlorogénique employée, ce qui est aussi le cas dans le dosage



**Figure 60** : Effet du pH sur l'oxydation de l'acide chlorogénique par la PPO d'abricot. (Représentations selon LINEWEAVER et BURK).



**Figure 61** : Effet du pH sur l'oxydation de l'acide caféique par la PPO d'abricot. (Représentations selon LINEWEAVER et BURK).

en routine de l'activité HCQE (1 mM). Ces conditions de dosage sont bien proches de la saturation en substrat.

### 3.3.1.2. Influence du pH sur les constantes cinétiques de la PPO d'abricot.

A chaque pH, nous avons déterminé polarographiquement la vitesse initiale de la consommation d'oxygène par la PPO en fonction des concentrations en CG entre 1 et 10 mM. L'influence du pH entre 4 et 7 sur les  $K_m$  et  $V_m$  apparents a été analysée à l'aide d'une représentation en double inverse (figure 60). Le maximum d'activité est situé à pH 4 quelle que soit la concentration d'acide chlorogénique considérée. Le graphique révèle également que toutes les droites obtenues convergent sur l'axe des ordonnées. La valeur de pH affecte donc l'affinité de la PPO d'abricot vis-à-vis du CG dans la zone de pH allant de 4 à 7. JANOVITZ-KLAPP (1989) observait, pour des pH inférieurs à 5, une variation de la valeur de  $V_m$  de la PPO de pomme vis-à-vis de l'acide chlorogénique, alors que le  $K_m$  restait inchangé autour de 4,2 mM. Dans une zone de pH compris entre 5 et 5,7, les valeurs des deux paramètres étaient modifiées.

Une expérience similaire a été effectuée avec l'acide caféique dans une gamme de pH compris entre 4 et 7 et pour des concentrations variant de 0,1 à 1 mM (figure 61). L'ensemble des valeurs obtenues est reporté dans le tableau 12.

**Tableau 12 :** Effet du pH sur les paramètres cinétiques de la PPO d'abricot pour l'acide chlorogénique et l'acide caféique.

pH	acide chlorogénique		acide caféique	
	$K_m$ app. (mM)	$V_m$ app. (nkat.mL <sup>-1</sup> )	$K_m$ app. (mM)	$V_m$ app. (nkat.mL <sup>-1</sup> )
4	3,9	2200	0,17	147
4,4	4,8	2200	0,25	167
5	6,6	2200	0,5	167
6	8,2	2200	0,75	167
7	9,4	2200	1,07	167

Dans la zone de pH allant de 4,4 à 7, seule la valeur de  $K_m$  varie, le proton est donc un inhibiteur compétitif vis-à-vis de l'acide caféique, comme dans le cas de l'acide chlorogénique. A pH 4 cependant, la valeur de  $V_m$  apparent est affectée. Ainsi l'activité est optimale à pH 4 pour des concentrations en acide caféique inférieures à 0,25 mM et à pH 4,4 pour des concentrations

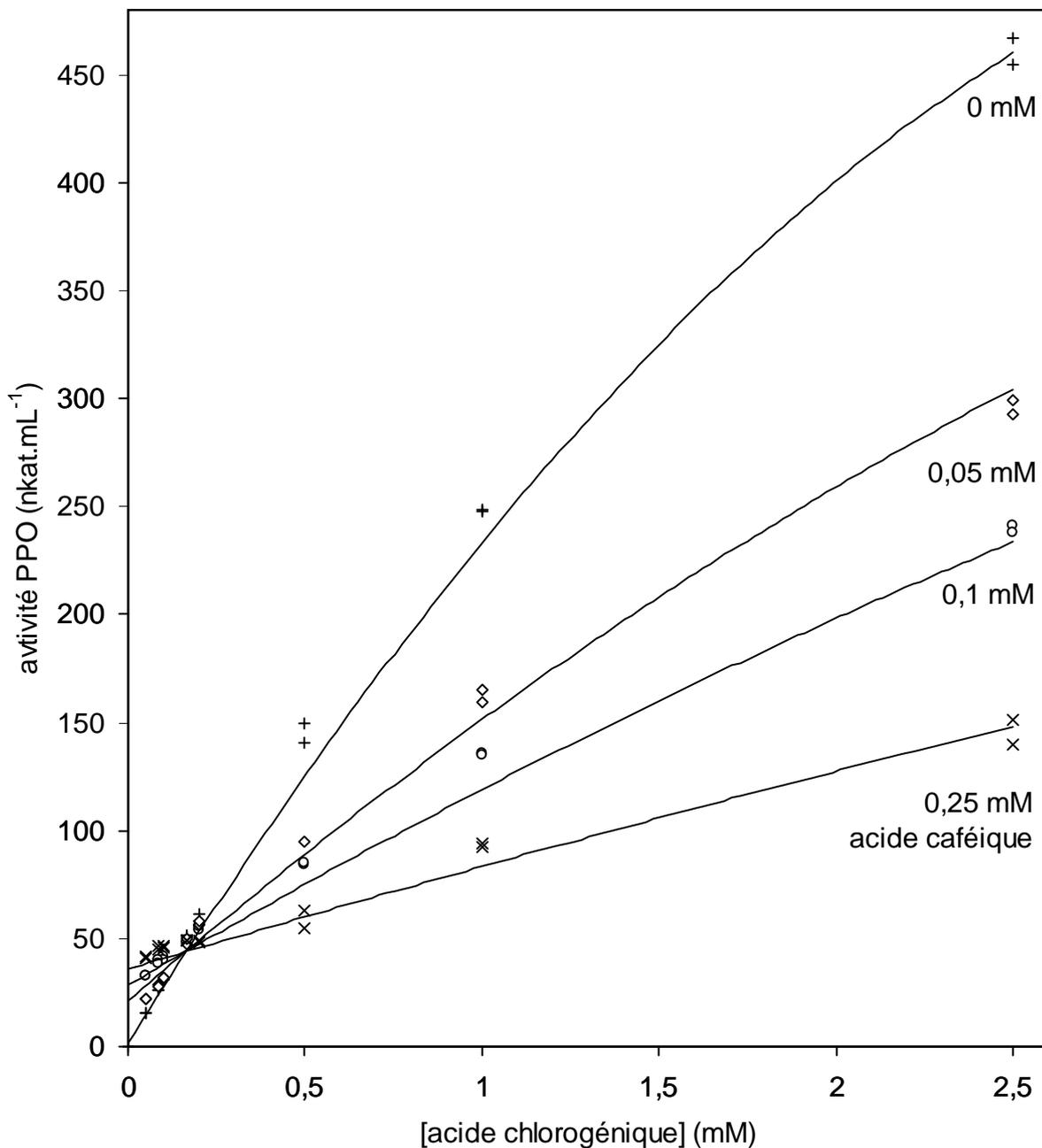
supérieures à 0,25 mM. Un phénomène similaire a été observé par JANOVIKZ-KLAPP (1989) lors de l'étude de l'effet du pH sur l'oxydation de l'acide caféique par la PPO isolée de pomme. Ce même auteur suppose que cet effet serait dû à la dissociation de la fonction carboxylique de ce substrat intervenant autour de pH 4,5. Ainsi à pH 4, la fonction carboxylique non dissociée complexerait le cuivre, freinant l'oxydation de l'*o*-diphénol.

D'autre part, quel que soit le pH considéré, l'affinité de la PPO d'abricot vis-à-vis de l'acide caféique est 10 à 20 fois supérieure à l'affinité vis-à-vis de l'acide chlorogénique. Les vitesses maximales déterminées en présence d'acide caféique sont environ 13 fois plus faibles que celles obtenues en présence d'acide chlorogénique. En terme d'efficacité enzymatique ( $V_m/K_m$ ), l'acide caféique est donc un moins bon substrat de la PPO d'abricot que l'acide chlorogénique dans nos conditions expérimentales. JANOVIKZ-KLAPP (1989) et FORGET-RICHARD (1992) présentaient également l'acide caféique comme un substrat médiocre, voire inhibiteur de la PPO isolée de pomme.

Ainsi les paramètres cinétiques des PPO et HCQE vis-à-vis de deux *o*-diphénols dans des conditions de pH variant entre 4 et 7 ont été définis. Quelles que soient les conditions de pH, l'HCQE présente une affinité vis-à-vis de l'acide chlorogénique 50 à 60 fois supérieure à celle de la PPO d'abricot. Les vitesses maximales de l'HCQE sont cependant 60 fois plus faibles que celles de la PPO dans nos conditions expérimentales. D'autre part, l'acide caféique est susceptible de se fixer sur la PPO pour former un complexe ayant une vitesse de catalyse faible. Ces mécanismes apparaissent favorables à l'efficacité de l'HCQE en tant qu'inhibiteur du brunissement enzymatique. Nous pouvons donc débiter nos études de milieux modèles.

### **3.3.2. Oxydation de mélanges d'acides chlorogénique et caféique par la PPO d'abricot.**

La première étape consisterait à modéliser l'oxydation d'un mélange de deux phénols par la PPO d'abricot. La modélisation de la consommation d'oxygène dans de tels milieux en présence de PPO isolée de pomme a fait l'objet d'une partie des recherches de JANOVIKZ-KLAPP *et al.* (1990b) complétées par FORGET-RICHARD (1992). Les premiers auteurs ont en effet proposé une équation décrivant la consommation d'oxygène dans un mélange binaire. Cette équation faisant suite à des



**Figure 62 :** Influence de l'addition d'acide caféique sur la vitesse de consommation d'oxygène à différentes concentrations en acide chlorogénique, catalysée par la PPO d'abricot.

Les points expérimentaux sont superposés aux courbes obtenues à partir de l'équation A.

Conditions expérimentales : 0,8 nkat de PPOA sont incubés avec 2900  $\mu$ L de solution d'acide chlorogénique et d'acide caféique dans un tampon phosphate-citrate à pH 4,4, à 30°C.

résultats expérimentaux sur un mélange 4-méthyl catéchol / acide caféique a été vérifiée avec un mélange acide chlorogénique / épicatechine. L'équation proposée est la suivante :

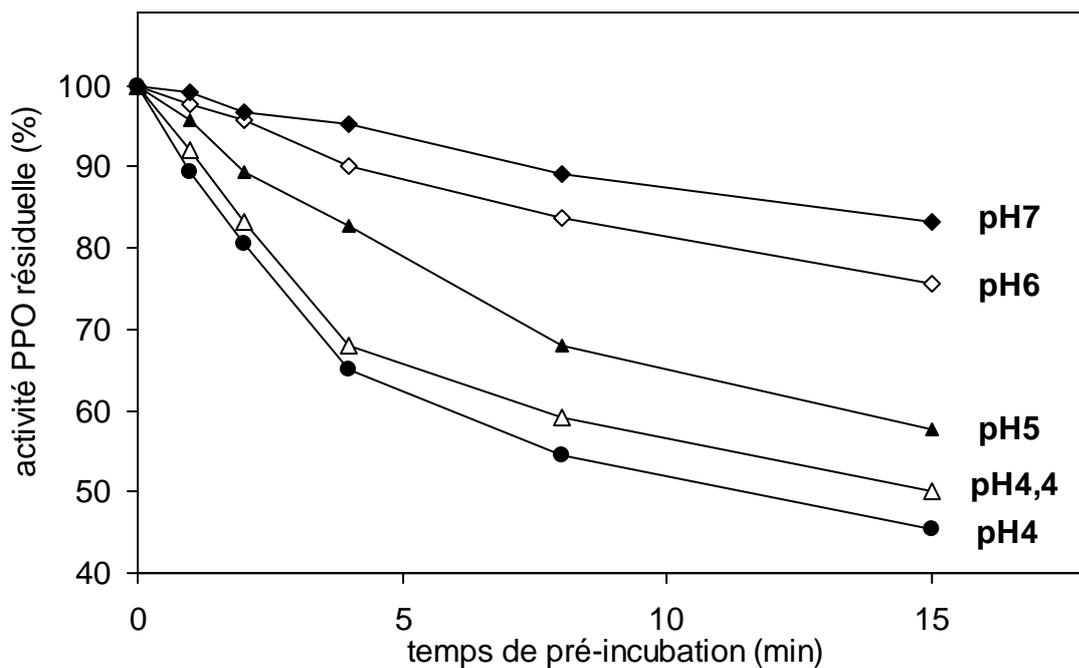
$$v = \frac{V_{m1} \cdot S_1 / K_{m1} + V_{m2} \cdot S_2 / K_{m2}}{1 + S_1 / K_{m1} + S_2 / K_{m2}} \quad (A)$$

Celle-ci traduit une oxydation indépendante des deux composés phénoliques, la répartition de l'enzyme entre ces deux substrats n'étant fonction que des constantes d'affinité de ces derniers. Selon FORGET-RICHARD (1992), cette loi ne permet cependant pas toujours d'expliquer la consommation de chacun des deux phénols. En effet, les phénomènes d'oxydation couplée se produisant dès l'apparition d'*o*-quinones dans le milieu réactionnel, ils provoquent une consommation ou une régénération des phénols. Les quinones d'acide chlorogénique apparaissent notamment comme les plus réactives vis-à-vis de phénols tels que l'épicatechine.

Les résultats obtenus lors de l'incubation de l'acide chlorogénique entre 0,05 et 2,5 mM, avec la PPO d'abricot et en présence d'acide caféique entre 0 et 0,25 mM, sont représentés sur la figure 62. Il est clair que la vitesse de consommation d'oxygène est d'autant plus ralentie que la quantité d'acide caféique ajoutée est plus importante. En ce sens, l'acide caféique peut-être considéré comme un inhibiteur de l'oxydation de l'acide chlorogénique. Or nous avons montré dans le paragraphe précédent que les valeurs de  $K_m$  et  $V_m$  apparents de l'acide caféique sont très inférieures à celles de l'acide chlorogénique. On peut donc penser que la majeure partie de la PPO se trouve sous forme de complexe caféoyl-PPO ne libérant les quinones que très lentement. Ainsi, une faible portion des PPO présentes dans l'incubat est disponible pour l'oxydation de l'acide chlorogénique. En utilisant les valeurs de  $V_m$  et  $K_m$  apparents déterminées dans l'expérience précédente pour les acides chlorogénique et caféique, les courbes représentatives de l'équation (A) ont été reportées sur la figure 63. Celles-ci apparaissent en excellent accord avec les points expérimentaux. On remarque que toutes les courbes se croisent en un point unique pour une concentration en acide chlorogénique proche de 0,17 mM pour laquelle l'activité PPO est d'environ 50 nkat.mL<sup>-1</sup>. Pour cette valeur, la vitesse de consommation en oxygène est indépendante de la quantité d'acide caféique ajoutée. Les coordonnées  $S_c$  et  $V_c$  de ce point commun peuvent être calculées à partir de l'équation (A), en déterminant la valeur  $S_1$  (concentration en CG) qui annule la dérivée de la vitesse par rapport à  $S_2$  (concentration en CF) on obtient :

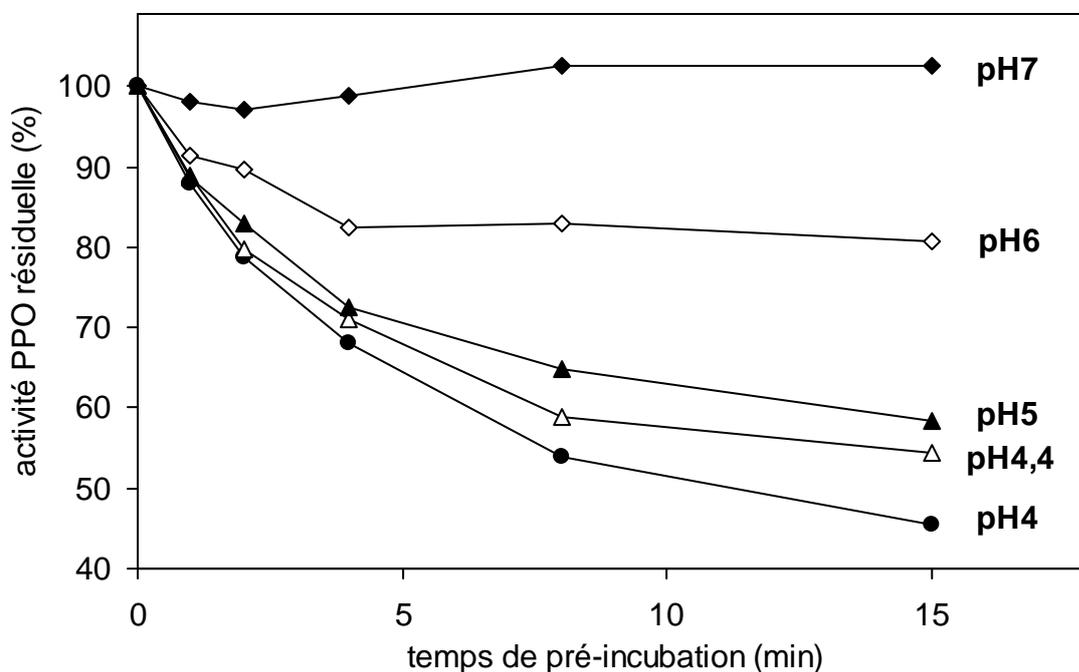
$$S_c = K_{m1} \cdot V_{m2} / (V_{m1} - V_{m2}) \quad \text{et} \quad V_c = V_{m2}$$

où :  $K_{m1}$  et  $V_{m1}$  sont les paramètres cinétiques de la PPO vis-à-vis du CG,



**Figure 63 :** Effet de l'HCQE sur la consommation d'oxygène.

Conditions : 2500  $\mu$ L d'une solution de CG (1 mM) tamponnée au pH désiré sont pré-incubés pendant 1 à 15 min avec 5 nkat d'HCQE à 30°C. L'enregistrement polarographique débute dès l'ajout de 1,6 nkat de PPOA dans l'incubateur.



**Figure 64 :** Effet de l'HCQE sur l'activité PPO dosée par spectrophotométrie.

Conditions : 1250  $\mu$ L d'une solution de CG (1 mM) tamponnée au pH désiré sont pré-incubés pendant 1 à 15 min avec 1,5 nkat d'HCQE à 30°C. 5 nkat de PPOA sont ensuite ajoutés. L'évolution de l'absorbance à 410 nm est suivie pendant 3 min à raison d'une mesure toutes les 10 sec.

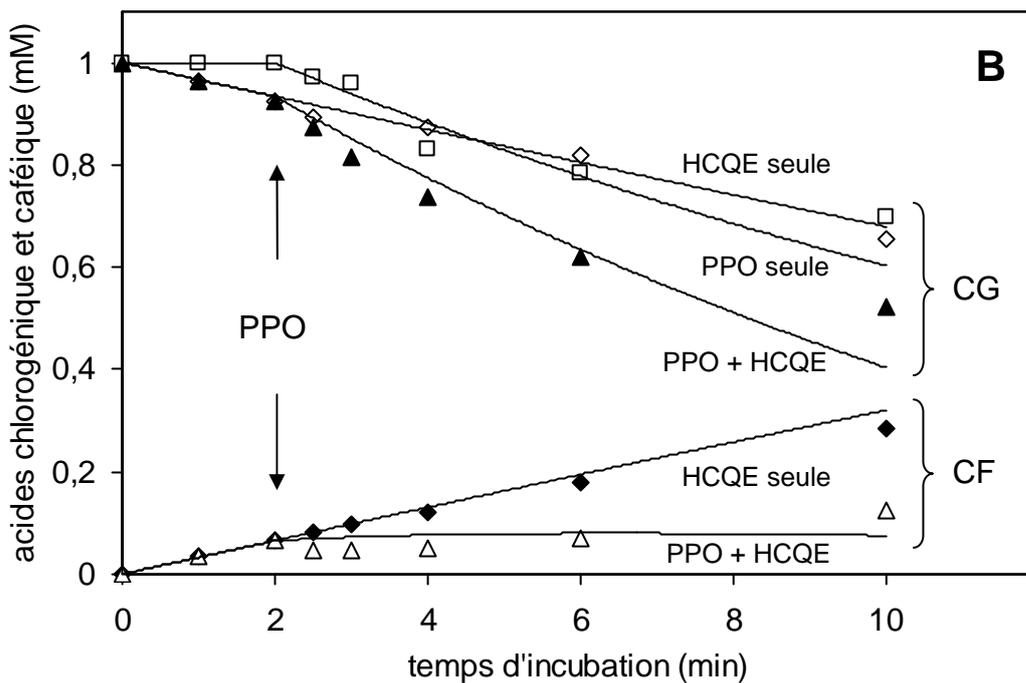
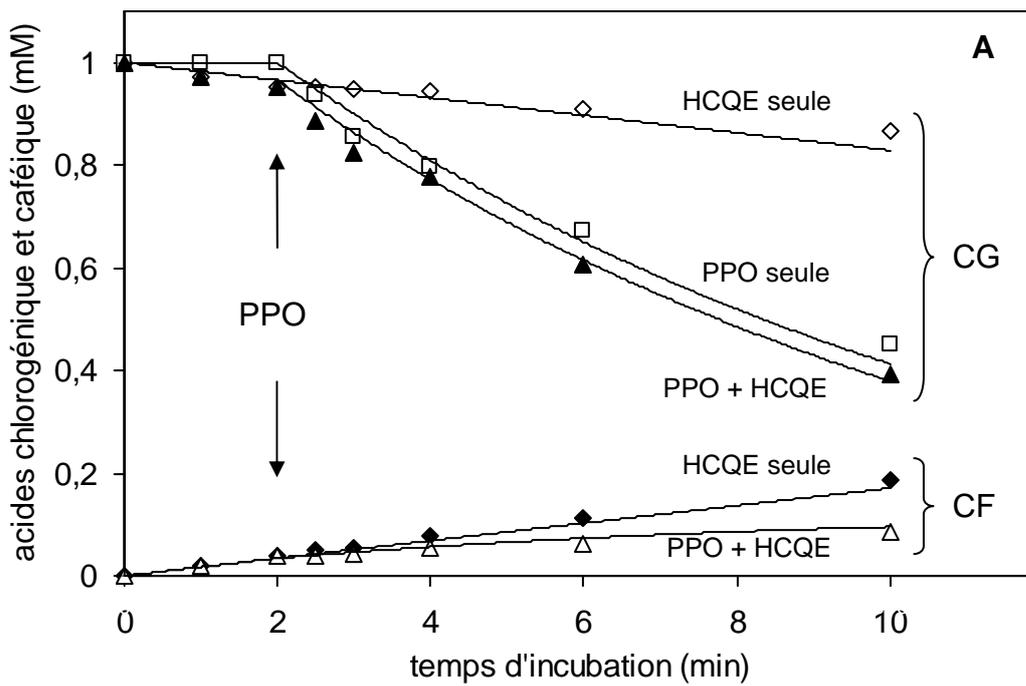
et  $V_{m_2}$  sont la vitesse maximale de la PPO vis-à-vis du CF.

Soit, pour le mélange,  $S_c = 0,16$  mM et  $V_c = 44$  nkat.mL<sup>-1</sup>, valeurs en accord avec nos observations expérimentales. L'étude de mélanges acide chlorogénique / catéchine et 4-méthyl catéchol / acide caféique en présence de PPO de pomme avait révélé des résultats similaires (JANOVITZ-KLAPP *et al.*, 1990b).

### **3.3.3. Influence du pH sur l'inhibition de l'activité PPO par l'HCQE.**

Une expérience préliminaire a consisté à doser polarographiquement et par spectrophotométrie la vitesse initiale d'oxydation d'acide chlorogénique (1 mM initial) par la PPO en présence de différentes quantités d'HCQE dans une gamme de pH allant de 4 à 7. Le dosage spectrophotométrique est adapté du protocole de FORGET-RICHARD (1992) et consiste à suivre l'évolution de l'absorbance à 410 nm des milieux réactionnels. Les résultats (non figurés) ont montré que, quelles que soient la méthode de dosage employée et la valeur de pH du milieu réactionnel, les vitesses initiales d'oxydation ne sont pas affectées par la présence d'HCQE. Notre extrait d'HCQE ne contient donc pas d'inhibiteur direct de la PPO ni de composé ayant une influence significative sur la formation des pigments colorés issus des quinones d'acide caféique, contrairement aux extraits employés par MADANI *et al.* (1997).

Ces premiers résultats nous ont conduit à étudier l'influence du pH sur l'inhibition de l'activité PPO après pré-incubation d'acide chlorogénique avec l'HCQE. L'évolution de l'activité PPO en fonction du temps de pré-incubation a été suivie par polarographie (figure 63) et par spectrophotométrie (figure 64). Parallèlement, la teneur de l'incubats en acide caféique est déterminée (résultats non figurés). Pour chaque pH d'incubation, la vitesse initiale de consommation d'oxygène est d'autant plus faible que le temps de pré-incubation est plus long et donc que la quantité d'acide caféique formé est plus importante. Des incubats témoins sans HCQE ont indiqué que l'activité PPO initiale restait stable tout au long de l'expérience (résultats non figurés). De plus, l'inhibition de l'activité PPO est d'autant plus importante que la valeur de pH diminue. En effet, près de 55 % de l'activité PPO initiale est perdue à pH 4 contre 15 % seulement à pH 7 dans le cas du dosage polarographique. D'autre part, on constate qu'après 15 minutes de pré-incubation, la teneur en CF atteint 0,4 mM à pH 4 contre 0,6 mM à pH 7, ce qui paraît contradictoire avec le résultat précédent. Ce phénomène tient principalement à l'effet inhibiteur de l'acide caféique dans des zones de pH inférieures à 5, phénomène montré par JANOVITZ-KLAPP (1989) et observé au cours des expériences décrites dans le chapitre 3.2.1.2. L'influence du pH est encore plus nette



**Figure 65** : Evolution de la teneur en acides chlorogénique et caféique en présence de PPO et d'HCQE à pH 4,4 (figure 67A) et 7 (figure 67B) : points expérimentaux et courbes théoriques.

Les points expérimentaux sont superposés aux courbes obtenues à partir des équations B et C.

lorsque l'activité PPO est dosée par spectrophotométrie, puisqu'à pH 4, la perte d'activité est de 55 % alors qu'à pH 7 l'incubation avec l'HCQE ne paraît pas avoir d'effet significatif. Ceci s'explique par le fait qu'au pouvoir inhibiteur de l'acide caféique se superpose une influence du pH sur les propriétés spectrales des pigments colorés, influence décrite par NICOLAS *et al.* (1994).

Il ressort de ces résultats que l'hydrolyse de l'acide chlorogénique par l'HCQE entraîne effectivement une inhibition de la PPO d'autant plus efficace que la quantité d'acide caféique formée est plus importante et la valeur de pH de l'incubat est plus faible.

### **3.3.4. Composition phénolique des milieux réactionnels.**

Rappelons que le but de la modélisation de nos milieux réactionnels est de prévoir les quantités d'HCQE nécessaires pour l'obtention d'une inhibition significative de la PPO. S'impose alors une modélisation de l'évolution de la composition phénolique d'un milieu réactionnel en présence des deux systèmes enzymatiques. La première étape de ce travail consiste donc à suivre l'évolution des teneurs en acide chlorogénique et caféique de milieux modèles expérimentaux.

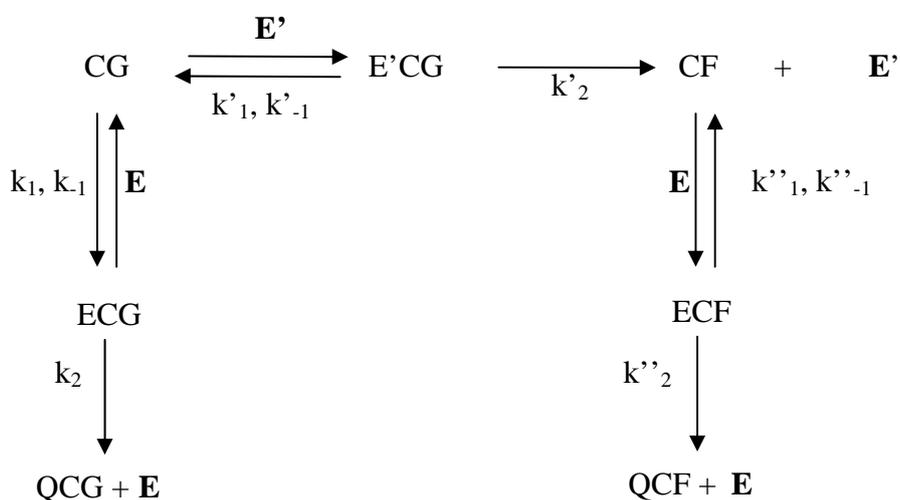
Pour cela, on réalise une série d'expérimentations dans lesquelles l'acide chlorogénique est mis en présence de l'HCQE et de la PPO. Une solution d'acide chlorogénique (2500  $\mu\text{L}$  à 1 mM) à pH choisi est pré-incubée pendant 2 minutes avec 100  $\mu\text{L}$  d'HCQE à 30°C, puis sont ajoutés 20  $\mu\text{L}$  de PPOA d'abricot. L'évolution des teneurs en acides chlorogénique et caféique sont suivies par HPLC. Les incubations sont réalisées avec la PPO seule, l'HCQE seule ou en présence des deux enzymes. Les résultats des incubations à pH 4,4 et 7 sont reportés sur la figure 65. Si l'on s'intéresse par exemple aux points expérimentaux obtenus à pH 4,4 (figure 65A), on remarque que lorsque seule la PPO est ajoutée, la teneur en CG chute rapidement au cours des 2 minutes suivantes avec une vitesse initiale de consommation de 242  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'extrait enzymatique. Huit minutes après l'ajout de PPO, près de 40 % du CG initial sont consommés. Lorsque seule l'HCQE est ajoutée, la vitesse initiale de consommation est proche de 8  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'extrait enzymatique. Ainsi, au bout de 10 minutes, 15 % du CG total sont consommés. Parallèlement, apparaît l'acide caféique avec une vitesse initiale égale à la vitesse initiale de consommation du CG, pour atteindre une teneur proche de 2 mM à la fin de l'expérience. Dès l'ajout de PPO 2 minutes après l'HCQE, la vitesse de consommation de CG passe de 8 à 250  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Près de 45 % du CG initial sont consommés au total à la fin de l'expérience. A priori, on n'observe pas d'inhibition de la consommation de CG après une pré-incubation de 2 minutes avec l'HCQE, alors que sur le graphe 63 on notait une inhibition de l'oxydation du CG d'environ 15 %. Parallèlement, la vitesse d'apparition du CF chute brutalement dès l'ajout de PPO puis semble se stabiliser. En fin d'expérience, on note une concentration proche de 0,1 mM en CF

dans l'incubation contre 0,2 mM en l'absence de PPO. La teneur en acide caféique semble stabilisée, indiquant que ce phénol est oxydé par la PPO presque aussi rapidement qu'il apparaît dans le milieu réactionnel.

Lorsque l'expérience est réalisée à différents pH, les résultats paraissent similaires à ceux obtenus à pH 4,4. On remarque tout d'abord que l'activité PPO, caractérisée par la vitesse initiale de consommation de CG, est optimale à pH 4,4. Or les teneurs en CF observées en fin d'expérience confirment que l'HCQE atteint son activité optimale dans une zone de pH comprise entre 5 et 7. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, la PPO paraît 30 fois plus active que l'HCQE à pH 4,4. Les courbes obtenues à pH 7 (figure 65B) montrent cependant peu de différence entre les vitesses d'oxydation et d'hydrolyse du CG. Là encore, on ne note pas d'inhibition de la consommation de CG, ce qui est en accord avec les résultats du paragraphe précédent.

Dans la zone de pH inférieure à 5, la teneur en acide caféique se stabilise en présence des deux enzymes. A pH 6 et 7, celle-ci se stabilise au cours des 4 minutes qui suivent l'ajout de PPO, puis augmente à nouveau. Ceci confirme que dans cette dernière zone de pH, l'activité PPO n'est pas optimale, contrairement à celle de l'HCQE. Ainsi, durant les deux premières minutes qui suivent l'ajout de PPO, la PPO consomme autant d'acide caféique que l'HCQE en produit. Puis il semble qu'après 4 minutes une forte majorité de la PPO soit complexée sous forme caféoyl-PPO et qu'il apparaît alors dans le milieu un léger surplus de CF. C'est donc dans des conditions de pH proches de la neutralité que l'inhibition indirecte de la PPO par l'HCQE apparaît optimale. Cependant l'inhibition est très faible dans ces conditions et il aurait été plus judicieux de réaliser cette expérience avec des temps de pré-incubation avec l'HCQE plus longs.

Il est nécessaire à ce stade de l'étude de mettre en place un modèle mathématique qui pourrait traduire l'évolution de la quantité de phénols dans de tels milieux réactionnels, en supposant l'absence d'oxydation couplée. Comme nous l'avons supposé plus haut, les réactions enzymatiques suivantes se produisent dans nos milieux réactionnels :



Dans lequel **E** est la PPO, **E'** l'HCQE, CG l'acide chlorogénique, CF l'acide caféique et QCG et QCF les quinones correspondantes.

On peut en déduire la vitesse initiale de consommation de l'acide chlorogénique :

$$V_{\text{conso.CG}} = V_{\text{conso/PPO}} + V_{\text{conso/HCQE}}$$

avec :

$$V_{\text{conso/HCQE}} = \frac{V_m^{(\text{HCQE,CG})} \cdot [\text{CG}]}{[\text{CG}] + K_m^{(\text{HCQE,CG})}}$$

et la vitesse de consommation de l'acide chlorogénique par la PPO dépend de la quantité d'acide caféique présente dans le milieu réactionnel. Il faut donc résoudre le système d'équations suivants :

$$\left\{ \begin{array}{ll} d[\text{ECG}]/dt = 0 & (\text{état quasi-stationnaire}) \\ V_{\text{conso/PPO}} = k_2 \cdot \text{ECG} & (\text{vitesse d'apparition du produit}) \end{array} \right.$$

$$V_{\text{conso/PPO}} = k_2 \cdot \frac{[\text{ECG}] \cdot [\text{E}]_T}{[\text{E}]_T}$$

Or on sait que la concentration en PPO totale dans l'incubat  $[\text{E}]_T$  est :

$$[\text{E}]_T = [\text{E}] + [\text{ECG}] + [\text{ECF}]$$

en remplaçant  $[\text{E}]_T$  on obtient :

$$V_{\text{conso/PPO}} = k_2 \cdot \frac{[\text{ECG}] \cdot [\text{E}]_T}{[\text{E}] + [\text{ECG}] + [\text{ECF}]}$$

$$V_{\text{conso/PPO}} = \frac{V_m^{(\text{PPO,CG})}}{1 + ([\text{E}] + [\text{ECF}])/[\text{ECG}]}$$

D'autre part, les constantes de dissociation de l'enzyme et du substrat sont :

$$K_m^{(\text{PPO,CG})} = ([\text{E}] \cdot [\text{CG}])/[\text{ECG}] \quad \text{et} \quad K_m^{(\text{PPO,CF})} = ([\text{E}] \cdot [\text{CF}])/[\text{ECF}]$$

soit  $\frac{[\text{E}]}{[\text{ECG}]} = \frac{K_m^{(\text{PPO,CG})}}{[\text{CG}]}$

$$\frac{[\text{ECF}]}{[\text{ECG}]} = \frac{[\text{ECF}]}{[\text{E}]} \cdot \frac{[\text{E}]}{[\text{ECG}]} = \frac{[\text{CF}]}{K_m^{(\text{PPO,CF})}} \cdot \frac{K_m^{(\text{PPO,CG})}}{[\text{CG}]}$$

$$\text{donc : } V_{\text{conso/PPO}} = \frac{V_m^{(\text{PPO,CG})}}{1 + K_m^{(\text{PPO,CG})}/[\text{CG}] + \frac{[\text{CF}] \cdot K_m^{(\text{PPO,CG})}}{K_m^{(\text{PPO,CF})} \cdot [\text{CG}]}}$$

$$V_{\text{conso/PPO}} = \frac{V_m^{(\text{PPO,CG})} \cdot [\text{CG}]}{[\text{CG}] + K_m^{(\text{PPO,CG})} \cdot \left(1 + \frac{[\text{CF}]}{K_m^{(\text{PPO,CF})}}\right)}$$

Il s'agit là d'une équation classique, dans laquelle le CF joue le rôle d'un inhibiteur compétitif. La vitesse initiale de consommation d'acide chlorogénique en présence des deux enzymes est donc :

$$V_{\text{conso,CG}} = \frac{V_m^{(\text{PPO,CG})} \cdot [\text{CG}]}{[\text{CG}] + K_m^{(\text{PPO,CG})} \cdot \left(1 + \frac{[\text{CF}]_t}{K_m^{(\text{PPO,CF})}}\right)} + \frac{V_m^{(\text{HCQE,CG})} \cdot [\text{CG}]}{[\text{CG}] + K_m^{(\text{HCQE,CG})}} \quad (\text{B})$$

Le calcul de la vitesse de consommation d'acide caféique est similaire. On obtient alors :

$$V_{\text{apparition CF}} = \frac{V_m^{(\text{HCQE,CG})} \cdot [\text{CG}]}{[\text{CG}] + K_m^{(\text{HCQE,CG})}} - \frac{V_m^{(\text{PPO,CF})} \cdot [\text{CF}]_t}{[\text{CF}]_t + K_m^{(\text{PPO,CF})} \cdot \left(1 + \frac{[\text{CG}]}{K_m^{(\text{PPO,CG})}}\right)} \quad (\text{C})$$

Ces équations nous permettent donc de calculer l'évolution de la composition en CG et en CF de nos milieux réactionnels. A cette fin, nous mettons en place un calcul par itération à l'aide du logiciel Microsoft EXCEL, dont le principe consiste à calculer chaque point de la courbe à partir du point précédent à l'aide d'un algorithme. Nous choisissons de mettre sous forme de variables les concentrations en CG et CF initiales, les volumes de milieu réactionnel, de PPO et d'HCQE ajoutées, les paramètres cinétiques des enzymes par rapport aux substrats, les temps auxquels sont introduites les enzymes (dont dépendent les valeurs m et n définies ci-après) et l'intervalle de temps ( $\Delta t$ ) situé entre deux résultats d'algorithme (deux points calculés).

Sachant que :  $V_{\text{conso,CG}} = d\text{CG}/dt$

on déduit de l'équation (B) qu'entre  $t_0$  et  $t_0 + \Delta t$  :

$$\Delta\text{CG} = - \left[ \frac{V_m^{(\text{PPO,CG})} \cdot [\text{CG}] \cdot L_{\text{PPO}} \cdot m}{[\text{CG}] + K_m^{(\text{PPO,CG})} \cdot \left(1 + \frac{[\text{CF}]}{K_m^{(\text{PPO,CF})}}\right)} + \frac{V_m^{(\text{HCQE,CG})} \cdot [\text{CG}] \cdot L_{\text{HCQE}} \cdot n}{[\text{CG}] + K_m^{(\text{HCQE,CG})}} \right] \cdot \Delta t$$

Où :  $\Delta CG$  est la quantité de CG consommée en mmoles,  
 $\Delta t$  en secondes,  
les  $V_m$  en  $\text{mmole.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ , soit en  $\text{mkat.L}^{-1}$   
les  $K_m$  en mM,  
 $L_{\text{PPO}}$  est le volume de PPO introduit en L,  
 $L_{\text{HCQE}}$  le volume d'HCQE introduit en L,  
m un entier égal à 1 en présence de PPO ou à 0 en absence de PPO,  
n un entier égal à 1 en présence d'HCQE ou à 0 en absence de celle-ci,  
 $[CF]$  est calculé à partir de l'équation (C) en mM.

Or, dans le milieu réactionnel, la quantité résiduelle de CG en mmoles au temps  $t_0 + \Delta t$  est :

$$CG_{t_0 + \Delta t} = (V \cdot [CG]_{t_0}) + \Delta CG$$

où :  $V$  le volume de milieu réactionnel en L,  
 $[CG]_{t_0}$  la concentration de CG en mM à  $t_0$ .

Puis on en déduit la concentration  $[CG]$  dans le milieu réactionnel au temps  $t_0 + \Delta t$ . Le même raisonnement est appliqué pour le calcul de l'évolution de la concentration d'acide caféique  $[CF]$ .

On applique ensuite les calculs avec les paramètres cinétiques déterminés expérimentalement au cours des chapitres précédents pour chaque enzyme et une concentration initiale en acide chlorogénique de 1 mM. La figure 67 montre deux exemples de courbes calculées à partir des paramètres cinétiques déterminés respectivement à pH 4,4 et 7, superposées aux points expérimentaux. L'intervalle de temps  $\Delta t$  choisi est de 2 sec. Les courbes obtenues apparaissent en excellent accord avec les points expérimentaux. Cette concordance est d'ailleurs observée quelle que soit la valeur de pH de l'incubat (résultats non figurés). Rappelons que le modèle mis en place ne tient pas compte des réactions d'oxydation couplée qui ne paraissent donc pas influencer l'évolution de la composition phénolique des incubats dans nos conditions expérimentales.

A l'aide de ce modèle, nous avons cherché à déterminer la quantité d'HCQE nécessaire pour inhiber 50 % de la vitesse initiale d'oxydation de l'acide chlorogénique par la PPO dans les conditions décrites en début de chapitre (même  $[CG]_i$  initial, i.e. 1 mM, mêmes volumes de PPO et d'HCQE). Pour ce faire, la quantité de CF devant être présente au moment de l'ajout de la PPO dans le milieu est calculée.

L'équation à résoudre est la suivante :

$$V_{\text{oxydation CG initial}} = 2 \times V_{\text{oxydation CG en présence de CF}}$$

$$\text{soit } \frac{[\text{CG}]_i \cdot V_m^{\text{PPO/CG}}}{[\text{CG}]_i + K_m^{\text{PPO/CG}}} = 2 \times \frac{([\text{CG}]_i - [\text{CF}]) \cdot V_m^{\text{PPO/CG}}}{([\text{CG}]_i - [\text{CF}]) + K_m^{\text{PPO/CG}} \cdot (1 + [\text{CF}]/K_m^{\text{PPO/CF}})}$$

avec  $[\text{CG}]_i = 1 \text{ mM}$ . On obtient :

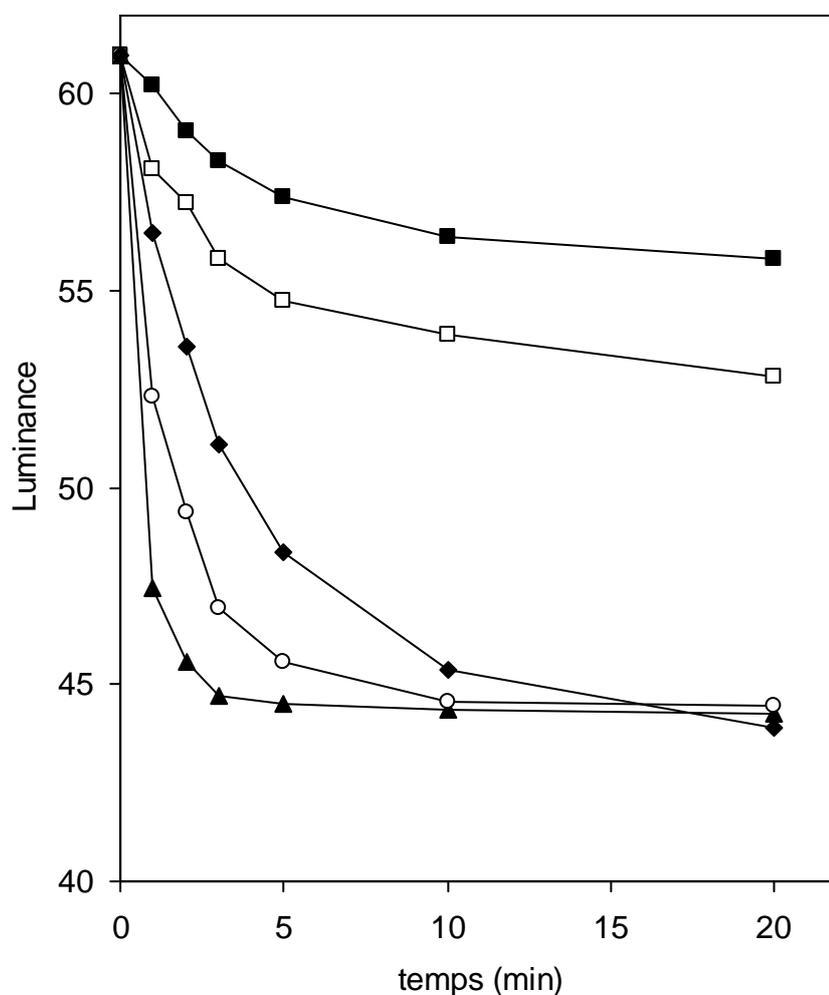
$$[\text{CF}] = \frac{1 + K_m^{\text{PPO/CG}}}{1 + 2 \cdot K_m^{\text{PPO/CG}} + (K_m^{\text{PPO/CG}}/K_m^{\text{PPO/CF}})}$$

Les valeurs de CF nécessaires pour inhiber l'activité PPO de 50 % dans nos conditions expérimentales sont reportées dans le tableau 11 pour les différentes valeurs de pH testées. A partir de ces valeurs, en posant le fait que cette concentration en CF doit être atteinte après 1 et 2 minutes d'incubation, on peut déterminer les valeurs de  $V_m^{\text{HCQE}}$  nécessaires pour remplir cette condition. Ceci nous conduit aux taux de concentration de l'enzyme (dans notre extrait) également reportés dans le tableau 13.

**Tableau 13 :** Quantités théoriques de CF et d'HCQE nécessaires pour une inhibition de 50 % de la vitesse initiale d'oxydation des phénols par la PPO d'abricot.

pH	[CF] (mM)	$V'_m^{\text{HCQE}}$ (nkat.mL <sup>-1</sup> )	$V'_m^{\text{HCQE}}$ (nkat.mL <sup>-1</sup> )	$V'_m/V_m$	$V'_m/V_m$
		1 minutes	2 minutes	1 minutes	2 minutes
4	0,15	2740	1370	<b>304</b>	<b>152</b>
4,4	0,19	3460	1730	<b>288</b>	<b>144</b>
5	0,28	5090	2545	<b>268</b>	<b>134</b>
6	0,32	6220	3110	<b>327</b>	<b>163</b>
7	0,36	7260	3630	<b>382</b>	<b>191</b>

Tout d'abord, on remarque que la quantité d'HCQE nécessaire pour l'inhibition est d'autant plus faible que la PPO est ajoutée plus tard dans le milieu réactionnel. Le rapport  $V'_m/V_m$  indique qu'un extrait d'HCQE 134 à 382 fois plus actif que notre extrait permet d'inhiber 50 % de l'activité PPO. Il serait donc nécessaire de rechercher des méthodes permettant d'obtenir un extrait concentré d'HCQE, comme par exemple la sélection d'une souche d'*Aspergillus niger* exprimant une forte



**Figure 66 :** Effet de différents additifs sur l'évolution de la luminance ( $L^*$ ) de broyats d'abricot.

Conditions : 40 g de cortex d'abricot sont homogénéisés avec 40 mL d'une solution de tampon acétate à pH 4,4 ( $\sigma$ ) additionnée de dissulfite de potassium 10 mM ( $\nu$ ), de L-cystéine 10 mM ( $\square$ ), d'HCQE à raison de 2,6 nkat.mL<sup>-1</sup> ( $\circ$ ) ou 8,4 nkat.mL<sup>-1</sup> ( $\nu$ ). Les broyats sont immédiatement versés dans des boîtes de Pétri puis la luminance mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Minolta CR-1000.



**Figure 67 :** Photographies des broyats en fin d'expérience.

activité HCQE ou en dotant une souche un promoteur permettant une forte expression d'HCQE, ou enfin l'ajout d'une étape de centrifugation au protocole de purification de l'enzyme.

### 3.4. EFFET DE L'ADDITION D'HCQE SUR LE BRUNISSEMENT DE BROYATS D'ABRICOT.

Après avoir étudié l'effet de l'addition de l'extrait d'HCQE dans des milieux modèles, nous testons son influence sur le brunissement de broyats d'abricot de la variété Bergeron par comparaison à l'emploi de deux additifs classiques. Nous avons adapté le protocole d'AMIOT *et al.* (1992) qui permet d'estimer le degré de brunissement en mesurant les trois paramètres  $L^*a^*b^*$  rendant compte de la couleur des broyats. La reproductibilité de cette méthode a été évoquée au chapitre 2.3. Nous rappelons qu'un coefficient de variation de 3,8 et un écart type de 2,1 unités avaient été obtenus, ce qui témoignait d'une reproductibilité satisfaisante. Les broyages sont réalisés en présence d'air.

La figure 66 représente l'évolution de la luminance  $L^*$  de broyats d'abricot contenant différents additifs. Les mesures des paramètres  $a^*$  et  $b^*$  n'ayant pas donné de résultats significatifs, ceux-ci ne sont pas représentés. Selon KUCZYNSKI *et al.* (1992), ces deux derniers paramètres ne permettent pas de suivre le brunissement de broyats de pêche. En outre, le suivi de la seule luminance reflète généralement de manière significative l'effet d'additifs sur le brunissement de broyats et de jus de fruits (de POIX *et al.*, 1980 ; SAPERS et DOUGLAS, 1987 ; LOZANO *et al.*, 1994). On observe un fort brunissement de notre broyat témoin qui se traduit par une rapide diminution de la valeur de  $L^*$  durant les 3 minutes qui suivent le broyage. La luminance semble ensuite se stabiliser après avoir perdu près de 30 % de sa valeur initiale. Ce phénomène classique (de POIX *et al.*, 1980) avait été signalé lors de notre étude du brunissement de broyats de pomme, de champignon et d'abricot (paragraphe 2.3.). L'application de bisulfite de potassium et de cystéine a un fort effet protecteur vis-à-vis du brunissement de nos broyats puisque la luminance ne chute respectivement que de 8,5 et 14 % au cours de l'expérience. La vitesse initiale de cette perte de luminance est divisée par 4 lors de l'ajout de cystéine et par 14 lors de l'ajout de bisulfite.

Lorsque deux extraits plus ou moins concentrés d'HCQE sont ajoutés dans les broyats, on observe encore une chute de la luminance, mais avec une vitesse initiale au moins 1,6 fois inférieure à celle du témoin. La vitesse initiale est d'autant plus faible que l'activité HCQE ajoutée est plus importante. Cependant, dans les deux cas la luminance chute jusqu'à atteindre 40 % de sa valeur initiale, puis se stabilise au bout de 10 minutes en présence de 104 nkat d'HCQE ou de 16 minutes environ en présence de 210 nkat d'HCQE. Les photographies prises en fin d'expérience (figure 67)

montrent clairement que les broyats contenant l'HCQE atteignent un niveau de brunissement similaire à celui du broyat témoin, contrairement aux broyats traités par la cystéine et le bisulfite. La faible efficacité de nos extraits d'HCQE peut s'expliquer par leur faible niveau d'activité, au regard de l'activité PPO qui peut atteindre  $10 \mu\text{kat.g}^{-1}$  (poids sec) de cortex d'abricot (CHEVALIER *et al.*, 1999). Notons également que le pH de nos broyats, compris entre 3,45 et 3,7, est fort éloigné du pH optimal de l'HCQE. Nous avons vu précédemment que l'activité de cette enzyme chutait de plus de 60 % en passant d'une valeur de pH de 6 à 4. Enfin, la présence de phénols substrats de la PPO et non de l'HCQE dans les broyats explique également la faible efficacité de cette dernière enzyme. Toutefois, chez la plupart des variétés d'abricots étudiées, l'acide chlorogénique et plus généralement les esters hydroxycinnamiques (esters d'acides caféique, coumarique et férulique) sont les phénols majoritaires (avec des teneurs oscillant entre 100 et  $400 \mu\text{g.g}^{-1}$  de matière sèche pour le seul acide chlorogénique). Cependant, les catéchines, épicatechines, la rutine, les flavan-3-ols et flavonols, non substrats de l'HCQE, sont également présents en quantités importantes chez l'abricot et ont un rôle non moins important dans le brunissement enzymatique (DIJKSTRA et WALKER, 1991 ; RADI *et al.*, 1997). Notons enfin que les fruits peuvent contenir des peroxydases qui sont également capables d'oxyder les acides phénols et les flavonoïdes en présence de peroxyde d'hydrogène (NICOLAS *et al.*, 1994). Selon RICHARD-FORGET *et al.* (1997) ces enzymes seraient également impliquées dans le brunissement enzymatique ; elles seraient donc susceptibles de limiter l'efficacité de l'HCQE.

En conclusion de ce paragraphe, nous constatons que notre extrait d'HCQE partiellement purifiée permet de retarder de quelques minutes le brunissement de broyats d'abricot. Il serait intéressant de réaliser les broyages sous anoxie afin de limiter l'oxydation enzymatique des phénols et de se rapprocher ainsi des conditions de nos milieux modèles. En outre, la sélection ou la modification génétique de souches d'*Aspergillus niger* pour leur production d'HCQE s'impose. L'emploi de cette enzyme en combinaison avec d'autres inhibiteurs du brunissement serait alors envisageable.

## CONCLUSION

L'objectif principal de notre travail était d'étudier les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition du brunissement enzymatique par deux extraits enzymatiques d'origine naturelle. Un approfondissement des connaissances dans ce domaine a pour but d'aider les technologues dans la recherche d'inhibiteurs naturels et non toxiques du brunissement, applicables sur des fruits et légumes frais et/ou transformés. A ce jour, l'emploi du sulfite et de ses dérivés apparaît comme la méthode la plus efficace de lutte contre le brunissement, mais aussi comme la plus controversée suite à la découverte de réactions allergiques liées à l'ingestion d'aliments traités. De fait, l'emploi de ces produits est sévèrement réglementé et, dans de nombreux cas, interdit. En conséquence, la mise au point de traitements chimiques ou physiques alternatifs à l'utilisation des sulfites constitue un axe de recherche en expansion dans le domaine de la technologie des produits végétaux.

L'analyse de la bibliographie nous a tout d'abord révélé qu'au cours de ces 10 dernières années les connaissances concernant la structure et la fonction des polyphénoloxydases se sont considérablement approfondies, grâce notamment aux techniques de biologie moléculaire. Ainsi a-t-on découvert l'existence de mécanismes de régulation *in vivo* de l'activité polyphénoloxydasique via des protéases. Une connaissance accrue de ces régulations ouvrirait des perspectives nouvelles dans la recherche d'inhibiteurs du brunissement. D'autre part, le bilan des différents types d'inhibiteurs chimiques que nous avons dressé permet de retirer 3 constats. Premièrement, l'efficacité de ces inhibiteurs paraît généralement peu satisfaisante, notamment lorsque ceux-ci sont appliqués sur des tissus végétaux vivants ou sur des broyats. Aussi préconise-t-on l'emploi de combinaisons de traitements. Deuxièmement, on constate que, parmi les quelques 70 types de substances inhibitrices répertoriées, seuls 17 additifs sont autorisés dans l'industrie agro-alimentaire, après être passés au crible des analyses toxicologiques. Le dernier constat est que les exigences des consommateurs concernant la qualité des produits alimentaires se sont accrues avec une préférence pour les produits « naturels ». Les travaux s'orientent donc à présent vers la recherche d'additifs naturels et plus particulièrement vers l'emploi d'extraits végétaux, élan dans lequel s'inscrit le présent travail.

Des travaux préliminaires à notre étude ont consisté en l'obtention d'extraits polyphénoloxydasiques partiellement purifiés et stables. Nous avons choisi diverses espèces végétales entrant dans notre alimentation tels que la scarole, le champignon de Paris, la pomme et l'abricot. Si les protocoles d'extraction et de purification des systèmes polyphénoloxydasiques des trois premiers produits végétaux ont été adaptés de travaux antérieurs (VAROQUAUX, 1978 ; JANOVTIZ-KLAPP, 1989 ; GOUPY *et al.*, 1994), nous avons mis au point le protocole nous permettant d'obtenir un extrait polyphénoloxydasique d'abricot. Cet extrait est obtenu en réalisant une extraction classique suivie d'une précipitation à 30 % de saturation en sulfate d'ammonium puis

d'une chromatographie d'interaction hydrophobe sur Phényl Sépharose CL-4B. L'extrait paraît alors stable durant 8 semaines lorsqu'il est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Dans le premier volet de nos travaux de recherche, nous avons étudié une préparation commerciale de papaine dont un fort effet anti-brunissement avait été remarqué sur des tranches de fruits. LUO *et al.* (1992) attribuaient cet effet aux protéases présentes dans l'extrait alors que RICHARD-FORGET *et al.* (1998) montraient la présence de composés piègeurs de quinones (la cystéine et le dipeptide acide glutamique-cystéine) et évoquaient également la présence de substances inactivant la polyphénoloxydase. Nous avons donc tout d'abord vérifié si la préparation de papaine exempte de protéase présentait ou non un effet anti-brunissement. A cette fin, la préparation commerciale a été solubilisée dans une solution tamponnée à pH 4,4 puis les composés ayant un poids moléculaire supérieur à  $1800 \text{ g.mole}^{-1}$  éliminés à l'aide d'une chromatographie d'exclusion sur Biogel P2. Le filtrat obtenu conservait une efficacité significative contre le brunissement de coupes de champignon et de pomme et avait une influence comparable à celle d'une solution de bisulfite de potassium à 10 mM lorsqu'il était employé dans des broyats de champignon, d'abricot ou de pomme. Ce même filtrat contenait également des composés capables d'inactiver les 4 systèmes polyphénoloxydasiques testés, celui de scarole étant le plus sensible des 4, avec une vitesse initiale d'inactivation 20 fois plus élevée que celle de la polyphénoloxydase d'abricot. L'extrait polyphénoloxydasique de scarole était alors choisi pour la suite de notre étude.

Dès lors, une purification des substances inactivatrices a été entreprise en reprenant la chromatographie d'exclusion sur Biogel P2 comme première étape. Une chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Séphadex A25 permet ensuite d'éliminer les composés piègeurs de quinones identifiés par RICHARD-FORGET *et al.* (1998). Suit une séparation par HPLC semi-préparative sur gel de silice non greffée, qui sera adaptée sur cartouche Sep Pak. L'analyse HPLC des échantillons obtenus révélera la présence d'un mélange de composés instables impossibles à isoler dans nos conditions opératoires. Ce mélange sera toutefois l'objet d'analyses structurales fines à savoir la spectrométrie Infra-Rouge (analyse réalisée au laboratoire de chimie de l'université d'Avignon), la résonance magnétique nucléaire (analyse réalisée par les laboratoires de recherche de ELF-Atochem) et la spectrométrie de masse en tandem couplée à l'HPLC (réalisée au laboratoire de xénobiotiques de l'INRA de Toulouse).

Le bilan de l'ensemble des résultats obtenus lors des analyses structurales des substances présentes dans nos échantillons a permis de proposer des structures susceptibles de correspondre à nos agents inactivateurs. Les échantillons contiennent en effet un mélange d'allyl phényl sulfonyl alcools dont les structures n'ont pas été clairement déterminées. Toutefois, ces composés se caractérisent par une estérification portant une chaîne aliphatique de 8 à 10 carbones. Ce type de

structure rappelle celle des dérivés de résorcinol identifiés dans les préparations de ficine. En outre, le méthyl sulfonyl acétophénone, un composé de synthèse dont la structure est proche de celles proposées, inactive de manière significative et partiellement réversible la PPO de scarole. Il nous est donc permis de supposer que les dérivés sulfonylés de nos échantillons sont capables d'inactiver la PPO et que leur efficacité est accrue avec le caractère hydrophobe de l'allyl estérifié, comme c'est le cas pour les dérivés de résorcinol. L'inactivation serait consécutive au piégeage des atomes de cuivre de la PPO et l'ajout de cuivre dans le milieu permet de retrouver une partie de l'activité PPO initiale. D'autre part, cette inactivation est d'autant plus importante que le pH est plus acide. Les dérivés sulfonylés sont des composés instables dans nos conditions opératoires, particulièrement en présence d'alcools, ce qui expliquerait les difficultés rencontrées au cours de la purification de nos agents inactivateurs.

D'autre part, le latex et le jus de papaye présentent également un faible pouvoir inactivateur. Il est cependant impossible d'affirmer si les dérivés sulfonylés sont naturellement présents dans la papaye ou s'ils sont les produits du procédé de fabrication de la préparation commerciale de papaine. Notons que les produits de dégradation de nos composés sont généralement toxiques et malodorants à l'instar de nombreux composés soufrés, ce qui rend peu envisageable l'emploi de tels composés sur les produits alimentaires.

Toutefois, il reste à vérifier si des produits de synthèse de type allyl phényl sulfonyl alcools sont capables d'inactiver les PPO. Si tel est le cas, il serait intéressant d'envisager l'utilisation de dérivés stables et inodores de ces composés.

Le second volet de notre étude a porté sur l'influence d'une enzyme, l'hydroxycinnamoylquinone estérase (HCQE) sur l'oxydation enzymatique de composés phénoliques. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse d'un phénol substrat de la PPO conduisant à la formation d'un acide phénol inhibiteur. Dans un premier temps, un extrait expérimental d'*Aspergillus niger* a été choisi comme source riche en HCQE parmi diverses préparations d'enzymes pectinolytiques à usage œnologique. Un protocole en 2 étapes chromatographiques classiques a été optimisé afin d'éliminer le glycérol présent dans l'extrait ainsi que les enzymes pectinolytiques. L'extrait est en effet riche en activités polygalacturonasiques et pectine méthylestérasiques capables de dégrader les parois pectocellulosiques des tissus végétaux, donc indésirables dans notre cas. La masse moléculaire apparente de l'HCQE, sujet à controverses, a été estimée, par électrophorèse dénaturante, à 42 kDa.

L'HCQE catalyse l'hydrolyse de l'acide chlorogénique, substrat naturel de la PPO présent en forte quantité chez de nombreux fruits et notamment chez l'abricot. Or nous avons montré que l'acide caféique, produit de l'hydrolyse de l'acide chlorogénique, est capable d'inhiber la PPO

d'abricot, du fait de sa forte affinité pour cette enzyme et de son faible caractère oxydable. Après avoir vérifié cette inhibition, notre étude s'est orientée vers l'établissement d'une modélisation mathématique permettant de prévoir les quantités d'HCQE nécessaires pour inhiber une quantité donnée de PPO d'abricot dans un milieu réactionnel donné. La caractérisation des paramètres cinétiques des deux systèmes enzymatiques dans une gamme de pH compris entre 4 et 7, a permis d'établir une modélisation des réactions se produisant dans un milieu contenant l'HCQE, la polyphénoloxydase et de l'acide chlorogénique. Il s'est avéré que les équations de vitesse de consommation d'acide chlorogénique et d'acide caféique établies permettaient effectivement de prévoir l'évolution de la quantité de ces deux phénols dans un milieu d'incubation expérimental choisi. Les calculs révèlent cependant que seule une pré-incubation des phénols avec un extrait d'HCQE 144 à 382 fois plus concentré que le notre permettrait d'inhiber 50 % de l'activité polyphénoloxydasique extraite d'abricot dans nos conditions expérimentales.

Nous avons testé en parallèle l'efficacité de notre extrait d'HCQE sur des broyats d'abricot. Cependant le brunissement du broyat traité par l'HCQE n'est retardé que de quelques minutes. Les principales causes de cette faible efficacité sont la faible activité de l'extrait HCQE employé, la forte acidité du broyat et sa forte activité polyphénoloxydasique, la variété des composés phénoliques oxydables présents dans l'abricot ainsi que la présence d'autres systèmes enzymatiques dont les peroxydases qui sont capables de consommer l'acide caféique. La réalisation d'un broyage sous anoxie, classiquement employé pour les purées, associé à un tel traitement enzymatique et en présence d'acide ascorbique par exemple pourrait augmenter l'inhibition du brunissement de manière significative.

Les travaux ultérieurs devraient s'intéresser à l'influence de l'HCQE sur l'évolution de la couleur de solutions modèles et de broyats, sachant que l'oxydation de l'acide caféique conduit également à des produits colorés. Il serait également indispensable d'étudier l'influence de l'HCQE sur l'oxydation enzymatique d'extraits phénoliques d'abricot et de s'intéresser à l'effet de la présence de peroxydase. En outre, il serait important de vérifier si l'application de tels extraits enzymatiques modifie ou non les qualités organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment traité.

A l'issue de ce travail, nous estimons avoir atteint certains de nos objectifs. En effet, certaines hypothèses ont été proposées concernant la nature des substances inactivant la PPO et présentes dans une préparation commerciale de papaine. Si leur structure détaillée reste à être précisée, il semble d'ores et déjà que ces substances soient produites au cours des opérations de séchage du latex de papaye. L'étude d'analogues de synthèse serait d'autant plus intéressante que les substances de la préparation enzymatique paraissent très efficaces contre le brunissement. D'autre part, l'HCQE a été

partiellement purifiée puis caractérisée et un modèle mathématique permettant d'évaluer son efficacité dans des conditions expérimentales choisies a été établi. Il est apparu que si l'HCQE est effectivement un candidat valable pour prévenir le brunissement de broyats ou de jus, son efficacité était principalement limitée par la faible activité de nos extraits. La sélection et/ou la modification génétique de souches d'*Aspergillus niger* produisant des extraits fortement enrichis en activité HCQE exempts d'activités pectinolytiques permettrait d'obtenir d'intéressants résultats concernant l'inhibition de l'oxydation des phénols. Des études complémentaires devraient s'attacher à étudier l'effet de l'HCQE dans des milieux plus complexes contenant un extrait total de phénol et/ou la peroxydase.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBISU I., KING R.D., KOZLOV I.A., 1989. Inhibition of the catecholase activity of mushroom tyrosinase by carbon monoxide. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 775-776.
- ALLAN A.C., WALKER J.R.L., 1988. The selective inhibition of catechol oxidases by salicylhydroxamic acid. *Phytochemistry*, **27**, 3075-3076.
- ALMEIDA M.E., NOGUEIRA J.N., 1995. The control of polyphenol oxidase activity in fruits and vegetables. A study of the interactions between the chemical compounds used and heat treatment. *Food Sci. Technol. Abstracts*, **27**, 11 J 1, 147.
- AMIOT M.J., TACHINI M., AUBERT S., NICOLAS J., 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.*, **57**, 958-962.
- AMIOT M.J., FLEURIET A., CHEYNIER V., NICOLAS J., 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In : *Phytochemistry of fruit and vegetables*. TOMAS-BARBERAN F.A., ROBINS R.J., Eds, Clarendon Press, Oxford, 51-85.
- ANDERSON D.W., NICHOLSON R.L., 1996. Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia*, **88**, 996-1002.
- ANDRAWIS A., KAHN V., 1990. Ability of various chemicals to reduce copper and to inactivate mushroom tyrosinase. *J. Food Biochem.*, **14**, 103-115.
- AZARKAN M., AMRANI A., NIJS M., VANDERMEERS A., ZERHOUNI S., SMOLDERS N., LOOZE Y., 1997. *Carica papaya* latex is a rich source of a class II chitinase. *Phytochemistry*, **46**, 1319-1325.
- BACHEM C.W.B., SPECKMANN G., VAN DER LINDE P.C.G., VERHEGGEN F.T.M., HUNT M., STEFFENS J.C., ZABEAU M., 1994. Antisens Expression of Polyphenol Oxidase Genes Inhibits Enzymatic Browning in Potato Tubers. *Bio/Biotechnol.*, **12**, 1101-1105.
- BALDWIN E.A., NISPEROS M.O., CHEN X., HAGENMAIER R.D., 1996. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biol. Technol.*, **9**, 151-163.
- BALLS A.K., HALE W.S., 1935. Process for inhibiting the discoloration of fruits and vegetables. U.S. Patent, 2,011,465.
- BATTAINI G., MONZANI E., CASELLA L., SANTAGOSTINI L., PAGLIARIN R., 2000. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complex by kojic acid. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 262-268.
- BAUD P., COURTOT C., FROMAGEOT C., LICHTENBERGER J., PREVOST C., SENDERENS J.B., 1949. Sulfones. In : *Traité de Chimie Organique*. GRIGNARD V., BAUD P., Eds, MASSON et Cie., Paris, tome IV, 223-229.
- BEAULIEU M., BELIVEAU M., D'APRANO G., LACROIX M., 1999. Dose rate effect of  $\gamma$  irradiation on phenolic compounds, polyphenoloxidase, and browning of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2537-2543.

- BENNION M., 1990. Enzymatic oxidative browning. In : *Introductory Foods*, MAC MILLAN Publishing Compagny, New York, 168.
- BEN-SHALOM N., KAHN V., HAREL E., MAYER A.M., 1977. Olive catechol oxidase – Changes during development. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 545-550.
- BILLAUD C., REGAUDIE E., FAYAD N., RICHARD-FORGET F., NICOLAS J., 1995. Effect of cyclodextrins on polyphenol oxidation catalyzed by apple polyphenol oxidase. In *Enzymatic Browning and its prevention* ; LEE C.Y., WHITAKER J.R., Eds., American Chemical Society, Washington D.C., 295-312.
- BILLAUD C., LECORNU D., NICOLAS J., 1996. Substrates and carboxylic acid inhibitors of a partially purified polyphenol oxidase from gum arabic. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1668-1675.
- BOSS P.K., GARDNER R.C., JANSSEN B.J., ROSS G.S., 1995. An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 429-433.
- BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, **72**, 248-254.
- BROCKLEHURST K., BAINES B.S., KIERSTAN M.P.J., 1981. Papain and other constituents of *Carica Papaya L.* In : *Topics in enzyme and fermentation biotechnology*, WISEMAN A., Ed., Ellis Horwood INC, London, Chap. 5, 262-335.
- BUTA J.G., MOLINE H.E., SPAULDING D.W., WANG C.Y., 1999. Extending storage life of fresh-cut apples using natural products and their derivatives. *J. Agric Food Chem.*, **47**, 1-6.
- CARO Y., VILLENEUVE P., PINA M., REYNES M., GRAILLE J., 2000. Lipase activity and fatty acid typoselectivities of plant extracts in hydrolysis and interesterification. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **77**, 2000.
- CARY J.W., LAX A.R., FLURKEY W.H., 1992. Cloning and characterization of a cDNA coding for *Vicia faba* polyphenoloxidase. *Plant Mol. Biol.*, **20**, 245-253.
- CASTANER M., GIL M.I., ARTES F., TOMAS-BARBERAN F.A., 1996. Inhibition of browning of harvested head Lettuce. *J. Food Sci.*, **61**, 314-316.
- CHAN H.T., CAVALETTO C.G., 1982. Aseptically packaged papaya and guava purée. Changes in chemical and sensory quality during processing and storage. *J. Food Sci.*, **47**, 1164-1169.
- CHAZARRA S., CABANES J., ESCRIBANO J., GARCIA-CARMONA F., 1996. Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa L.*), *J. Agric Food Chem.*, **44**, 984-988.
- CHEFTEL J.C., 1992. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents : an overview. In : *High pressure and biotechnology*, BALNY C., HAYASHI R., HEREMANS K., MASSON P., Eds, John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge, 195-209.

- CHEN L., MEHTA A., BERENBAUM M., ZANGERL A.R., ENGESETH N.J., 2000. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruits and vegetables homogenates. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4997-5000.
- CHEVALIER T., de RIGAL D., MBEGUIER-A-MBEGUIER D., GAUILLARD F., RICHARD-FORGET F., FILS-LYCAON B.R., 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenoloxidase. *Plant Physiol.*, **119**, 1261-1269.
- CHEYNIER V.F., TROUSDALE E.K., SINGLETON V.L., SALGUES M.J., WILDE R., 1986. Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 217-221.
- CLIFFORD M.N., 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 362-372.
- CONRAD J.S., DAWSON S.R., HUBBARD E.R., MEYERS T.E., STROTHKAMP K.G., 1994. Inhibitor binding to the binuclear active site of tyrosinase : temperature, pH, and solvent deuterium isotope effects. *Biochemistry*, **33**, 5739-5744.
- DAWLEY R.M., FLURKEY W.H., 1993a. Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexylresorcinol, a tyrosinase inhibitor. *Phytochemistry*, **33**, 281-284.
- DAWLEY R.M., FLURKEY W.H., 1993b. 4-hexylresorcinol, a potent inhibitor of mushroom tyrosinase, *J. Food Sci.*, **58**, 609-610.
- DECKER H., TERWILLIGER N., 2000. Cops and robbers : putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *J. Exp. Biol.*, **203**, 1777-1782.
- DEHOVE R.A., SOROSTE A., YEDIKARDACHIAN C., 1998. Additifs et auxiliaires technologiques, arômes et nouveaux ingrédients. In : Lamy Dehove Réglementation des produits, qualité, répression des fraudes, LAMY S.A., Ed., Paris, tome 1, 254-52.
- DELLA LONGA S., ASCONE I., BIANCONI A., BONFIGLI A., CASTELLANO A. C., ZARIVI O., MIRANDA M., 1996. The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21025-21030.
- DE LOS ANGELOS SERRADELL M., ROZENFELD P.A., MARTINEZ G.A., CIVELLO P.M., CHAVES A.R., ANON M.C., 2000. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva) : characterisation and partial purification. *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1421-1427.
- DEVECE C., RODRIGUEZ-LOPEZ J.N., FENOLL L.G., TUDELA J., CATALA J.M., DE LOS REYES E., GARCIA-CANOVAS F., 1999. Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications : comparison of microwaves, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4506-4511.
- DIAZ O., FERNANDEZ M., GARCIA DE FERNANDO G.D., DE LA HOZ L., ORDONEZ J.A., 1996. Effect of the addition of papain on the dry fermented sausage proteolysis. *J. Sci. Food Agric.*, **71**, 13-21.

- DIJKSTRA L., WALKER J.R.L., 1991. Enzymatic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric.*, **54**, 229-234.
- DINGLE J., REID W.W., SOLOMONS G.L., 1953. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides II-Application of the 'cup plate' assay to the estimation of enzymes. *J. Sci. Food Agric.*, **4**, 149-155.
- DRY I.B., ROBINSON S.P., 1994. Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenoloxidase. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 495-502.
- DUCKWORTH H.W., COLEMAN S.E., 1970. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 1613-1625.
- DUDLEY E.D., HOTCHKISS J.H., 1989. Cysteine as an inhibitor of polyphenol oxidase. *J. Food Biochem.*, **13**, 65-75.
- EICKEN C., KREBS B., SACCHETTINI J.C., 1999. Catechol oxidase – structure and activity. *Current Op. Structural Biol.*, **9**, 677-683.
- ELLMAN G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
- ESPIN J.C., MORALES M., VARON R., TUDELA J., GARCIA-CANOVAS F., 1995. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from verdedoncella apple. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2807-2812.
- ESPIN J.C., TRUJANO M.F., TUDELA J., GARCIA-CANOVAS F., 1997. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Haas avocado. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1091-1096.
- ESPIN N., ISLAM M.N., 1998. Stabilization of papain from papaya cells. *Food Sci. Technol. Int.*, **4**, 179-187.
- ESPIN J.C., JOLIVET S., WICHERS H.J., 1999a. Kinetic study of the oxidation of  $\gamma$ -glutamyl-4-hydroxybenzene catalyzed by mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3495-3502.
- ESPIN J.C., VAN LEEUWEN J., WICHERS H., 1999b. Kinetic study of the Activation Process of a Latent Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase by Serine Proteases. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3509-3517.
- ESPIN J.C., WICHERS H.J., 1999. Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3503-3508.
- ESPIN J.C., VELTMAN R.H., WICHERS H.J., 2000. The oxidation of L-ascorbic acid catalysed by pear tyrosinase. *Physiol. Plant.*, **109**, 1-6.
- FARNET A.M., TAGGER S., LE PETIT J., 1999. Effects of copper and aromatic inducers on the laccases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*. *Life Sciences*, **322**, 499-503.

- FAYAD N., MARCHAL L., BILLAUD C., NICOLAS J., 1997. Comparison of  $\beta$ -cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenol oxidase from different sources. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2442-2446.
- FAYAD-EL DAHOUK N., 1998. Etude de traitements alternatifs à l'utilisation du sulfite comme moyen de prévention du brunissement enzymatique. Thèse Doct., Université de Paris VII, 170p.
- FDA, 1996. Chemical preservatives, Food and Drug Administration. Code of federal Regulations, Title 21, Part 182. Washington D.C., USA, The office of Federal Register.
- FERNANDEZ E., SANCHEZ-AMAT A., SOLANO F., 1999. Location and catalytic characteristics of a multipotent bacterial polyphenol oxidase. *Pigment Cell. Res.*, **12**, 331-339.
- FERRAR P.H., WALKER J.R.L., 1996. Inhibition of diphenol oxidases: a comparative study. *J. Food Biochem.*, **20**, 15-30.
- FERRAR P.H., WALKER J.R.L., 1999. Microorganisms as potential sources of novel diphenol oxidase inhibitors. *J. Food Biochem.*, **23**, 1-15.
- FINKLE B.J., NELSON R.F., 1963. Enzyme reactions with phenolic compounds : effect of *o*-methyl transferase on a natural substrate of fruit polyphenol oxidase. *Nature*, **197**, 902.
- FLATH R.A., FORREY R.R., 1977. Volatile components of papaya (*Carica papaya* L., Solo Variety). *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 103-109.
- FLURKEY W.H., 1986. Polyphenoloxidase in high plants-immunological detection and analysis of *in vitro* translation products. *Plant Physiol.*, **81**, 614-618.
- FLURKEY W.H., 1991. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J. Food Sci.*, **56**, 93-95.
- FORGET-RICHARD F., 1992. Recherches sur le brunissement enzymatique. Etudes sur l'oxydation de phénols et sur l'inhibition de la polyphénoloxydase isolée de la pomme (*Malus sylvestris*, var. Red delicious). Thèse Doct., Université de Paris VII, 278p.
- FRAIGNIER M.P., MARQUES L., FLEURIET A., MACHEIX J.J., 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2376-2380.
- FRIEDMAN M., BAUTISTA F.F., 1995. Inhibition of polyphenol oxidase by thiols in the absence and presence of potato tissue suspensions. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 69-76.
- FRIEDMAN M., 1996. Food browning and its prevention : an overview. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 631-653.
- FUCHS C.T., SPITELLER G., 1997. 4-pentadecylpyridine : a competitive polyphenoloxidase inhibitor. *Z. Naturforsch.*, **52c**, 761-765.

- FUJITA S., TONO T., KAWAHARA H., 1991. Purification and properties of polyphenol oxidase in head lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Sci. Food Agric.*, **55**, 643-651.
- FUJITA S., bin SAARI N., MAEGAWA M., TETSUKA T., HAYASHI N., TONO T., 1995. Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1138-1142.
- GAUILLARD F., RICHARD-FORGET F., 1997. Polyphenoloxidases from Williams Pear (*Pyrus communis* L, cv Williams): Activation, Purification and some properties. *J. Sci. Food Agric.*, **74**, 49-56.
- GENTILE A., FERRARIS L., MATTA A., 1988. Variations of phenol oxidase activities as a consequence of stresses that induce resistance to Fusarium wilt of tomato. *J. Phytopathol.*, **122**, 45-53.
- GERRISTEN Y.A.M., CHAPELON C.G.J., WICHERS H.J., 1994. The low-isoelectric point tyrosinase of *Agaricus bisporus* may be a glycoprotein. *Phytochemistry*, **35**, 573-577.
- GIORDANI R., SIEPIAO M., MOULIN-TRAFFORD J., REGLI P., 1991. Antifungal action of *Carica papaya* latex : isolation of fungal cell wall hydrolysing enzymes. *Mycoses*, **34**, 469-477.
- GOETGHEBEUR M., KERMASHA S., 1996. Inhibition of polyphenol oxidase by copper-metallothionein from *Aspergillus niger*. *Phytochemistry*, **42**, 935-940.
- GOLAN-GOLDHIRSH A., WHITAKER J.R., 1984a. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1003-1009.
- GOLAN-GOLDHIRSH A., WHITAKER J.R., 1984b. Relation between structure of polyphenol oxidase and prevention of browning. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **177**, 437-456.
- GOLDBECK J.H., CAMMARATA K.V., 1981. Spinach thylakoid polyphenoloxidase. Isolation, activation and properties of native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.*, **67**, 977-984.
- GOODENOUGH P.W., 1978. The o-diphenol oxygen oxidoreductase of *agaricus bisporus* : activity and multiple forms during ageing. *Phytochemistry*, **17**, 633.
- GOODENOUGH P.W., KESSELL S., LEA A.G.H., LOEFFLER T., 1983. Mono- and diphenolase activity from fruit of *Malus pumila*. *Phytochemistry*, **22**, 359-363.
- GOUPY P., 1989. Le brunissement enzymatique de la scarole (*Cichorium endivia* L.) : composés phénoliques et enzymes d'oxydation des feuilles chlorophylliennes et étiolées. Thèse Doct., Université des Sciences et techniques du Languedoc, Montpellier II, 211p.
- GOUPY P., MACHEIX J.J., NICOLAS J., VAROQUAUX P., 1994. Partial purification and characterization of endive (*Cichorium endivia* L.) polyphenoloxidase. *Sci. Alim.*, **14**, 751-762.
- HAREL E., MAYER A. M. , SHAIN Y., 1965. Purification and multiplicity of catechol oxidase from apple chloroplasts, *Phytochemistry*, **4**, 783-790.

- HAREL E., MAYER A.M., LERNER H.R., 1970. Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 542-544.
- HEALEY D.F., STROTHKAMP K.G., 1981. Inhibition of catecholase and cresolase activity of mushroom tyrosinase by azide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **221**, 86-91.
- HEIMDAL H., LARSEN L.M., POLL L., 1994. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa*). *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1428-1433.
- HERNANDEZ A., CANO M.P., 1998. High-pressure and temperature effects on enzyme inactivation in tomato puree. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 266-270.
- HICKS K.B., SAPERS G.M., SEIB P.A., 1990. Process for preserving raw fruit and vegetables juices using cyclodextrins and compositions thereof. U.S. Patent 4,975,293.
- HO K., 1999. Characterization of polyphenol oxidase from aerial roots of an orchid, Aranda « Christine 130 ». *Plant Physiol. Biochem.*, **37**, 841-848.
- HUNT M.D., EANNETTA N.T., YU H., NEWMANN S.M., STEFFENS J.C., 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.*, **21**, 59-68.
- INGEBRIGTSEN J., FLURKEY W.H., 1988. Affinity and hydrophobic chromatography of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry*, **27**, 1593-1599.
- INGEBRIGTSEN J., KANG B., FLURKEY W.H., 1989. Tyrosinase activity and isoenzymes in developing mushrooms. *J. Food Sci.*, **54**, 128-131.
- IYENGAR R., MAC EVILY A.J., 1992. Anti-browning agents : alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends Food Sci. Technol.*, **3**, 60-64.
- JANOVITZ-KLAPP A.H., 1989. Etude sur le système polyphénoloxydasique isolé de la pomme. Thèse Doct., Université de Paris VII, 208p.
- JANOVITZ-KLAPP A.H., RICHARD F.C., NICOLAS J.J., 1989. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*, **28**, 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.
- JANOVITZ-KLAPP A.H., RICHARD F.C., GOUPY P., NICOLAS J.J., 1990b. Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric Food Chem.*, **38**, 1437-1442.
- JAYARAMAN K.S., RAMANUJA M.N., VIJAYARAGHAVAN P.K., VAIDYANATHAN C.S., 1987. Studies on the purification of banana polyphenoloxidase. *Food Chem.*, **24**, 203-217.
- JIANG Y., FU J., ZAUBERMAN G., FUCHS Y., 1999. Purification of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 950-954.

- KAHN V., 1977. Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning. *J. Sci. Food Agric.*, **28**, 233-239.
- KAHN V., 1985. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on *o*-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana. *J. Food Sci.*, **50**, 111-114.
- 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 *o*-dihydroxyphenols by mushroom tyrosinase. *J. Food Biochem.*, **18**, 253-271.
- KAHN V., BEN-SHALOM N., ZAKIN V., 1999. Effect of benzenesulfinic acid on the oxidation of *o*-dihydroxy- and trihydroxyphenols by mushroom tyrosinase. *J. Food Biochem.*, **23**, 263-281.
- KELLY S.H., FINKLE B.J., 1969. Action of a ring-cleaving oxygenase in preventing oxidative darkening of apple juice. *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 69.
- KERMASHA S., GOETHEBEUR M., MONFETTE A., 1993. Studies of mushroom polyphenol oxidase using chlorogenic acid as substrate. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 526-531.
- KING R.S., FLURKEY W.H., 1987. Effects of limited proteolysis on broad bean polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.*, **41**, 231-240.
- KLABUNDE T., EICKEN C., SACCHETTINI J.C., KREBS B., 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biol.*, **5**, 1084-1090.
- KLAHORST S.J., 1998. New technologies : Enzymes : valuable assets. In : Food Product Design, Weeks Publishing Co., september, 93-100.
- KOUSSEVITZKY S., NE'EMAN E., SOMMER A., STEFFENS J.C., HAREL E., 1999. Purification and properties of a novel chloroplast stromal peptidase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 27064-27069.
- KUBO I., KINST-HORI I., 1998a. Tyrosinase inhibitors from cumin. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5338-5341.
- KUBO I., KINST-HORI I., 1998b. Tyrosinase inhibitors from anise oil. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1268-1271.
- KUBO I., KINST-HORI I., 1998c. 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde : a potent tyrosinase inhibitor from african medicinal plants. *Planta Medica*, **65**, 19-22.
- KUBO I., KINST-HORI I., 1999a. Tyrosinase inhibitory activity of the olive oil flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4574-4578.
- KUBO I., KINST-HORI I., 1999b. Flavonols from saffron flower : tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4121-4125.
- KUBO I., KINST-HORI I., KUBO Y., YAMAGIWA Y., KAMIKAWA T., HARAGUCHI H., 2000. Molecular design of antibrowning agents. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1393-1399.

- KUCZYNSKI A., VAROQUAUX P., VAROQUAUX F., 1992. Reflectometric method to measure the initial colour and the browning rate of white peach pulps. *Sci. Alim.*, **12**, 213-221.
- KUWABARA T., KATOH Y., 1999. Involvement of the Binuclear Copper Site in the Proteolytic Activity of Polyphenol Oxidase. *Plant Cell Physiol.*, **40**, 1029-1035.
- LABUZA T.P., LILLEMO J.H., TAOUKIS P.S., 1990. Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes « killer enzymes ». In : Proceedings XX<sup>th</sup> Symposium of international federation of fruit juice producers, Paris, 1-15.
- LABUZA T.P., 1992. Die hemmung von polyphenoloxidasen durch proteolytische enzyme. *Flüssiges Obst*, **59**, 15-20.
- LANCIOTTI R., CORBO M.R., GARDINI F., SINIGAGLIA M., GUERZONI M.E., 1999. Effect of hexanal on the shelf life of fresh apple slices. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4769-4776.
- LAVOLLAY J., LEGRAND G., LEHONGRE G., NEUMANN J., 1975. Sur l'ortho hydroxylation du phénol et du *p*-crésol par des tyrosinases en présence d'acide ascorbique. *Physiol. Végét.*, **13**, 667-676.
- LAX A.R., VAUGHN K.C., 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.*, **96**, 26-31.
- LEGER R.J., JOSHI L., ROBERTS D.W., 1997. Adaptation of proteases and carbohydrates of saprophytic, phytopathogenic ad entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*, **143**, 1983-1992.
- LEWIS J.C., THOMPSON P.A., 1961. Microbial production of chlorogenicase. *Appl. Microbiol.*, **4**, 205-208.
- LICHTER A., DVIR O., ROT I., AKERMAN M., REGEV R., WIESBLUM A., FALLIK E., ZAUBERMAN G., FUCHS Y., 2000. Hot water brushing : an alternative method to SO<sub>2</sub> fumigation for color retention of litchi fruits. *Postharvest Biol. Technol.*, **18**, 235-244.
- LIKHITWITAYAWUID K., SRITULARAK B., DE-EKNAMKUL W., 2000. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus gomezianus*. *Planta Med.*, **66**, 275-276.
- LOPEZ-MALO A., PALOU E., BARBOSA-CANOVAS G.V., WELTI-CHANES J., SWANSON B.G., 1998. Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Res. Int.*, **31**, 549-556.
- LOZANO J.E., DRUDIS-BISCARRI R., IBARZ-RIBAS A., 1994. Enzymatic browning in apple pulps. *J. Food Sci.*, **53**, 564-567.
- LOZANO-DE-GONZALES P.G., BARRET D.M., WROLSTAD R.E., DURST R.W., 1993. Enzymatic browning inhibited in fresh and dried apple rings by pineapple juice. *J. Food Sci.*, **58**, 399-404.

- LUO Y., PATTERSON M.E., SWANSON B.G., 1992. Scanning electron microscopy structure and firmness of papain treated apple slices. *Food Structure*, **11**, 333-338.
- LUO Y., BARBOSA-CANOVAS G.V., 1994. Inhibition of apple-slice browning by 4-hexylresorcinol. In : *Enzymatic Browning and its Prevention*, LEE C.Y., WHITAKER J.R. Eds., Amer. Chem. Soc., Washington D.C., chap 19, 240-250.
- MAC CORD J.D., KILARA A., 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Food Sci.*, **48**, 1479-1483.
- MAC EVILY A.J., IYENGAR R., GROSS A.T., 1991. Composition and methods for inhibiting browning in food using resorcinol derivatives. US Patent 5,509,438.
- MAC EVILY A.J., IYENGAR R., GROSS A.T., 1992a. Inhibition of polyphenol oxidase by phenolic compounds. In : *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I*, HO C. T., LEE C.Y., HUANG M.T., Eds, Amer. Chem. Soc., Washington D.C., 25, 318-325.
- MAC EVILY A.J., IYENGAR R., OTWELL, S., 1992b. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *C.R.C. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**, 253-273.
- MACHEIX J.J., 1970. Rôle de divers facteurs intervenant dans le brunissement enzymatique des pommes pendant la croissance. *Physiol. Végét.*, **8**, 585-602.
- MADANI W., KERMASHA S., GOETGHEBEUR M., TSE M., 1997. Partial purification and characterization of a polyphenol esterase from *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, **32**, 61-69.
- MADANI W., KERMASHA S., BISAKOWSKI B., 1999a. Inhibition of tyrosinase activity by a polyphenol esterase using selected phenolic substrates. *Phytochemistry*, **52**, 1001-1008.
- MADANI W., KERMASHA S., VERSARI A., 1999b. Characterization of tyrosinase- and polyphenol esterase-catalysed end products using selected phenolic substrates. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2486-2490.
- MARBACH I., MAYER A.M., 1975. Changes in catechol oxidase and permeability to water of seed coats of *Pisum elatius* during seed development and maturation. *Plant Physiol.*, **56**, 93-96.
- MARKAKIS P., EMBS R.J., 1996. Effect of sulphite and ascorbic acid on mushroom phenol oxidase. *J. Food Sci.*, **31**, 807-811.
- MARQUES L., FLEURIET A., CLEYET-MAREL J.C., MACHEIX J.J., 1994. Purification of an apple polyphenoloxidase isoform resistant to SDS-proteinase K digestion. *Phytochemistry*, **36**, 1117-1121.
- MARQUES L., FLEURIET A., MACHEIX J.J., 1995a. Fruit polyphenoloxidases : New data on an old problem. In : *Enzymatic browning and its prevention*. LEE C.Y., WHITAKER J.R., Eds, Amer. Chem. Soc., Washington D.C., Chap. 7, 90-102.
- MARQUES L., FLEURIET A., MACHEIX J.J., 1995b. Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Biochemistry.*, **33**, 193-200.

- MARTINEZ J. H., SOLANO F., PENAFIEL R., GALINDO J.D., IBORRA J.L., LOZANO J.A., 1986. Comparative study of tyrosinases from different sources: relationship between halide inhibition and the enzyme active site. *Comp. Biochem. Physiol.*, **83B**, 633-636.
- MARTINEZ V.M., WHITAKER J.R., 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 195-200.
- MATHEW A.M., PARPIA H.A.B., 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Adv. Food Res.*, **19**, 75-145.
- MATSER A.M., KNOTT E.R., TEUNISSEN P.G.M., BARTELS P.V., 2000. Effects of high isostatic pressure on mushrooms. *J. Food Eng.*, **45**, 11-16.
- MAYER A.M., HAREL E., 1991. Phenoloxidases and their significances in fruit and vegetables. In : Food enzymology. FOX P.F., Ed, Elsevier Appl. Sci., London, chap.9, 373-398.
- MENON S., FLECK R.W., YONG G., STROTHKAMP K.G., 1990. Benzoic acid inhibition of the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  isoenzymes of agaricus bisporus tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **280**, 27-32.
- MOLINE H.E., BUTA J.G., NEWMAN I.M., 1999. Prevention of browning of banana slices using natural products and their derivatives. *J. Food Quality*, **22**, 499-511.
- MOLNAR-PERL I., FRIEDMAN M., 1990a. Inhibition of browning by sulfur amino acids. 3. Apples and potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1652-1656.
- MOLNAR-PERL I., FRIEDMAN M., 1990b. Inhibition of browning by sulfur amino acids. 2. Fruit juices and protein-containing foods. *J. Agric Food Chem.*, **38**, 1648-1651.
- MONSALVE-GONZALEZ A., BARBOSA-CANOVAS G.V., CAVALIERI R.P., Mc EVILY A.J., IYENGAR R., 1993. Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-hexylresorcinol as anti-browning agent. *J. Food Sci.*, **58**, 797-800.
- MONSALVE-GONZALEZ A., BARBOSA-CANOVAS G.V., Mc EVILY A.J., IYENGAR R., 1995. Inhibition of enzymatic browning in apple products by 4-hexylresorcinol. *Food Technol.*, **49**, 110-118.
- MOORE B.M., FLURKEY W.H., 1988. Mini-chromatofocusing of plant and fungal polyphenoloxidases. *Anal. Biochem.*, **172**, 504-508.
- MOORE B.M., FLURKEY W.H., 1990. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4982-4990.
- MOORE B.M., KANG B., FLURKEY W.H., 1988. Histochemical and immunochemical localization of tyrosinase in whole tissue sections of mushrooms. *Phytochemistry*, **27**, 3735-3737.
- MURATA M., 1997. Apple polyphenol oxidase and enzymatic browning. *Recent Res. Devel. Agric. Biol. Chem.*, **1**, 15-23.

- MURATA M., TSURUTANI M., HAGIWARA S., HOMMA S., 1997. Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1495-1499.
- NAISH-BYFIELD S., COOKSEY C.J., RILEY P.A., 1994. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase : effect of dithiothreitol on kinetics. *Biochem. J.*, **304**, 155-162.
- NAPPI A.J., VASS E., 1994. Chromatographic analyses of the effects of glutathione, cysteine and ascorbic acid on the monophenol and diphenol oxidase activities of tyrosinase. *J. Liquid Chromato.*, **17**, 793-815.
- NELSON R.M., MASON H.S., 1971. Tyrosinase (Mushroom). In : *Methods in Enzymology*, TABOR H., TABOR C.H., Eds, Acad. Press, New York, Vol XVIIIA, chap 79, 626-632.
- NGUYEN-THE C., 1985. Pourritures des pêches en conservation par *Rhizopus stolonifer* : étude de l'implication des enzymes de dégradation des parois cellulaires dans le pouvoir pathogène. Thèse Doct., Institut national agronomique de Paris-Grignon, 152p.
- 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. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **34**, 109-157.
- NOZUE M., ARAKAWA D., IWATA Y., SHIOIRI H., KOJIMA M., 1999. Activation by proteolysis *in vivo* of 60-ku latent polyphenol oxidases in sweet potato cells in suspension culture. *J. Plant Physiol.*, **155**, 297-301.
- OKAMURA S., WATANABE M., 1981. Properties and application to wine making of hydroxycinnamic acid ester hydrolase from *Aspergillus japonicus*. *Nippon Nôgeikagaku Kaishi*, **55**, 1099-1107.
- ONSA G.H., BIN SAARI N., SELAMAT J., BKAR J., 2000. Latent polyphenol oxidases from sago log (metroxylon sago) : partial purification, activation, and some properties. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5041-5045.
- OSZMIANSKI J., LEE C.Y., 1990. Inhibition of polyphenoloxidase activity and browning by honey. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1892-1895.
- OTWELL W.S., IYENGAR R., MAC EVILY A.J., 1992. Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexylresorcinol. *J. Aquatic Food Product Technol.*, **1**, 53-65.
- PALMER J.K., ROBERTS J.B., 1967. Inhibition of banana polyphenoloxidase by 2-mercaptobenzothiazole. *Science*, **157**, 200-201.
- PARTINGTON J.C., SMITH C., BOLWELL G.P., 1999. Changes in the location of polyphenol oxidase in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber during cell death in response to impact injury : comparison with wound tissue. *Planta*, **207**, 449-460.
- PERRY C.R., MATCHAM S.E., WOOD D.A., THURSTON C.F., 1993. The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *J. General Microbiol.*, **139**, 171-178.

- PIERPOINT W.S., 1966. The enzymatic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochem. J.*, **98**, 567-580.
- PIHLAJA K., OVCHARENKO V., ZAKRZEWSKI A., GAWINECKI R., 2000. Electron impact induced fragmentation of (p-substituted phenyl)-(4'-methylphenacyl) sulfones : contribution of sulfinate ester rearrangements. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 1674-1676.
- PIRETTI M., SERRAZANETTI G.P., PAGLIONE G., 1977. The enzymatic oxidation of (+)-catechin in the presence of sodium benzenesulphinate. *Annal. Chimica*, **67**, 395-406.
- de POIX A., ROUET-MAYER M.A., PHILIPPON J., 1980. Action combinée des chlorures et de l'acide ascorbique sur l'inhibition des brunissements enzymatiques d'un broyat de pommes. *Lebensm. -Wiss. -Technol.*, **14**, 105-110.
- POMA A., PACIONI G., COLAFARINA S., MIRANDA M., 1999. Effect of tyrosinase inhibitors on *Tuber borchii* mycelium growth in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, **180**, 69-75.
- POULTER N.H., CAYGILL J.C., 1985. Production and utilization of papain- a proteolytic enzyme from *Carica papaya* L. *Trop. Sci.*, **25**, 123-137.
- PRABHA T.N., PATWARDHAN M.V., 1986. Polyphenol oxidase and peroxidase activities and their isoenzyme patterns in ripening fruits. *Acta Aliment.*, **15**, 199-207.
- RADI M., MARHOUZ M., JAOUAD A., TACCHINI M., AUBERT S., HUGUES M., AMIOT M.J., 1997. Phenolic composition, browning susceptibility and carotenoid content of various apricot varieties at maturity. *Hortscience*, **32**, 1087-1099.
- RASTOGI N.K., ESHTIAGHI M.N., KNORR D., 1999. Effects of combined high pressure and heat treatment on the reduction of peroxidase and polyphenoloxidase activity in red grapes. *Food Biotechnol.*, **13**, 195-208.
- RAYMOND J., RAKARIYATHAM N., AZANZA J.L., 1993. Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*, **34**, 927-931.
- REED G., UNDERKOFER L.A., 1966. Enzymes in food processing. In : Food Science and Technology, ANSON M.L., MRAK E.M., CHICHESTER C.O., STEWART G.F., Eds, Acad. Press, New York, Chap 5, 204-205.
- REEVES S.G., Mac DOWEL I., BEHN K., DENCH J., 1988. Biochemical studies of cocoa bean o-diphenol O<sub>2</sub> reductase (catechol oxidase). *Food Chem.*, **29**, 209-219.
- REID W.W., 1950. Estimation and separation of the pectinesterase and polygalacturonase of micro-fungi. *Nature*, **227**, 298.
- REISH O., TOWNSEND D.W., BERRY S.A., TSAI M.Y., KING R.A., 1995. Tyrosinase inhibition due to interaction of homocyst(e)ine with copper : The mechanism for reversible hypopigmentation in homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 127-132.

- RHODES M.J.C., WOOLTORTON L.S.C., HILL A.C., 1981. Changes in phenolic metabolism in fruit and vegetable tissues under stress. In *Recent Advances in the Biochemistry of fruit and vegetables*, FRIEND J., RHODES M.J.C., Eds., Acad. Press, New York, Chap. 11, 193-220.
- RICHARD F.C., GOUPY P.M., NICOLAS J.J., LACOMBE J.M., PAVIA A.A., 1991. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 841-847.
- RICHARD-FORGET F., GOUPY P., NICOLAS J., 1994. New approaches for separating and purifying apple polyphenol oxidase isoenzymes : hydrophobic, metal chelate and affinity chromatography. *J. Chromatogr.*, **A 667**, 141-153.
- RICHARD-FORGET F.C., GAUILLARD F.A., 1997. Oxidation of chlorogenic acids, catechins and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis*, cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase : a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2472-2476.
- RICHARD-FORGET F., CERNY M., FAYAD N., SAUNIER T., VAROQUAUX P., 1998. Isolation and characterization of a 'quinone-trapping' substance from a crude *Carica papaya* protein preparation. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **33**, 285-296.
- RICHARD-FORGET F., AMIOT M. J., de RIGAL D., NICOLAS J., 1999. High-performance liquid chromatographic analysis of oxidative degradation of phenolic compounds in model situations, *Seminars in Food Analysis*, **4**, 3-12.
- de RIGAL D., GAUILLARD F., RICHARD-FORGET F., 2000. Changes in the carotenoid content of apricot (*Prunus armeniaca*, var Bergeron) during enzymatic browning :  $\beta$ -carotene inhibition of chlorogenic acid degradation. *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 763-768.
- RICQUEBOURG S., ROBERT-DA SILVA C., ROUCH C., CADET F., 1996. Theoretical support for a conformational change of polyphenol oxidase induced by metabisulfite. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3457-3460.
- ROBERT C., RICHARD-FORGET F., ROUCH C., PABION M., CADET F., 1995. A kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by L-cysteine. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **28**, 457-463.
- ROBERT C., ROUCH C., CADET F., 1998. Inhibition of palmito polyphenoloxidase by halide salts. *J. Enzyme Inhibition*, **13**, 285-290.
- ROBINSON S.P., LOVEYS B.R., CHAKO E.K., 1993. Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *J. Plant Physiol.*, **20**, 99-107.
- RODRIGUEZ-LOPEZ J.N., FENOLL L.G., TUDELA J., DEVECE C., SANCHEZ-HERNANDEZ D., DE LOS REYES E., GARCIA-CANOVAS F., 1999. Thermal inactivation of mushroom polyphenoloxidase employing 2450 MHz Microwave radiation. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3028-3035.

- ROS J.R., RODRIGUEZ-LOPEZ J.N., GARCIA-CANOVAS F., 1993. Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.*, **295**, 309-312.
- ROUET-MAYER M.A., PHILIPPON J., 1986. Inhibition of catechol oxidases from apples by sodium chloride. *Phytochemistry*, **25**, 2717-2719.
- ROUET-MAYER M.A., RALAMBOSOA J., PHILIPPON J., 1990. Roles of o-quinones and their polymers in the enzymatic browning of apples. *Phytochemistry*, **29**, 435-440.
- ROY S., ANATHESWARAN R.C., BEELMAN R.B., 1995. Fresh mushroom quality as affected by modified atmosphere packaging. *J. Food Sci.*, **60**, 334-340.
- SAKUMA K., OGAWA M., SUGIBAYASHI K., YAMADA K., YAMAMOTO K., 1999. Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives. *Arch. Pharm. Res.*, **22**, 335-339.
- SANADA H., SUZUE R., NAKASHIMA Y., KAWADA J., 1972. Effect of thiol compounds on melanin formation by tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **261**, 258-266.
- SANCHEZ-FERRER A., BRU R., GARCIA-CARMONA F., 1989. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol.*, **91**, 1481-1487.
- SANCHEZ-FERRER A., PEREZ-GILABERT M., NUNEZ E., BRU R., GARCIA-CARMONA F., 1994. Triton X-114 phase partitioning in plant protein purification. *J. Chromatogr.*, **A 668**, 75-83.
- SANCHEZ-FERRER A., RODRIGUEZ-LOPEZ J.N., GARCIA-CANOVAS F., GARCIA-CARMONA F., 1995. Tyrosinase : a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1247**, 1-11.
- SAPERS G.M., DOUGLAS F.W., 1987. Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and in juice of raw apple and pear fruits. *J. Food Sci.*, **52**, 1258.
- SAPERS G.M., HICKS K.B., 1989. Inhibition of enzymatic browning in fruits and vegetables. In : Quality Factors of fruits and vegetables : chemistry and technology. JEN J.J., Ed., Amer. Chem. Soc., Washington D.C., 29-41.
- SAPERS G.M., HICKS K.B., PHILLIPS J.G., GARZARELLA L., PONDISH D.L., MATULAITIS R.M., MAC CORMACK T.J., SONDEY S.M., SEIB P.A., EL-ATAWY Y.S., 1992. Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors, and complexing agents. *J. Food Sci.*, **54**, 997-1002.
- SAPERS G.M., 1992. Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration. *J. Food Sci.*, **57**, 1192-1193.
- SAPERS G.M., 1993. Browning of foods : control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol.*, **47**, 75-84.

- SAYAVEDRA-SOTO L.A., MONTGOMERY M.W., 1986. Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *J. Food Sci.*, **51**, 1531-1536.
- SCHÖBEL B., POLLMANN W., 1980. Isolation and characterization of a chlorogenic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Z. Naturforsch.*, **35c**, 209-212.
- SCHWEPPE H., 1980. 146-Réactif glucose-aniline. In : Révélateurs pour la chromatographie en couche mince et sur papier. MERCK E., Ed, Grafis, Francfort, 53.
- SEO B., YUN J., LEE S., KIM M., HWANG K., KIM J., MINUTES K.R., KIM Y., MOON D., 1999. Barbarin as a new tyrosinase inhibitor from barbarea orthocerus. *Planta Med.*, **65**, 683-686.
- SHAHAR T., HENNIG N., GUTFINGER T., HAREVEN D., LIFSCHITZ E., 1992. The tomato 66.3-kDa polyphenoloxidase gene : molecular identification and developmental expression. *Plant Cell*, **4**, 135-147.
- SHIMIZU K., KONDO R., SAKAI K., 2000. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols : structure-activity investigations. *Planta Med.*, **66**, 11-15.
- SHOMER I., BEN-SHALOM N., HAREL E., MAYER A.M., 1979. The intracellular location of catechol oxidase in the olive fruit. *Ann. Botany*, **44**, 261-263.
- SIEBERT K.J., LYNN P.Y., 1997. Mechanisms of adsorbent action in beverage stabilization. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4275-4280.
- SINGLETON V.L., 1987. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model system : observations and practical implications. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **38**, 69-77.
- SMITH M.D., MONTGOMERY M.W., 1985. Improved method for the extraction of polyphenol oxidase from d'Anjou pears. *Phytochemistry*, **24**, 901-904.
- SOJO M. M., NUNEZ-DELICADO E., GARCIA-CARMONA F., SANCHEZ-FERRER A., 1999. Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 518-523.
- SOKOLENKO A., FULGOSI H., GAL A., ALTSCHMIED L., OHAD I., HERRMANN R.G., 1995. The 64 kDa polypeptide of spinach may not be the LHCII kinase, but a lumen-located polyphenol oxidase. *FEBS Lett.*, **371**, 176-180.
- SOMMER A., NE'EMAN E., STEFFENS J.C., MAYER A.M., HAREL E., 1994. Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.*, **105**, 1301-1311.
- SOTO-MERA M.T., LOPEZ RICO M.R., FILGUEIRA J.F., VILLAMIL E., CIDRAS R., 2000. Occupational allergy to papain. *Allergy*, **55**, 983-984.
- SPAGNA G., BARBAGALLO R.N., PIFFERI P.G., 2000. Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4619-4627.

- STROTHKAMP K.G., JOLLEY R.L., MASON H.S., 1976. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 519-524.
- SUGUMARAN M., NELLAIAPPAN K., VALIVITTAN K., 2000. A new mechanism for the control of phenoloxidase activity : inhibition and complex formation with quinone isomerase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **379**, 252-260.
- SZEJTLI J., 1990. Cyclodextrins, properties and applications. *Drug Investigation*, **2**, 11-21.
- TAJCHAKAVIT S., RAMASWAMY H.S., 1997. Continuous-flow microwave inactivation kinetics of pectin methyl esterase in orange juice. *J. Food Process. Preserv.*, **21**, 365-378.
- TANG C.S., 1973. Localization of benzyl glucosinolate and thioglucosidase in *Carica papaya* fruit. *Phytochemistry*, **12**, 769-773.
- TANG C.S., 1974. Benzyl isothiocyanate as a naturally occurring papain inhibitor. *J. Food Sci.*, **39**, 94-96.
- TAOUKIS P.S., LABUZA T.P., LILLEMO J.H., LIN S.W., 1990. Inhibition of shrimp melanosis (Black Spot) by ficin. *Lebensm.-Wiss -Technol.*, **23**, 52-54.
- TAYLOR R.L., HIGLEY N.A., BUSH R.K., 1986. Sulfites in foods : Uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Adv. Food Res.*, **30**, 1-76.
- TAYLOR A.J., CLYDESDALE F.M., 1987. Potential of oxidised phenolics as food colorants. *Food Chem.*, **24**, 301-313.
- TAYLOR S.L., 1993. Why sulfite alternatives ? *Food Technol.*, **47**, 14.
- TAYLOR S.L., NORDLEE J.A., 1993. Chemical additives in seafood products. *Clin. Rev. Allergy*, **11**, 261-291.
- TONG C.B.S., HICKS K.B., 1991. Sulfated polysaccharides inhibit browning of apple juice and diced apples. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1719-1722.
- TONG C.B.S., HICKS K.B., OSMAN S.F., HOTCHKISS JR A.T., HAINES R.M., 1995. Oxalic acid in commercial pectins inhibits browning of raw apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 592-597.
- VALERO E., ESCRIBANO J., GARCIA-CARMONA F., 1988a. Reactions of 4-methyl-*o*-benzoquinone, generated chemically or enzymatically, in the presence of L-proline. *Phytochemistry*, **27**, 2055-2061.
- VALERO E., VARON R., GARCIA-CARMONA F., 1988b. Characterization of polyphenol oxidase from airen grapes. *J. Food Sci.*, **53**, 1482-1485.
- VALERO E., VARON R., GARCIA-CARMONA F., 1990. Inhibition of grape polyphenol oxidase by several natural aliphatic alcohols. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1097-1100.

- VALERO E., GARCIA-MORENO M., VARON R., GARCIA-CARMONA F., 1991. Time-dependant inhibition of grape polyphenol oxidase by tropolone. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1043-1046.
- VAMOS-VIGYAZO L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruit and vegetables. *C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, **15**, 49-127.
- VAN GELDER C.W.G., FLURKEY W.H., WHICHERS H.J., 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, **45**, 1309-1323.
- VANNESTE W.H., ZUBERBÜHLER A., 1974. Copper-containing oxygenases, In : Molecular Mechanisms of Oxygen Activation, HAYAISHI O., Ed., Acad. Press, New York, Chap. 9, 371-393.
- VAROQUAUX P., 1978. Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse Doct., Faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'Université de Dijon, 131p.
- VAROQUAUX P., LABAVITCH J.M., STRAND L.L., VAROQUAUX-TOURNEMELLE F., 1982. Partial characterization of hydroxycinnamoylquininate esterase from *Aspergillus niger*. *Lebensm.-Wiss.-Technol.*, **15**, 39-41.
- VAROQUAUX P., SARRIS J., 1979. Influence de l'acide ascorbique sur la cinétique de l'o-diphénolase (E.C.1.14.18.1) du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **12**, 318-320.
- VAUGHN K.C., LAX A.R., DUKE S.O., 1988. Polyphenol oxidase : The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.*, **72**, 659-665.
- WALKER J.R.L., 1969. Inhibition of the apple phenolase system through infection by *Penicillium expansum*. *Phytochemistry*, **8**, 561-566.
- WALKER J.R.L., 1976. The control of enzymic browning in fruit juices by cinnamic acids. *J. Food Technol.*, **11**, 341-345.
- WALKER J.R.L., 1995. Enzymatic browning in fruits : its biochemistry and control. In : Enzymatic Browning and its Prevention. LEE C.Y., WHITAKER J.R., Eds., Amer. Chem. Soc., Washington D.C., 8-22.
- WALKER J.R.L., FERRAR P.H., 1995. The control of enzymatic browning in foods. *Chem. Industry*, 836-839.
- WALKER J.R.L., FERRAR P.H., 1998. Diphenol Oxidases, Enzyme-catalysed Browning and Plant Disease Resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, **15**, 457-498.
- WARRINGTON J.C., SAVILLE B.A., 1999. Tyrosinase inactivation in organic solvents. *Biotech. Bioeng.*, **65**, 325-333.
- WEEMAES C.A., LUDIKHUYZE L.R., VAN DEN BROECK I., HENDRICKX M. E., 1998. High pressure inactivation of polyphenoloxidases. *J. Food Sci.*, **63**, 873-877.

- WEEMAES C.A., LUDI KHUYZE L.R., VAN DEN BROECK I., HENDRICKX M. E., 1999a. Influence of pH, benzoic acid, glutathione, EDTA, 4-hexylresorcinol, and sodium chloride on the pressure inactivation kinetics of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3526-3530.
- WEEMAES C., LUDI KHUYZE L., VAN DEN BROECK I., HENDRICKX M., 1999b. Kinetic study of antibrowning agents and pressure inactivation of avocado polyphenol oxidase. *J. Food Sci.*, **64**, 823-827.
- WHITAKER J.R., 1985. Mechanisms of oxidoreductases important in food component modification. In : Chemical changes in food during processing. RICHARDSON T., FINLEY J.W., Eds., Avi Publ. Co., New York, Chap. 8, 121-175.
- WHITAKER J.R., LEE C.Y., 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In : Enzymatic browning and its prevention. LEE C.Y., WHITAKER J.R., Eds., Amer. Chem. Soc., Washington D.C., 2-7.
- WICHERS H.J., VAN DEN BOSCH T., GERRITSEN Y.A.M., OYEVAAR J.I., EBBELAAR M.C.E.M., RECOURT K., KERRIGAN R.W., 1995. Mushroom science. Proceedings of the 14<sup>th</sup> international congress on the science and cultivation of edible fungi, Balkema A. A., Rotterdam, 723-729.
- WICHERS H.J., GERRITSEN Y.A.M., CHAPELON C.G.J., 1996. Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, **43**, 333-337.
- WINKLER M.E., LERCH K., SOLOMON E.I., 1981. Competitive inhibitor to the binuclear copper active site in tyrosinase. *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 7001-7003.
- WINTERHALTER P., 1991. Fruits. In : Volatile compounds in foods and beverages. MAARSE H., Ed., Marcel Dekker Inc., New York, Chap. 11, 399-400.
- WISE R.R., NAYLOR A.W., 1985. Calibration and use of a Clark-type oxygen electrode from 5 to 45°C. *Analyt. Biochem.*, **146**, 260-264.
- WONG T.C., LUH B.S., WHITAKER J.R., 1971. Isolation and characterization of polyphenol oxidases of clingstone peach. *Plant Physiol.*, **48**, 19-23.
- YONG G., LEONE C., STROTHKAMP K.G., 1990. *Agaricus bisporus* metapolytyrosinase : preparation, characterization, and conversion to mixed-metal derivatives of the binuclear site. *Biochem.*, **29**, 9684-9690.
- YURKOW E.J., LASKIN J.D., 1989. Purification of tyrosinase to homogeneity based on its resistance to sodium dodecyl sulfate-proteinase K digestion. *Arch. Biochem. Biophys.*, **275**, 122-129.
- ZAWISTOWSKI J., WESELAKE R.J., BLANK G., MURRAY E.D., 1987. Fractionation of Jerusalem artichoke phenolase by immobilized copper affinity chromatography. *Phytochemistry*, **26**, 2905-2907.

- ZAWISTOWSKI J., BILIADERIS C.G., MURRAY E.D., 1988a. Purification and characterization of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) polyphenol oxidase. *J. Food Biochem*, **12**, 1-22.
- ZAWISTOWSKI J., BILIADERIS C.G., MURRAY E.D., 1988b. Isolation and some properties of an acidic fraction of polyphenol oxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *J. Food Biochem*, **12**, 23-35.
- ZAWISTOWSKI J., BILIADERIS C.G., ESKIN N.A.M., 1991. Polyphenol oxidase. In *Oxidative enzymes in foods*, ROBINSON D.S.R. and ESKIN N.A.M., Eds, Elsevier Appl. Sci., London, Chap. 6, 217-273.
- ZEMEL G.P., SIMS C.A., MARSHALL M.R., BALABAN M., 1990. Low pH inactivation of polyphenoloxidase in apple juice. *J. Food Sci.*, **55**, 562-563.
- ZHANG J., KJONASS R., FLURKEY W.H., 1999. Does *N*-hydroxyglycine inhibit plant and fungal laccases ? *Phytochemistry*, **52**, 775-783.
- ZINKERNAGEL V., 1986. Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol.*, **115**, 257-266.

## LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b> Quantités maximales de sulfites autorisées dans les denrées alimentaires, contenant fruits et/ou légumes.	22
<b>Tableau 2 :</b> récapitulatif des étapes de pré-purification des différents systèmes polyphénoloxydasiques.	45
<b>Tableau 3:</b> Récapitulatif des compositions des solutions d'homogénéisation des différents tissus végétaux.	46
<b>Tableau 4 :</b> Récapitulatif des conditions de dosage des différents systèmes polyphénoloxydasiques.	58
<b>Tableau 5 :</b> Résultats obtenus au cours de la préparation de l'extrait enzymatique (PPOA) à partir de 12 g de cortex lyophilisé d'abricot.	62
<b>Tableau 6 :</b> Résultats obtenus au cours de la préparation de l'extrait enzymatique (PPOP) à partir de 12 g de cortex lyophilisé de pomme.	63
<b>Tableau 7 :</b> Résultats obtenus au cours de la préparation de l'extrait enzymatique (PPOS) à partir de 10 g de cortex lyophilisé de scarole.	63
<b>Tableau 8 :</b> Résultats obtenus au cours de la préparation de l'extrait enzymatique (PPOC) à partir de 10 g de champignon de Paris lyophilisé.	64
<b>Tableau 9 :</b> Bilan de purification des composés inactivant la PPO à partir d'une préparation commerciale de papaine.	82
<b>Tableau 10 :</b> Résultats obtenus au cours de la préparation de l'extrait enzymatique HCQE à partir de 9 mL d'une préparation expérimentale d' <i>Aspergillus niger</i> (GB).	140
<b>Tableau 11 :</b> Effet du pH sur les paramètres cinétiques de l'HCQE pour l'acide chlorogénique.	144
<b>Tableau 12 :</b> Effet du pH sur les paramètres cinétiques de la PPO d'abricot pour l'acide chlorogénique et l'acide caféique.	146
<b>Tableau 13 :</b> Quantités théoriques de CF et d'HCQE nécessaires pour une inhibition de 50 % de la vitesse initiale d'oxydation des phénols par la PPO d'abricot.	158

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases.	3
<b>Figure 2 :</b> Domaines des polyphénoloxydases des végétaux supérieurs et des tyrosinases de champignons.	5
<b>Figure 3 :</b> Représentation « en ruban » de la polyphénoloxydase de tubercule de pomme de terre obtenue par cristallographie aux rayons X.	7
<b>Figure 4 :</b> Interrelations entre les trois états fonctionnels de la tyrosinase (met, déoxy et oxytyrosinase).	9
<b>Figure 5 :</b> Structure de quelques composés phénoliques substrats de la polyphénoloxydase et de la tyrosinase.	12
<b>Figure 6 :</b> Structures de quelques composés chélateurs de métaux.	24
<b>Figure 7 :</b> Structures de quelques composés agissant au niveau du site actif des PPO.	26
<b>Figure 8 :</b> Structures de quelques aldéhydes inhibant les PPO.	28
<b>Figure 9 :</b> Structure de la liaison formée entre le groupement aldéhyde d'un inhibiteur et un groupement aminé porté par l'enzyme.	28
<b>Figure 10 :</b> Structures de quelques agents réducteurs ou piègeurs de quinones.	30
<b>Figure 11 :</b> Structures de quelques composés inhibiteurs présents dans des extraits naturels.	32
<b>Figure 12 :</b> Réactions catalysées par différentes enzymes de préparations commerciales.	37
<b>Figure 13 :</b> Réactions catalysées par l'HCQE.	39
<b>Figure 14 :</b> Protocole de purification des composés inhibiteurs à partir d'une préparation commerciale de Papaine.	49
<b>Figure 15 :</b> Chromatographie d'interactions hydrophobes sur Phényl-Sépharose CL-4B de l'extrait de PPO d'abricot S <sub>30</sub> D.	60
<b>Figure 16 :</b> Effet de différents additifs sur des coupes de champignon de Paris.	65
<b>Figure 17 :</b> Effet de différents additifs sur des coupes de pomme Red One.	65
<b>Figure 18 :</b> Effets de différents traitements sur des coupes de tissus vascularisés de cœurs de scarole.	67
<b>Figure 19 :</b> Effet de différents additifs sur l'évolution de la luminance (L*) de broyats.	70
<b>Figure 20 :</b> Effet d'un extrait brut de papaine sur le système polyphénoloxidasique de scarole partiellement purifié.	72
<b>Figure 21 :</b> Effet de la bromélaïne et de la papaine sur le système polyphénoloxidasique de scarole partiellement purifié.	74
<b>Figure 22 :</b> Effet d'un extrait de papaine issu de chromatographie d'échange d'anions	

sur différents systèmes polyphénoloxidasiques partiellement purifiés.	76
<b>Figure 23</b> : Chromatographie d'exclusion d'un extrait brut de papaine.	78
<b>Figure 24</b> : Chromatographie d'échange d'anions d'un extrait GF.	80
<b>Figure 25</b> : Chromatogrammes HPLC des fractions obtenues au cours de la purification des agents inactivateurs.	83
<b>Figure 26</b> : Chromatogramme HPLC obtenu en déposant 250 µL de la fraction inhibitrice EIL sur une colonne semi-préparative de silice non-greffée.	85
<b>Figure 27</b> : Profils chromatographiques HPLC des fractions B et C provenant de la séparation sur colonne HPLC semi-préparative.	87
<b>Figure 28</b> : Profil d'élution de la fraction EIL sur cartouche Sep Pak Si 60.	89
<b>Figure 29</b> : Profil d'élution sur HPLC de fractions éluées de la cartouche Sep Pak.	90
<b>Figure 30</b> : Surfaces des massifs 1, 2 et 3 obtenues par analyse des fractions Sep Pak à l'aide du système HPLC.	90
<b>Figure 31</b> : Effet inhibiteur apparent de la fraction GF sur l'oxydation du 4MC par la PPO de Scarole PPOS à pH 4.	92
<b>Figure 32</b> : Effet du pH sur l'inhibition de la PPO de scarole PPOS par la fraction GF.	94
<b>Figure 33</b> : Effet de la concentration de la fraction inactivatrice EI sur la PPOS.	96
<b>Figure 34</b> : Effet de la concentration initiale de PPO sur son inactivation par la fraction EI.	98
<b>Figure 35</b> : Effet apparent du pH sur l'inactivation de la PPOS.	99
<b>Figure 36</b> : Effet de la dialyse sur la PPO partiellement inactivée par la fraction EI.	101
<b>Figure 37</b> : influence de l'addition de sulfate de cuivre sur la PPOS partiellement inactivée par la fraction EI.	103
<b>Figure 38</b> : Test de Schweppe.	106
<b>Figure 39</b> : Spectre UV de la fraction inactivatrice issue de la séparation sur cartouche Sep Pak.	106
<b>Figure 40</b> : Spectre infra-rouge de la fraction inactivatrice de la fraction issue de la chromatographie d'échange d'ions.	108
<b>Figure 41</b> : Détection du pouvoir inactivateur au long de la séparation HPLC.	110
<b>Figure 42</b> : Analyse LC-MS en mode positif de la fraction inactivatrice issue de la Sep Pak.	112
<b>Figure 43</b> : Analyse LC-MS en mode négatif de la fraction inactivatrice issue de la Sep Pak.	114
<b>Figure 44</b> : Analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS <sup>2</sup> ) d'ions créés en mode négatif.	116
<b>Figure 45</b> : Spectre RMN de la fraction inactivatrice (fraction B) issue de la chromatographie HPLC semi-préparative Si 60.	118

<b>Figure 46</b> : Détails du spectre RMN de la fraction inactivatrice (fraction B) issue de la chromatographie HLPC semi-préparative Si 60.	120
<b>Figure 47</b> : Effet du jus et du latex de papaye sur le système polyphénoloxydasique de scarole partiellement purifié.	124
<b>Figure 48</b> : Chromatographies d'exclusion de jus de papaye (A) et d'une solution de latex de papaye (B).	126
<b>Figure 49</b> : Influence de l'HCQE sur l'activité PPO.	128
<b>Figure 50</b> : Activités HCQE de différentes préparations commerciales d'enzymes pectinolytiques.	130
<b>Figure 51</b> : Exemple de chromatogramme HPLC obtenu lors des dosages d'activité HCQE.	130
<b>Figure 52</b> : Optimisation du pH du milieu d'incubation employé pour le dosage de l'activité HCQE.	133
<b>Figure 53</b> : Cinétique d'incubation d'une solution d'acide chlorogénique avec l'HCQE.	133
<b>Figure 54</b> : Courbe d'étalonnage du dosage d'activité HCQE.	135
<b>Figure 55</b> : Chromatographie d'exclusion d'une préparation GB d'HCQE sur Séphadex G25 Fine.	135
<b>Figure 56</b> : Chromatographie d'interactions hydrophobes de la fraction GF sur Phényl-Sépharose CL-4B.	137
<b>Figure 57</b> : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (8 %) dénaturant des fractions obtenues au cours de la purification de l'HCQE.	139
<b>Figure 58</b> : Effet du pH sur l'hydrolyse de l'acide chlorogénique par l'HCQE.	141
<b>Figure 59</b> : Schéma des réactions se produisant un milieu contenant initialement de l'acide chlorogénique, de l'HCQE et la PPO.	141
<b>Figure 60</b> : Effet du pH sur l'oxydation de l'acide chlorogénique par la PPO d'abricot.	145
<b>Figure 61</b> : Effet du pH sur l'oxydation de l'acide caféique par la PPO d'abricot.	145
<b>Figure 62</b> : Influence de l'addition d'acide caféique sur la vitesse de consommation d'oxygène à différentes concentrations en acide chlorogénique, catalysée par la PPO d'abricot.	148
<b>Figure 63</b> : Effet de l'HCQE sur la consommation d'oxygène.	150
<b>Figure 64</b> : Effet de l'HCQE sur l'activité PPO dosée par spectrophotométrie.	150
<b>Figure 65</b> : Evolution de la teneur en acides chlorogénique et caféique en présence de PPO et d'HCQE à pH 4,4 et 7 : points expérimentaux et courbes théoriques.	152
<b>Figure 66</b> : Effet de différents additifs sur l'évolution de la luminance (L*) de broyats d'abricot.	159
<b>Figure 67</b> : Photographies des broyats en fin d'expérience.	159

## Résumé :

Nous avons étudié les mécanismes d'inhibition du brunissement enzymatique et de la polyphénoloxydase (PPO) par deux extraits enzymatiques d'origine naturelle. Le premier est une préparation commerciale de papaine qui s'est révélée un inhibiteur efficace du brunissement de coupes et de broyats de champignon, de pomme, d'abricot et de scarole. Cette préparation d'enzymes protéolytiques contient des composés non peptidiques de 300 à 1500 g.mole<sup>-1</sup> capables d'inactiver de manière partiellement réversible les différentes PPO testées et ceci consécutivement au piégeage des atomes de cuivre. Des analyses structurales nous ont permis de préciser la nature de ces composés inactivateurs, à savoir des dérivés d'allyl sulfonyl alcools. De tels composés sont probablement issus du procédé de fabrication de la préparation commerciale.

La seconde préparation enzymatique étudiée était un extrait d'*Aspergillus niger* riche en hydroxycinnamoïl quinate estérase (HCQE). Après avoir vérifié que cette enzyme inhibait la PPO d'abricot via l'hydrolyse de l'acide chlorogénique conduisant à la formation d'acide caféique, l'HCQE a été purifiée 8 fois en deux étapes chromatographiques. L'évolution de la composition phénolique d'un milieu réactionnel contenant de l'acide chlorogénique, de l'HCQE et de la PPO a été mathématiquement modélisée. Ce modèle a permis de déterminer que, dans des conditions de pH allant de 4 à 7, une activité HCQE 140 à 380 fois supérieure à celle de notre extrait purifié inhibait 50 % de l'activité PPO. Cependant, un test d'application d'un extrait d'HCQE sur un broyat d'abricot révèle que notre extrait n'est pas assez concentré dans nos conditions expérimentales. Ceci suggère que seul l'emploi d'HCQE concentrée lors d'un broyage sous anoxie et en combinaison avec d'autres inhibiteurs permettrait d'obtenir un effet anti-brunissement significatif.

**Mots-clés :** brunissement enzymatique, polyphénoloxydase, abricot, scarole, pomme, champignon, inhibition, réversibilité, papaine, hydroxycinnamoïl quinate estérase.

## Summary :

The inhibition of enzymatic browning and polyphenol oxidase (PPO) by two enzymatic extracts from natural sources was investigated. A papain commercial extract inhibited browning of mushroom, apple and endive slices and purées. This protease preparation contained non peptidic compounds of low molecular weight (between 300 and 1500 g.mol<sup>-1</sup>) that inactivated all tested PPO. PPO activity partially recovered after dialysis or addition of CuSO<sub>4</sub>, which suggested that the enzyme copper was « trapped » during the inactivation mechanism. Structural analysis indicated that the inactivating agents could be allyl sulfonyl alcohol derivatives. These compounds were probably synthesised during the extract industrial processing.

A hydroxycinnamoyl quinate esterase (HCQE) from *Aspergillus niger* extract displaying a high HCQE activity was shown to inhibit chlorogenic acid oxidation by apricot PPO via the substrate hydrolysis leading to caffeic acid, a PPO inhibitor. The HCQE was 8-fold purified using two chromatographic steps. Consumption of phenolic compounds in model solutions containing both PPO and HCQE activities was mathematically modelised. This model indicated that 50 % of PPO activity could be inhibited by an HCQE activity 140- to 380-fold higher than our purified extract, depending on the pH value (4 to 7). Our extract was not enough concentrated to have a significant anti-browning effect on apricot purée. This suggested that a concentrated HCQE extract should be used on purée in combination with blending under anoxia and other browning inhibitors.

**Key-words:** enzymatic browning, polyphenol oxidase, apricot, endive, apple, mushroom, inhibition, reversibility, papain, hydroxycinnamoïl quinate esterase.