

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

Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire de Recherche des Produits Naturels (LAPRONAT)

Thèse de Doctorat Ès-Sciences

Présentée par

Iriscit Su
va-

M. Hicham GOUZI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ: Substances Naturelles, Activités s et

9

Etude des propriétés de la polyphénol oxydase

(EC 1. 14. 18. 1) du champignon de Paris

(Agaricus bisporus J.E Lange Imbach)

Soutenue le : 14 Septembre 2011

Devant le jury composé de

M. TALEB BENDIAB Sid Ahmed

Professeur à la Faculté des Sciences de l'Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie

Président du jury

M. BENMANSOUR Abdelhafid

Professeur à la Faculté des Sciences de l'Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie

Directeur de thèse

M. YOUSFI Mohamed

Professeur à la Faculté des Sciences et Sciences de l'ingénieur de l'Université Amar Telidji, Laghouat, Algérie

Examineur

M. AMINE Aziz

Professeur à la Faculté des Sciences et Technique de l'Université Hassan ii, Mohammedia, Maroc

Examineur

Mrne. ATIK BEKKARA Fouzia

Professeur à la Faculté des Sciences de l'Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie

Examinatrice

Mme. BELARBI Meriem

Professeur à la Faculté des Sciences de l'Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie

Examinatrice

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:

A la mémoire de mon grand-père

A mon père M'hamed

A ma mère Halima

A mes frères Samir, Bassim et Abdelmalek

A ma soeur Samara et son mari Bouziane

A toute ma famille

A tous mes amis.

Remerciements

Ce travail a été effectué au laboratoire de Recherche des Produits Naturels (LAPRONAT) de l'université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen. Je remercie profondément Monsieur le Professeur CHABANE SARI Daoudi, directeur de laboratoire, d'en avoir autorisé la réalisation.

Je désire alors exprimer ma profonde gratitude au Professeur TALEB BENDIAB Sid Ahmed qui m'a honoré en acceptant d'être président de ce jury.

Je remercie tout particulièrement Monsieur BENMANSOUR Abdelhafid de m'avoir encadré durant ces années de doctorat en étant toujours disponible et encourageant, pour son aide et conseils et pour ses grandes valeurs humaines.

Je remercie Messieurs les Professeurs YOUSFI Mohamed et AZIZ Amine d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit de thèse ainsi que d'avoir bien voulu être membre de mon jury de thèse. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude.

Je tiens également à remercier Mesdames les Professeurs BELARBI Meriem et ATIK BEKKARA Fouzia d'avoir accepter d'être examinatrices dans ce jury.

Ma connaissance s'adresse à Monsieur le Professeur William Bill FLURKEY, qui m'a largement fait profiter de son expérience et de ses connaissances en enzymologie et plus particulièrement sur la tyrosinase, mais également pour tous ses conseils toujours pertinents et ses encouragements.

Je souhaite aussi saluer et remercier mes collègues doctorants, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant ces quatre dernières années.

J'ai eu aussi le plaisir d'être enseignant durant ces trois dernières années de thèse dans le département de biologie de l'université Amar Telidji. Je tiens donc à remercier toute l'équipe administrative et enseignante de l'université Amar Telidji et plus spécifiquement Messieurs BELYAGOUBI Larbi, MOURAD Leboukh, BOUTMEDJET Ahmed, BOUBRIMA Youcef, OUINTEN Mohamed et CHAÏBI Rachid.

Un grand merci à mes parents et à toute ma famille pour leur amour et leur soutien. Pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

Enfin, merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin durant ces années de recherche et d'études.

Résumé

La polyphénol oxydase (PPO; EC 1.14.18.1) du champignon de Paris (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach) est extraite en milieu aqueux à l'aide d'une poudre d'acétone. L'extrait brut obtenu est partiellement purifié par précipitation par l'acétone suivie d'un fractionnement au sulfate d'ammonium à 60%. Cette enzyme possède deux activités, monophénolase et diphenolase mesurées par spectrophotométrie à 420 et 475 nm pour le pyrogallol et la L-tyrosine, respectivement. Un taux de purification de 2 fois est obtenu pour les deux activités, par la précipitation au sulfate d'ammonium. Les activités monophénolase et diphenolase, sont respectivement 3.35 UE/ml et 189.3 UE/ml.

La PPO reste stable à -15°C pendant 44 jours. L'enzyme n'est pas très thermostable. Son activité diphenolase diminue lorsqu'elle est incubée à des températures supérieures à 35°C. Elle se caractérise par deux pH optimaux, (5.3 et 7.0 à 25°C), quand le pyrogallol est utilisé comme substrat et la vitesse initiale d'oxydation de ce dernier dépend de la concentration de l'enzyme. L'activité diphenolase est optimale à pH 7.5 lorsque le pyrocatechol est utilisé comme substrat. Une faible activité laccase représentant seulement 0.22% de l'activité totale de l'enzyme a été mesurée.

Les mono-, di- et triphénol ont été des substrats pour la PPO. Utilisant V_m et K_m comme constante de spécificité, le pyrocatechol est le meilleur substrat suivie par le pyrogallol. Les paramètres cinétiques de l'enzyme sont : $V_{max} = 80$ UE/min/ml, $K_m = 1.4$ mM et $K_s = 250$ mM pour le pyrogallol et $V_m = 168$ UE/min/ml, $K_m = 0.40$ mM et $K_s = 270$ mM pour le pyrocatechol.

L'inhibition de la PPO du champignon de Paris a été étudiée avec l'acide benzoïque, l'azide de sodium et le fluorure de sodium comme inhibiteurs, le pyrocatechol et le pyrogallol comme substrats. La PPO du champignon de Paris a été fortement inhibée par les inhibiteurs testés. L'analyse cinétique de l'inhibition de l'activité triphénol oxydase montre que l'acide benzoïque et l'azide de sodium sont des inhibiteurs compétitifs, avec des valeurs K_i de 0.0498 et 3.22 mM, respectivement. L'inhibition par le fluorure de sodium est mixte-type I, avec des constantes K_i de 81.08 mM et K_{i5} de 161.14 mM pour le pyrogallol utilisé comme substrat. L'activité diphenol oxydase montre une inhibition mixte-type I avec l'azide de sodium. Les valeurs de K_i et K_{i5} sont respectivement, 1.39 et 3.12 mM. Une inhibition de type compétitif est obtenue avec l'acide benzoïque utilisé comme inhibiteur. La constante d'inhibition K_i étant de 0.046 mM. Une inhibition mixte-type II est obtenue avec le fluorure de sodium en utilisant le pyrocatechol comme substrat, avec $K_i = 148.97$ mM et $K_{i5} = 49.19$ mM. Les valeurs d' I_{50} sont estimées à 0.147 mM, pour l'acide benzoïque, 3.20 mM pour l'azide de sodium et 123.94 mM pour le fluorure de sodium.

L'acide benzoïque, au vu de la faible valeur K_i , est apparemment l'inhibiteur le plus efficace, lorsque le pyrogallol et le pyrocatechol sont utilisés comme substrats.

La cinétique de l'inactivation thermique de la PPO peut être correctement décrite par un modèle de premier ordre à des températures comprises entre 45°C et 73°C avec les différents temps de traitement. La dénaturation de cette enzyme, mesurée par la perte d'activité, pourrait être décrite comme une réaction de premier ordre avec des valeurs de k comprises entre 0.0046 et 1.79 min⁻¹. Les valeurs k et D diminuent et augmentent, respectivement, avec l'augmentation de la température, indiquant une inactivation rapide de la PPO à des températures supérieures. Les valeurs de l'énergie d'activation (E_a) et Z' sont égales respectivement à 208.37 kJ/mol ($R^2 = 0.9667$) et 10.10°C ($R^2 = 0.9559$). Le traitement thermique, pendant 30 min, à 52.5°C et à 60°C provoque une inactivation de l'enzyme de l'ordre de 50% et 80%, respectivement.

Le brunissement enzymatique du champignon, pourra être très ralenti voir inhibé soit par inactivation thermique ou par action de l'acide benzoïque.

Mots clés: Champignon de Paris, *Agaricus bisporus*, Polyphenol oxydase, Purification, Inhibition, Inactivation thermique, Brunissement enzymatique.

Abstract

Polyphenol oxidase (PPO; EC 1.14.18.1) from mushrooms (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach) was extracted in aqueous medium from acetone powder. The enzyme crude extract was then partially purified by acetone precipitation followed by precipitation with ammonium sulphate at 60%. The enzyme exhibited both monophenolase and diphenolase activities that were measured spectrophotometrically at 420 and 475 nm using L-tyrosine and pyrogallol as substrates, respectively. A two-fold purification in both activities was achieved by ammonium sulfate fractionation. The monophenolase activity was 3.35 EU/ml, and the diphenolase activity was 189.3 EU/ml.

PPO was relatively stable at -15°C for 44 days. The enzyme was not very heat stable, and its activity decreased when incubated at the temperatures higher than 35°C. PPO activity showed two pH optima, at 5.3 and 7.0 at 25°C when pyrogallol was used as the substrate. Diphenolase activity of PPO was optimal at pH 7.5 when pyrocatechol was used as substrate. The initial rate of pyrogallol oxidation depends also on the enzyme concentration. A negligible laccase activity was observed and represented only 0.22 % of the activity total PPO.

Mono-, di- and triphenols were substrates for PPO. Using V_m/K_m as a specificity constant, pyrocatechol was the better substrate followed by pyrogallol. The kinetic parameters of the enzyme were: $V_m = 80$ EU/min/ml, $K_m = 1.4$ mM and $K_s = 250$ mM for pyrogallol and $V_{m_{ax}} = 168$ EU/min/ml, $K_m = 0.40$ mM and $K_s = 270$ mM for the pyrocatechol.

The inhibition kinetics of mushroom PPO with benzoic acid, sodium azide and sodium fluoride as inhibitors, and pyrocatechol as substrate were reported. Mushroom PPO was significantly inhibited by all of the tested inhibitors. With regard to triphenol oxidase activity, kinetic analysis revealed that inhibition by benzoic acid and sodium azide were of the competitive-type, with K_i values of 0.0498 and 3.22 mM, respectively. The inhibition by sodium fluoride was of the mixed-I type, with a K_i of 81.08 mM and K_{is} of 161.14 mM for pyrogallol as a substrate. Diphenolase activity exhibited the mixed-I type inhibition with sodium azide (K_i and K_{i5} values of 1.39 and 3.12 mM, respectively). Competitive-type inhibition was obtained when benzoic acid was used as an inhibitor; the inhibition constant K_i was found to be 0.046 mM. A partial mixed-type inhibition pattern was obtained with sodium fluoride when using pyrocatechol as a substrate, with a K_j of 148.97 mM and a K_{is} of 49.19 mM. The I_{50} values were estimated to be 0.147, 3.20, and 123.94 mM for benzoic acid, sodium azide, and sodium fluoride, respectively. Furthermore, benzoic acid was the most effective inhibitor when pyrogallol and pyrocatechol were used as substrates because of its low K_i value. The results showed that the type of inhibition was dependent upon both the origin of the PPO and on the substrate.

Kinetic studies of the thermal inactivation showed that mushroom PPO followed monophasic kinetics that can be adequately described by a first-order model at temperatures range of 45°C to 73°C with different exposure times. Denaturation of this enzyme, measured by loss in activity, could be described as a first-order reaction with k values between 0.0046 and 1.79 min⁻¹. D_0 and k -values decreased and increased, respectively, with increasing temperature, indicating faster PPO inactivation at higher temperatures. Activation energy (E_a) and Z_0 values were calculated as 208.37 kJ/mol ($R^2 = 0.9667$) and 10.10 °C ($R^2 = 0.9559$) respectively. Heat treatment at 52.5°C and 60°C for 30 min resulted in 50% and 80% inactivation of enzymatic activity.

Inhibition of PPO by benzoic acid or its thermal inactivation could be very useful to control enzymatic browning of mushroom.

Keywords: Mushroom, *Agaricus bisporus*, Polyphenol oxidase, Purification, Inhibition, Thermal inactivation, Enzymatic browning.

((J.E. Lange) Imbach) Üi » (EC 1.14.18.1) JL J
tn -lu . i j i *Agaricus bisporus*

J LL j 475 ,3 420 J
3.35 jJJA . ÛJ

LLIJ 189.3

7.0 j **5.3** ' . JJ J . ° **35** ù J J **S JJJ** C
7.5 .Jj jj ILLD çf Ji 0 5

JJ ççU ' .JL-I Jj lJ B ççwi.1 JJ3Ji l JJ J
J JJ J ~ **V/Kp** JL4i4 jLMS J3J.B

JjUjJB d 250 = **K** Jj^ J **1.4 = Km 'J//)j 80** =Vmax ~J J Jt

. JJ' J L»JU j3 JL Jj ij
J L»J9 jL S Jj i i il t ~ JJJJ ' Jj~ J jLiUL4~ AJJJfi
. içJ L) J çç JL J i L

J 3.22 j 0.0498 K

il. j"Jj. **J 161.14 = KJSJ JAJA81O8 = Km**

.L 3.12 j 1.39 Kl jKis , 4L .3 ~ J J
Jii !

JA 148.97 Ki . Jji L5 JJ .Jj.4 J4
.jJJ.49.19 Kis i

J .:jl 4llL:j5 u- j'j- J 123.94 j 3.20 40.147 1050 -k,
JjS

JJIJ U J. l Ki Z4 L -- : LAJ Ur S JJJJJ

1.79 -0.0046 ù k

JU

c° 7345

ùLii i4

.k JAi , fl s Ji **D K** j
j (R² = 0.9667) 208.37: LJL UJ ZT j Ea

(R² = 0.9559) c° **10.10**

%80.j % 50& 30 J 60 52.5 L» JL»- ' -
L JLr

j' ii jL Jj j '*Agaricus bisporus* ' jL ->à : UL4i L4li

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre 1. Etude bibliographique	3
1.1 Historique et perspectives sur la polyphénol oxydase.....	3
1.2 Définition, classification et nomenclature de la polyphénol oxydase	4
1.2.1 Définition	4
1.2.2 Nomenclature.....	4
1.2.3 Classification	4
1.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPOs.....	5
1.3.1 Caractéristiques réactionnelles.....	5
1.3.1.1 La polyphénol oxydase.....	5
1.3.1.2 La laccase (E.C. 1.10.3.2).....	6
1.3.2 Caractéristiques structurales.....	7
1.3.2.1 Architecture moléculaire globale.....	7
1.3.2.2 Le site actif.....	9
1.4 Source, localisation et rôle des PPOs.....	11
1.4.1 Source et localisation.....	11
1.4.2 Rôle.....	12
1.5 Extraction et purification de la PPO.....	13
1.5.1 Extraction.....	13
1.5.2 Purification	16
1.6 Mécanismes réactionnels de la PPO.....	17
1.7 Les méthodes de détermination de l'activité PPO.....	21
1.8 Les substrats de la PPO.....	21
1.9 Effet du pH sur l'activité PPO.....	22
1.10 Effet de la température sur l'activité PPO.....	23
1.11 Les effecteurs de la PPO.....	23
1.11.1 Les activateurs.....	23
1.11.2 Les inhibiteurs.....	24
1.11.2.1 Méthodes physiques.....	25
1.11.2.2 Méthodes chimiques.....	25
1.12 Les applications de la PPO.....	28
Chapitre 2. Matériels et méthodes	29
2.1 Matériels.....	29
2.1.1 Matériel biologique.....	29
2.1.2 Produits chimiques.....	29
2.2 Méthodes.....	29
2.2.1 Extraction et purification de la PPO.....	29
2.2.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	31
2.2.2.1 Principe de la méthode.....	31
2.2.2.2 Mode opératoire.....	31
2.2.3 Mesure de l'activité PPO.....	32
2.2.4 Mesure de l'activité laccase.....	35
2.2.5 Etude de la stabilité de la PPO durant le stockage à -15°C	36
2.2.6 Effet du pH sur l'activité de la PPO.....	36
2.2.7 Etude de la spécificité de substrat.....	36
2.2.8 Détermination des paramètres cinétiques de la PPO.....	37
2.2.9 Effet de la concentration de l'enzyme.....	37
2.2.10 Effet des inhibiteurs.....	37
2.2.11 Etude de la stabilité thermique de la PPO.....	38
2.2.12 Étude cinétique de l'inactivation thermique de la PPO.....	39
2.2.13 Analyse des résultats expérimentaux.....	39

Chapitre 3. Résultats et discussion	40
3.1 Extraction et purification partielle de la PPO du champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i> (J.E. Lange) Imbach).....	40
3.2 Effet du pH sur l'activité PPO.....	45
3.3 Spécificité de substrat.....	47
3.4 Les paramètres cinétiques de la PPO.....	48
3.5 Effet de la concentration de l'enzyme.....	53
3.6 Stabilité thermique.....	54
3.7 Etude cinétique de l'inactivation thermique de l'activité o-diphénol oxydase.....	56
3.8 Etude cinétique de l'inhibition de la PPO d' <i>Agaricus bisporus</i> (J.E. Lange) Imbach.....	64
3.8.1 Inhibition compétitive de l'activité triphénol oxydase de la PPO du champignon de couche par l'acide benzoïque et l'azide de sodium.....	64
3.8.2 Inhibition mixte-type I de l'activité triphénolase de la PPO du champignon de couche par le fluorure de sodium.....	69
3.8.3 Inhibition mixte-type II de l'activité diphénolase de la PPO du champignon de couche par le fluorure de sodium.....	70
3.8.4 Inhibition compétitive de l'activité diphénol oxydase de la PPO de champignon de couche par l'acide benzoïque.....	72
3.8.5 Inhibition mixte-type I de l'activité diphénol oxydase de la PPO du champignon de couche par l'azide de sodium.....	73
3.8.6 Effets de l'acide benzoïque, de l'azide de sodium et de fluorure de sodium sur l'activité diphénol oxydase de la PPO de champignon de couche.....	75
Chapitre 4. Conclusion générale et perspectives	78
Références bibliographiques	80
Annexes	93

Introduction générale

Introduction générale

Le champignon de Paris (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach), communément appelé champignon de couches constitue la majeure partie des champignon cultivés et consommés dans les pays occidentaux (Royse, 1996; Tsai et *al.*, 2007; Jeong et *al.*, 2010). Ce champignon renferme une forte teneur en polysaccharides acides, en protéines, (Braaksma et Schaap, 1996), en fibres alimentaires, (Giannenas et *al.*, 2010), et en antioxydants, comprenant les vitamines C, B12 et D ; le folate; l'ergothionéine et les polyphénols, (Shi et *al.*, 2002 ; Kent et *al.*, 2003 ; Jeong et *al.*, 2010).

Par rapport à la plus part des fruits et légumes, les champignons ont une durée de conservation très courte. Ils perdent leurs valeurs commerciale et nutritionnelle en quelques jours en raison de la sénescence, la perte d'eau, l'attaque microbienne et le brunissement (Whitaker et Lee, 1995 ; Jolivet et *al.*, 1998).

Le brunissement est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréables du champignon (Varoquaux, 1978 ; Martinez et Whitaker, 1995). La prévention de cette réaction constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires (Matheis, 1987).

Le brunissement résulte de l'oxydation des phénols - tyrosine, dopamine, γ -glutaminy-4-hydroxybenzène et γ -glutaminy-3,4-dihydroxybenzène - catalysée principalement par la polyphénol oxydase (polyphénol oxydase (PPO), monophénol, o-diphénol: oxygène oxydoréductase; EC 1. 14. 18. 1), par une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (Bertrand, 1896 ; Martinez et Whitaker, 1995; Mayer et Harel, 1979) et (Vâmos-Vigyâzô, 1981 ; Casafiola-Martjn et *al.*, 2006).

En présence de l'oxygène moléculaire, la PPO présente deux activités différentes. Capable d'hydroxyler les monophénols en o-diphénols, connue sous le nom d'activité crésolasique ou monophénolasique. Ces o-diphénols, sont à leur tour oxydés pour donner des o-quinones, connue sous l'appellation d'activité catécholastique ou o-diphénoloxydasique. Ces derniers se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir appelé

mélanine (Varoquaux, 1978; Arsian et Dogan, 2005; Kolcuoglu et al., 2006).

En raison de sa participation majeure aux effets indésirables du brunissement enzymatique, la PPO est devenue l'objet de toutes les attentions des chercheurs traitant de l'agro-alimentaire.

Aussi, la PPO étant un biocatalyseur, a de multiples applications tel que: l'élimination des phénols à partir des eaux usées (Sun et al., 1992; Burton et al., 1998; Bevilaqua et al., 2002), la préparation des biocapteurs, pour la détection de la concentration des phénols dans l'eau (Pena et al., 2001; Topçu et al., 2004 ; Marin-Zamora et al., 2006), ou encore la production des o-diphénols comme la L-dopamine à partir de la L-tyrosine (Carvalho et al., 2000 ; Marin-Zamora et al., 2008).

La PPO obtenue, purifiée et caractérisée à partir de différentes sources de fruits et de végétaux, n'a été que très peu étudiée à partir du champignon de Paris. Notre étude sera consacrée par conséquent à la recherche d'une meilleure compréhension de cette enzyme extraite et partiellement purifiée à partir du champignon de Paris. En particulier, on essayera de mettre sa cinétique et sa stabilité thermique.

Ainsi, notre travail présenté en quatre chapitres est séquencé comme suit.

Le premier chapitre concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur la PPO. Dans le deuxième chapitre, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales.

Le troisième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de cette thèse. Nous présenterons les résultats obtenus de l'extraction, de la purification partielle et de la caractérisation biochimique de l'enzyme. Ensuite, nous présenterons les résultats expérimentaux du mode d'action sur l'activité o-diphénolasique des principaux procédés utilisés industriellement pour prévenir le brunissement du champignon de Paris.

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

Chapitre 1

Étude bibliographique

Chapitre 1. Etude bibliographique

1.1 Historique et perspectives sur la polyphénol oxydase

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes (Whitaker, 1995; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Vainos-Vigyâzô, 1981). La première étude sérieuse de cette enzyme a suivi la production à grande échelle de la polyphénol oxydase de pomme de terre par Kubowitz (1938). C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, 1981). La polyphénol était également la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule organique (phénolique), et elle fournit un exemple de ce qui s'appelle maintenant « inactivation suicide », mais qui s'est à l'origine nommé inactivation de réaction. Des recherches considérables ont été publiées sur l'enzyme depuis lors (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Robb, 1984 ; Escibano et *al.*, 1989).

Depuis sa découverte, la polyphénol oxydase a fait l'objet de recherches intensives. Ces recherches ont porté, d'une part sur la nature physique et chimique de l'enzyme elle-même et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans la respiration des végétaux inférieurs et supérieurs (Bonner, 1956).

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux PPOs de diverses sources comme: les truffes (Miranda et *al.*, 1992 ; Miranda et *al.*, 1996; Perez-Gilabert et *al.*, 2001; Zarivi et *al.*, 2003), les champignons (Frieden et Ottesen, 1959; Smith et Krueger, 1962; Duckworth et Coleman, 1970; Papa et *al.*, 1994a,b; Gouzi et Benmansour, 2007), la banane (Palmer, 1963; Ôba et *al.*, 1992 ; Sojo et *al.*, 1998; Thomas et Janave, 1986), les tubercules de pomme de terre (Patil et Zucker, 1965; Matheis, 1987a,b; Pathak et Ghole, 1994; Cho et Ahn, 1999a,b; Marri et *al.*, 2003), les épinards (Golbeck et Cammarata, 1981), l'artichaut (Ziyan et Pekyardimci, 2003), la poire (Ziyan et Pekyardimci, 2004), le coing (Yagar et Sairolu, 2002), la pêche (Wong et *al.*, 1971), l'abricot (Chevalier et *al.*, 1999), les feuilles de tabac (Shi et *al.*, 200) et le cerise (Kumar et *al.*, 2008).

Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte et purifiée il y'a bien longtemps (Keilin et Mann, 1938 ; Schoenbein, 1856), c'est tout récemment qu'une image claire de cette enzyme a commencé à émerger (Jolivet et *al.*, 1998).

1.2 Définition, classification et nomenclature de la polyphenol oxydase

1.2.1 Définition

Le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animale et humaine, et se rapporte au substrat 'typique', tyrosine qui était le premier substrat expérimental. La polyphénol oxydase est peut-être la dénomination générale la plus appropriée, et sera employée sous l'acronyme PPO dans ce présent travail (Dawson et Magee, 1955; Rescigno et *al.*, 2002).

1.2.2 Nomenclature

Plusieurs noms ont été associés à la PPO dont la tyrosinase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'o-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est la polyphénol oxydase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des o-quinones dans les deux cas. Les noms « tyrosinase », « phénol oxydase » et « polyphénolase » sont aussi généralement employés interchangeablement avec « la polyphénol oxydase » (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Burton, 1994 ; Rivas et Whitaker, 1973).

1.2.3 Classification

L'enzyme PPO est une oxygénase oxydoréductase (Papa et *al.*, 1994). La classification et la spécificité de cette enzyme demeure confuse et sont quelque peu ambiguës (Burton, 1994 ; Eicken et *al.*, 1999).

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB), a mis à jour la nomenclature et a placé la PPO dans deux catégories principales comme EC 1.14.18. 1-monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase. Cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 o-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 p-diphénol oxydase ou laccase, et aussi EC, 1.10.3.2 o-diphénol: o2 oxydoréductase.

Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Mayer, 1987 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

De nos jours, on accepte généralement que la PPO (PPO: monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine: oxygène oxydoréductase; EC 1.14.18.1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions différentes en présence d'oxygène moléculaire: l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des o-diphénols aux o-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase) (Cho et Ahn, 1999a).

1.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPOs

1.3.1 Caractéristiques réactionnelles

Le groupe des PPOs comprend essentiellement deux types d'enzymes: l'o-diphénol oxydase (catéchol oxydase, tyrosinase, phénolase, polyphénol oxydase (PPO)) et la p-diphénoloxydase ou laccase. Les deux types d'enzymes sont phénol-oxygène oxydoréductases (Mayer et Harel, 1991).

1.3.1.1 La polyphénol oxydase

Activité mono phéno loxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases ou monooxygénases, catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols. Cette enzyme est appelée tyrosinase car, la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase, en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons (Varoquaux, 1978).

Activité o-diphéno loxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats o-diphénoliques en o-quinones en présence d'oxygène, est catalysée par l'activité o-diphénoloxydase également appelée, catécholase ou catécholoxydase. Les o-quinones, sont des composés fortement réactifs. Elles peuvent, soit subir spontanément en solution aqueuse des polymérisations et cyclisations non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène, noir, brun ou rouge; généralement

appelé mélanine, soit réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés (Dicko et *al.*, 2002 ; Cho et Ahn, 1999a; Burton, 1994).

Les préparations enzymatiques de la PPO obtenues à partir de plusieurs espèces possèdent l'activité crésolase et/ou catécholase (Burton, 1994 Thomas and Janave, 1986).

1.3.1.2 La laccase (E.C. 1.10.3.2)

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

Nous pouvons distinguer les *o*- des *p*- diphénoloxydases en fonction de leur spécificité de substrat et/ou d'inhibiteur. Un taux d'oxydation différent pour le cuivre du site actif, ainsi que des différences dans les mécanismes réactionnels de catalyse enzymatique, peuvent en partie expliquer les taux d'inhibition différents de ces deux enzymes pour le même inhibiteur. Par exemple, la laccase n'est pas inhibée par le monoxyde de carbone, la phénylhydrazine ou le 2,3-naphtalènediol qui sont de puissants inhibiteurs de la catécholoxydase (Keilin et Mann, 1940).

Un résumé de ces différentes activités PPO est présenté dans la Figure 1.

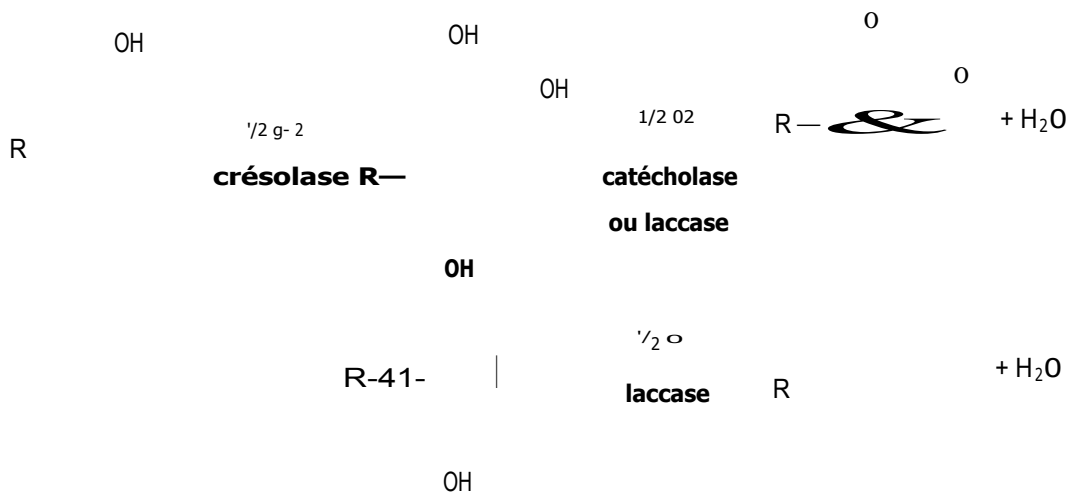


Figure 1 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénol oxydases.

1.3.2 Caractéristiques structurales

1.3.2.1 Architecture moléculaire globale

La structure cristallographique de la PPO n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la PPO, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce, possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker, 2006; Siegbahn, 2003). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (Della Longa et *al.*, 1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmelwright et *al.*, 1980), et des similitudes de séquence primaires (Van Gelder et *al.*, 1997).

Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices α et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (Lerch, 1982). Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce

(*Ipomea batatas*) (Klabunde et al., 1998). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des o-diphénols et permet ainsi, un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox. Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (Mayer, 1987). Seule la structure cristalline de la PPO de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active, a été résolue (Klabunde et al., 1998).

La PPO native du champignon de couche *Agaricus bisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H, avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme H₂L₂ ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L, demeure inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure H₂L₂. Alors que la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en sous-unités L₂H. Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la PPO des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (Strothkamp et al., 1976; Robb, 1984; Zawistowski et al., 1991; Whitaker, 1995; Solomon et al., 1996; Van Gelder et al., 1997; Jolivet et al., 1998; Fan et Flurkey, 2004).

Selon Wichers et al. (1996), les sous-unités isolées H et L ne posséderaient aucune activité enzymatique. Les PPOs des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux, contiennent seulement un type de sous-unité, et sont souvent monomériques. Ces enzymes sont actives à l'état monomérique. Dans le cas de la PPO d'*A. bisporus*, la sous-unité H qui est responsable des activités catalytiques, peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (Robb, 1984 ; Jolivet et al., 1998).

Dans beaucoup de cas, les PPOs des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentes sous des formes multiples d'isoenzyme (Mayer et Harel, 1979 ; Anosike et Ayaebene, 1982). Ces formes d'enzyme, peuvent être différenciées par leur spécificité de substrat, leur pH optimum, leur stabilité thermique et leur réponse aux inhibiteurs.

1.3.2.2 Le site actif

Il a été montré, que la PPO peut avoir un site actif semblable à celui de l'oxyhémocyanine (Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2003, Baldwin et *al.*, 1992).

La PPO est une métalloenzyme vraie contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (Mayer et Harel, 1991; Turner, 1974).

La structure secondaire de la PPO est principalement α -hélicoïdale et le coeur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α (α_2 , α_3 , α_6 et α_7), (Jolivet et *al.*, 1998 ; Ros et *al.*, 1994; Decker et Terwilliger, 2000; Eicken et *al.*, 1999; Haghbeen et *al.*, 2004; Claus et Decker, 2006). Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire du cuivre. Il est entouré par les hélices, α_1 et α_4 , et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11-Cys 28 et Cys 27-Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1-50), à l'hélice α_2 (Figure 2). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α (Figure 3). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice α_2 , tandis que His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice α_3 . Le second cuivre, CuB, est coordonné par His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices α_6 et α_7 (Klabunde et *al.*, 1998). La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Figure 4) (Van Gelder et *al.*, 1997).

a1 /

a7

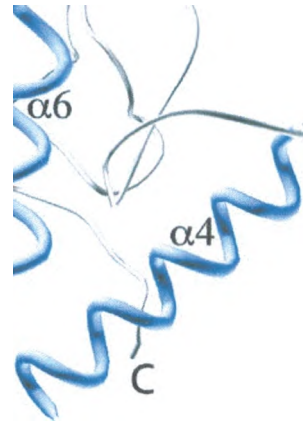


Figure 2: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome: carbone : gris, l'azote: bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et *al.*, 1999).

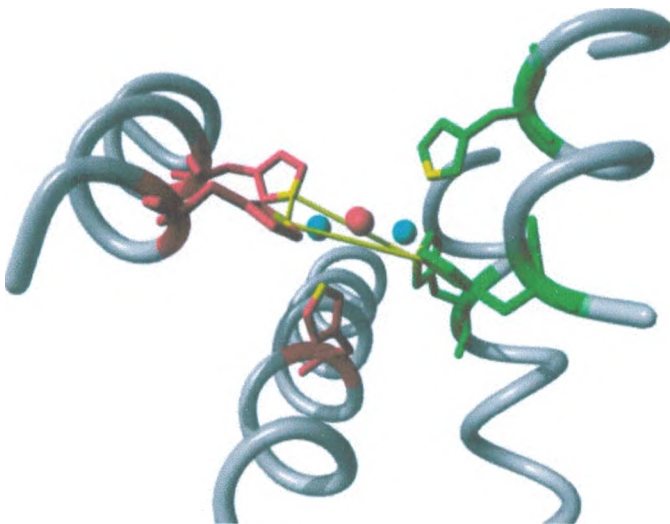


Figure 3: L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).

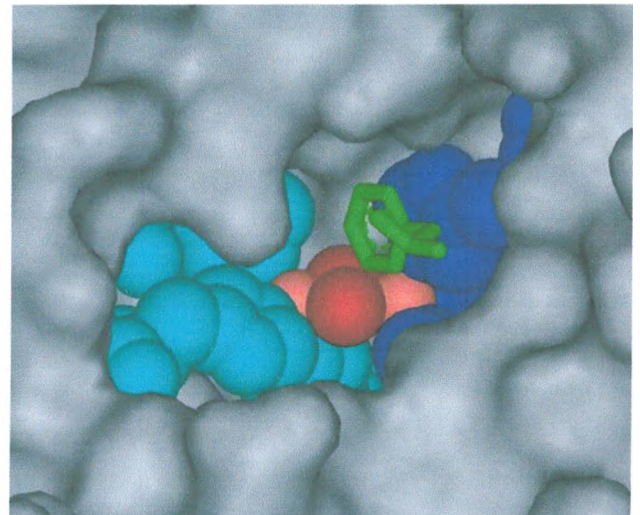


Figure 4: Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (Decker et Jaenicke, 2004).

1.4 Source, localisation et rôle des PPOs

1.4.1 Source et localisation

Les PPOs ont été découvertes initialement dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris, les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être trouvée dans les mycètes (Burton, 1994; Whitaker, 1995; Chen et Flurkey, 2002 ; Claus et Decker, 2006). La localisation subcellulaire de la PPO n'est pas clairement comprise. On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Mayer et Harel, 1979).

Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides, alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Anderson, 1968; Vaughn et Duke, 1984; Mayer et Harel, 1979; Zawistowski et *al.*, 1991. Whitaker et Lee, 1995). Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (Claus et Decker, 2006).

Les meilleures préparations des PPOs, sont issues à partir de *Streptomyces glaucescens* et des mycètes (*Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus*) (Solomon et *al.*, 1996). Le champignon commun de couleur blanchâtre *Agaricus bisporus*, est reconnu comme étant la source naturelle majeure de la PPO (Chen et Flurkey, 2002; Burton, 1994). La PPO est présente dans les différentes parties du champignon avec des proportions variables (Zhang et Flurkey, 1997). La localisation intracellulaire de la PPO d'*Agaricus bisporus* n'a pas encore été établie avec certitude (Jolivet et *al.*, 1998). Bonner (1955), a suggéré qu'elle est présente dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon. Van Gelder et *al.* 1997 ont supposé qu'elle est soluble dans le cytosol. La distribution de la PPO dans les différents parties des fruits et légumes, peut être considérablement inégale et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble dépend de l'espèce, de l'âge, et dans les fruits ou les légumes, de la maturité (Vâmos-Vigyâzô, 1981).

Le niveau de l'activité de la PPO dans les plantes dépend de l'espèce, de la maturité, de l'âge et du stockage. Dans certains cas, cette activité peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables. Cette activité est très basse dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer et Harel, 1991).

1.4.2 Rôle

Depuis la découverte en 1895, la PPO reste une énigme physiologique (Vaughn, et Duke, 1984). Plusieurs hypothèses sont proposées au sujet de sa fonction (Thygesen et *al.*, 1995 ; Steffens et *al.*, 1998). Selon Walker et Ferrar (1995), la localisation spécifique de ses formes actives, laisse supposer qu'elle intervient directement dans la photosynthèse, et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara et Katoh, 1999). En support à cette hypothèse, Lax et Vaughn (1991), ont montré que la PPO était structuralement associée au photosystème II dans la fève *Vicia faba*.

Dans les plantes, les PPOs jouent un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi, contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker, 1995). Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPOs sont largement controversés (Vaughn et *al.*, 1988 ; Mayer et Harel, 1991 ; Waiker et Ferrar, 1998) et plusieurs hypothèses sont émises au sujet de leur action. L'une des certitudes, est que les polyphénols, ont des propriétés anti-fongiques (Friedman, 1997).

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

La PPO est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Whitaker, 1995 ; Fenoll et *al.*, 2004).

Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sciérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine. Elle peut induire, des modifications anti-nutritive des protéines végétales pour en faire des antinutritionnels, décourageant les herbivores ou les microbes pathogènes (Steffens et *al.*, 1998). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Vâmos-Vigy.zô, 1981; Vaughn et Duke, 1984 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

L'activité PPO joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer et Harel, 1991). Elle est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé (Whitaker et Lee, 1995).

1.5 Extraction et purification de la PPO

Le premier compte rendu d'extraction et de caractérisation de la PPO, date d'il y à quelques décennies (Wichers et *al.*, 1995). Elle a été pour la première fois préparée presque simultanément, par Kubowitz (1938) à partir de la pomme de terre, et par Keilin et Mann (1938) à partir du champignon de couche (*Agaricus bisporus*), ou, elle a est partiellement purifiée par précipitation (Jolivet et *al.*, 1998). Plusieurs méthodes d'extraction et de purification de la PPO de champignon de couche ont été développées. Parmi les méthodes cités dans la littérature, les plus largement utilisées et qui donnent de bon rendement d'activité enzymatique sont celles: de Dawson et Magee (1955), de Frieden et Ottesen (1959), de Bouchilloux et *al.* (1963), de Nelson et Mason (1970), d'Atlow et *al.* (1984), de Papa et *al.* (1994), et de Fan et Flurkey (2004).

1.5.1 Extraction

Trois problèmes doivent être considérés avant d'extraire la PPO à partir du matériel végétal : (1) latence, (2) la solubilisation de l'activité liée à la cellule et (3) la prévention de l'oxydation enzymatique des phénols endogènes et par conséquent la précipitation de la protéine enzymatique par les polymères (Vâmos-Vigyâzô, 1981). La latence est un problème mineur avec la PPO végétale, comme dans la plupart des espèces l'enzyme est présente sous la forme active.

La PPO représente moins de 1% des protéines totales dans les fruits et les végétaux. Dans les champignons, qui sont considérés comme étant la meilleure source de la PPO, la concentration de l'enzyme est de l'ordre de 0.004%. Ce qui suppose l'utilisation de 1 kg de champignon pour avoir un rendement de 40 mg de PPO purifiée (Zawistowski et *al.*, 1991).

Les PPOs liées peuvent être solubilisées dans un milieu hypotonique, par l'utilisation d'agents chimiques tel que les détergents (Tween-80®, Triton X-100®, SDS: Sodium Dodecyl Sulfate), ou au moyen d'agents physiques comme les ultrasons (Vámos-Vigyâzô, 1981; Robb, 1984). L'extraction détersive des tissus, augmente substantiellement le niveau de l'activité PPO (Whitaker, 1995).

La solubilisation, est habituellement réalisée après préparation de poudre d'acétone ou extraction avec des détergents et autres agents. Il en résulte incontestablement une modification de la structure de l'enzyme et de ses propriétés (Mayer et Harel, 1979 ; Vámos-Vigyâzô, 1981).

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

Pendant l'extraction de la PPO, des réactions de tannage peuvent avoir lieu. Ce qui a pour conséquence la modification des propriétés de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991). Pour réduire au minimum ces risques, toutes les étapes d'extraction de la PPO, doivent être effectuées aux très basses températures (-20°C voire -30°C). Dans tous les cas, des températures inférieures à 0°C sont conseillées (Vámos-Vigyâzô, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991). Le morcellement et l'homogénéisation sont souvent faits dans l'azote liquide ou, dans l'azote exempté d'oxygène, pour réduire le plus possible les interactions protéine- phénol. Dans certains cas, la congélation rapide et la lyophilisation du matériel, sont recommandées comme premières étapes de l'extraction de l'enzyme. La précipitation par l'acétone suivie de l'extraction par un tampon, est l'une des méthodes le plus souvent utilisé.

Parfois, l'extraction avec un tampon approprié précède l'étape de précipitation par l'acétone. La précipitation par l'acétone ne produit pas d'artefacts. Une grande variété de tampons est employée pour l'extraction, et les valeurs du pH, qui changent avec la source d'enzyme, sont! en général, ajustées pour assurer un milieu légèrement alcalin. Le pH du tampon peut affecter la forme enzymatique obtenue. Afin de protéger le produit d'extraction contre l'oxydation enzymatique des polyphénols, des agents réducteurs ou des coupleurs de quinones, ainsi que des inhibiteurs réversibles d'enzymes, sont incorporés dans le milieu.

L'acide ascorbique, la cystéine, le métabisulfite de sodium, le DIECA, ou le saccharose, et parfois des mélanges de certains de ces composés, ont été employés Vâ.mos-Vigyâzô, 1981).

L'élimination des composés phénoliques endogènes des extraits de plantes, peut réduire la formation des quinones, des pigments et des mélanines indésirables dans l'extrait de PPO. Elle peut être effectuée par addition dans l'extrait enzymatique d'adsorbants de composés phénoliques tels que les résines échangeuses d'ions et le PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). Nous avons constaté que ce procédé change, dans une certaine mesure, les caractéristiques cinétiques de la PPO de champignon dans le milieu organique, mais il n'affecte pas les produits de réaction dans les milieux aqueux ou organiques (Burton, 1994).

Un moyen très efficace de prévention contre l'oxydation et la polymérisation des phénols pendant l'extraction de l'enzyme, est leur élimination par fixation à un polymère insoluble. Les pièges à phénol le plus souvent utilisés pendant l'extraction sont la polyvinylpyrrolidone (PVP), les résines échangeuses d'ions ; en raison de leurs capacités fixatrices des composés phénoliques. Elles sont également utilisées pendant la séparation des fractions subcellulaires et dans les étapes initiales de purification de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et *al.*, 1991; Ziyen et Pekyardimci, 2004). En même temps, le PVP est un inhibiteur partiellement compétitif de la PPO (Vâmos-Vigyâzô, 1981 ; Zawistowski et *al.*, 1991). Le polyéthylène glycol (PEG) est parfois préféré, à cause peut-être de sa solubilité dans l'acétone, qui présente certains avantages pour l'obtention

d'une préparation enzymatique brute. Malheureusement, le déplacement de ces phénols par des résines d'échange ionique ou d'autres composés se liant aux phénols (Bonner, 1955) peut avoir comme conséquence la perte de quelques isoformes (Smith et Montgomery, 1985). Ainsi, le séchage par l'acétone, souvent appliqué comme première étape d'extraction d'enzymes, est en même temps, un moyen puissant d'élimination des phénols, particulièrement quand ils contiennent environ 20% d'eau. Le déplacement des substances pectiques des tissus de fruit peut être réalisé par précipitation par l'acétone ou l'acétate de calcium (Vámos-Vigyázó, 1981).

L'extraction de la PPO peut être entravée par la présence d'enzymes protéolytiques endogènes, qui pourraient produire des formes multiples artéfactuelles et interconvertibles de l'enzyme. Cela a été mis en évidence lorsque l'utilisation des inhibiteurs de protéases (fluorure, Trasylol, et phénylméthylsulfonyl), qui a conduit à la diminution du nombre de forme d'isoenzymes obtenues lors de la purification de la PPO de pêche et de datte (Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

1.5.2 Purification

La purification d'une enzyme est indispensable pour connaître ses propriétés fonctionnelles et structurales (Pathak et Ghole, 1994). Cette tâche s'avère difficile à cause de la formation des o-benzoquinones qui se produisent pendant le broyage des tissus, qui réagissent rapidement en formant la mélanine, provoquant ainsi des modifications des protéines, dont la PPO (Whitaker et Lee, 1995). De plus, un autre inconvénient pour l'étude de la PPO, c'est ses proportions relativement très faibles. Ce qui complique d'avantage sa purification (Kertesz et Zito, 1962 ; Robb, 1984).

Plusieurs méthodes de purification de la PPO ont été développées (Shi et *al.*, 2001 ; Burton, 1994). Elles diffèrent selon la source de l'enzyme et selon le degré de pureté atteint. Cependant, seuls quelques PPOs ont été purifiées jusqu'à un degré d'homogénéité suffisant pour être étudié convenablement (Zawistowski et *al.*, 1991).

Après l'extraction avec un tampon approprié, l'étape de purification de la PPO, se fait par précipitation par le sulfate d'ammonium ou par solvants organiques comme l'acétone ou l'éthanol. Le plus souvent, la précipitation

par le sulfate d'ammonium à différents degrés de saturation, est suivie soit d'une chromatographie sur gel de Sephadex G-100 ou G-200, soit d'une chromatographie d'échange ionique sur des échangeurs d'anions (DEAE-cellulose ou le DEAE-Sephadex), ou enfin d'une combinaison de certaines de ces méthodes. Le DEAE-cellulose est un échangeur d'ion très utilisé pour la purification de certaines variétés de PPO. Entre chaque étape de purification, on utilise habituellement soit une dialyse, soit une ultracentrifugation, soit une chromatographie sur gel de Sephadex G-25, pour éliminer les impuretés de poids moléculaires faibles et aussi et surtout, les ions des différents tampons employés. Dans certains cas, une étape de purification est appliquée à plusieurs reprises. Par exemple, un procédé de purification de la PPO de champignon a été rapporté avec deux étapes de précipitations par du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, précédée et/ou suivie d'une chromatographie sur DEAE-cellulose (Mayer et Harel, 1979, Zawistowski et *al.*, 1991 et V.mos-Vigy.zô, 1981, on appliqué l'adsorption sur le gel de phosphate de calcium, suivie d'une chromatographie d'adsorption sur l'hydroxylapatite, pour la PPO de champignon.

Lerman en 1953, pour la première fois a purifié La PPO à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité, à base de cellulose sur laquelle des inhibiteurs phénoliques étaient greffés (acide benzoïque).

Powell et *al.* (2007) ont purifié la PPO de champignon à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité sur laquelle des ions de Cu^{2+} , de Ni^{2+} , de Co^{2+} ou de Zn^{2+} ont été fixés.

1.6 Mécanismes réactionnels de la PPO

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique, sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après Sánchez-Ferrer et *al.* (1995), le site actif des PPOs peut exister sous trois formes, selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* (CuI-CuI), *oxy* (CuII-O₂-CuII) et *met* (Cul-Cuil). La forme *met*, est convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy* résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy* (Figure 3). In *vivo*, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme, incapable de fixer l'oxygène moléculaire (Lerch, 1981). Cette forme

prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence décrite par Cabanes et *al.* (2002).

Bien que le mécanisme exact des réactions catalysées par les PPOs soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols, catalysée par les PPOs, suit une cinétique de Michaelis-Menten, tandis que l'hydroxylation des monophénols est caractérisée par une phase de latence (Sanchez-Ferrer et *al.*, 1995). Cette phase de latence peut être supprimée par un faible ajout d'*o*-diphénols (Espin et Wichers, 1999).

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

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

Dans l'activité crésolase, l'O₂ est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du *deoxyPPO* pour donner l'*oxyPPO* dans laquelle l'O₂ a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'*oxyPPO*, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau et l'intermédiaire conduisant à la formation de *PO*-quinone (Solomon et *al.*, 1996; Solomon et *al.*, 2001

Fenoil et *al.*, 2004 ; Whitaker, 1995; Mayer et Harel, 1991 ; Siegbahn, 2004; Sánchez-Ferrer et *al.*, 1995 ; Jolivet et *al.*, 1998).

Les étapes limitantes dans l'hydroxylation des monophénols pourraient être

- 1) L'attaque nucléophile du groupement OH en C-4 sur l'ion cuivre du site actif de la tyrosinase,
- 2) L'attaque électrophile du peroxyde du site actif de l'oxyPPO sur le C-3 du substrat monophénolique,
- 3) L'oxydation du o-diphénol formé à partir du monophénol (Fenoli et *al.*, 2000).

Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme *oxy* semble beaucoup plus instable que dans le cas des tyrosinases, ce qui réduit fortement l'affinité des PPO pour les mono-phénols (Eicken et *al.*, 1999). L'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (Janovitz-Klapp et *al.*, 1989).

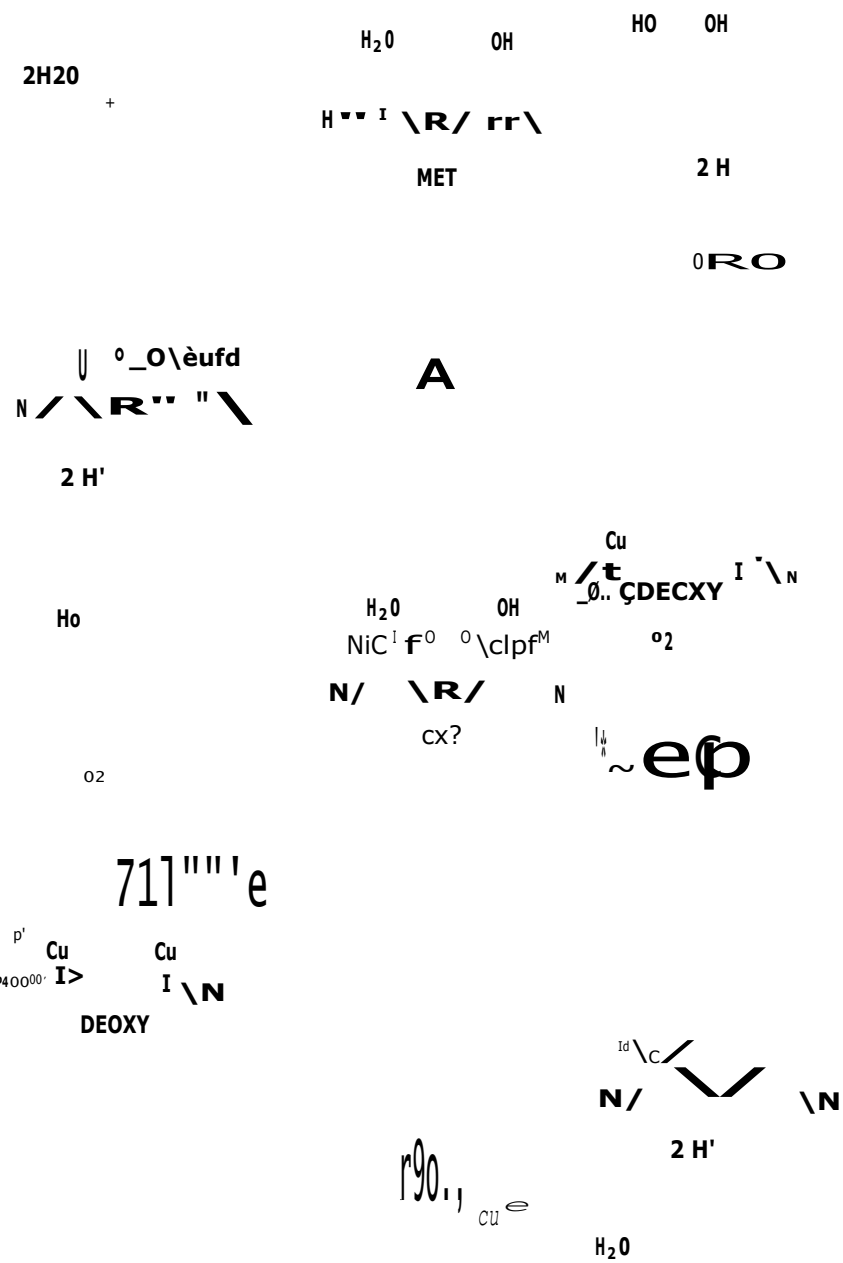


Figure 5: Schéma mécanistique de l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) de la PPO (Lerch, 1995 ; Mayer et Harel, 1991).

1.7 Méthodes de détermination de l'activité PPO

L'activité de la PPO peut être déterminée en mesurant la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit. Il est nécessaire, de limiter la mesure à la phase initiale de la réaction afin d'éviter l'inactivation de l'enzyme par le produit de la réaction (o-quinone), la diminution de la concentration du substrat, et la polymérisation du produits (Vámos-Vigyázó, 1981).

La vitesse de disparition du substrat peut être mesurer, par l'absorption de l'oxygène dissout par la technique de Warburg ou, par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène mos-Vigyázó, 1981 ; Mayer et Harel, 1991 ; Gaillard et *al.*, 1993; Naish-Byfield et Riley, 1992). La vitesse de formation du produit peut être déterminée, par méthode spectrophotométrique, en mesurant la densité optique des composés colorés (o-quinones) formés à partir des substrats. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la PPO Vâ.mos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Espin et *al.*, 1995). Une grande variété de substrats de synthèse peut être utilisée dans ce cas, par exemple: le catéchol, le 4-méthylcatéchol, le pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique Vâmos-Vigyázó, 1981). La meilleure méthode pour étudier la réaction crésolase, est la mesure de la production d'eau dans le milieu contenant du tritium à partir du [2.6- ³H] monophénol tel que la [3.5- ³H] tyrosine (Mayer et Harel, 1991 ; Jolivet et *al.*, 1998). On peut également déterminer !la vitesse de perte d'agents réducteurs tel que l'ascorbate à 265 nm ($c = 15300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ou le NADH à 340 nm ($c = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Mayer et *al.*, 1966 ; El-Bayoumi et Frieden, 1957 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

1.8 Les substrats de la PPO

Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphénol oxydase (catécholase), peuvent catalysées une grande variété des substrats (Whitaker, 1995). La PPO présente différentes affinités vis-à-vis du même substrat selon la source de son obtention tel que, l'espèce, le genre, le *cultivar*, ou également le tissus (Zawistowski et *al.*, 1991).

La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine, et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels de la PPO trouvés dans les fruits et légumes (Zawistowski et *al.*, 1991, Vámos-Vigyázô, 1981 ; Trebst et Depka, 1995).

Le type et la position des substituants présents sur les mono- et les o-dihydroxy phénols, sont également des causes importantes déterminant la réactivité du substrat. Pour les mêmes substrats, de grandes différences dans les paramètres cinétiques (K_m et V_m) sont constatées selon la source et la pureté de l'enzyme (Zawistowski et *al.*, 1991).

A titre d'exemple, la substitution en position 3 du 3-méthyl catéchol, cause une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat à cause de la gêne stérique. La présence d'un groupement donneur d'électron en position 4 comme le 4-méthyl catéchol ou l'acide chlorogénique, augmente la réactivité du substrat, alors que celle d'un groupement attracteur d'électron, comme le 4-nitrocatechol ou le 3,4-dihydroxy acide benzoïque, réduit la réactivité du substrat (Vámos-Vigyázô, 1981).

Le catéchol est le substrat phénolique le plus simple de la PPO puisqu'il possède la structure de base des o-dihydroxyphénols. Ceci ne signifie plus qu'il s'agissait d'un meilleur substrat pour l'enzyme. Toute substitution sur le cycle aromatique (position et la nature du substituant) affecte la vitesse de la réaction enzymatique.

1.9 Effet du pH sur l'activité PPO

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la PPO, varie avec la source de l'enzyme et aussi en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des PPOs étudiées il est compris entre pH 4 et 8 (Mayer et Harel, 1979). Plusieurs paramètres affectent cette valeur. Nous pouvons citer le type de tampon, la pureté de la préparation enzymatique et le stade de maturité du fruit ou du végétal. L'étude du pH peut nous fournir des informations sur l'identification des activateurs ou sur les résidus du substrat susceptibles d'être ionisés, nécessaires pour sa fixation et sa transformation (Kuby, 1991).

Le changement de pH du milieu réactionnel modifie la réaction enzymatique de la PPO par: (1) l'inactivation de l'enzyme à cause du

changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés impliquées dans la réaction catalytique, (2) le changement de l'état d'ionisation du substrat, et/ou (3) la modification de l'équilibre de la réaction lorsque les protons H ou les hydroxyles OH sont impliqués.

1.10 Effet de la température sur l'activité PPO

L'effet de la température sur l'activité des PPOs n'a pas été très étudié, comparativement parlant à l'effet du pH (Joslyn et Ponting, 1951; Vâmos-Vigyâzô, 1981). Amiot et *al.* (1997) ont montré que la PPO n'est pas une enzyme thermostable. En effet, des traitements thermiques de courtes durées en solution ou dans des produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C, suffisent dans la plupart des cas à la destruction irréversible, partielle ou totale, de sa fonction catalytique (Vâmos-Vigyâzô, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Yemeniciolu et Cemeroglu, 2003). La diminution d'une partie de l'activité de la PPO après chauffage à une basse température n'est pas étonnante (Yemenicioglu, 2002). Sa tolérance thermique dépend également de la spécificité du substrat, du pH optimal, de la température, et aussi et surtout de la source d'enzyme et du cultivar Vâmos-Vigyâzô, 1981; Yemenicioglu et Cemeroglu, 2003). L'inactivation thermique de la PPO peut être considérée comme étant une forme d'inhibition de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991).

1.11 Les effecteurs de la PPO

1.11.1 Les activateurs

La PPO peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, les acides gras, les alcools, les protéases et par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), (Seo et *al.*, 2003; Pérez-Gilabert et *al.*, 2004; Gandja-Herrero et *al.*, 2005). Ce dernier (SDS), peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la PPO de champignon de couche (*Agaricus bisporus*) (Espjn et Wichers, 1999).

Il a même été montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées. De même, l'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (Vâmos-Vigyâzô, 1981; Fan et Flurkey, 2004; Van Leeuwen et Wichers, 1999).

1.11.2 Les inhibiteurs

Le contrôle de l'activité de la PPO, est important pour la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux et fruits (Jolivet et *al.*, 1998; Qiu et *al.*, 2009). Les inhibiteurs de la PPO, ont été employés en tant qu'agents de dépigmentations pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation. Par conséquent, les inhibiteurs de la PPO sont censés avoir de larges applications dans les industries médicales (Mosher et Pathak, et Fitzpatrick, 1983) et cosmétiques (Maeda et Fukuda, 1991). Dans l'industrie alimentaire, les inhibiteurs de la PPO peuvent être employés comme des conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale. En outre, la PPO est l'une des plus importantes enzymes impliquée dans le processus muant d'insecte. La découverte des inhibiteurs de cette enzyme peut être ainsi, importante pour le développement de nouvelles alternatives concernant le contrôle des insectes (Likhitwitayawuid, 2008).

L'inhibition de la PPO responsable du brunissement de la plupart des produits alimentaires est une préoccupation majeure des industries alimentaire. Dans l'industrie alimentaire, la toxicité relative au mode d'inhibition choisie, le coût de la méthode et/ou des composés chimiques, et l'acceptation de la méthode par le consommateur, des composés chimiques et le produit final aident à la sélection de la méthode d'inhibition (Barthet, 1997). En théorie, le brunissement des fruits et des légumes par la PPO peut être empêcher par l'inactivation thermique de l'enzyme, par l'élimination de l'un des deux substrats nécessaires pour la réaction (O₂ et/ou les composés phénoliques), par l'abaissement du pH de 2 unités ou plus au-dessous du pH optimum, par des réactions d'inactivation de l'enzyme ou par l'addition des composés qui inhibent la PPO ou qui empêchent la formation de la mélanine (Vâmos-Vigyâzô, 1981 ; Whitaker et Lee, 1995).

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

1.11.2.1 Méthodes physiques

Les traitements thermiques, sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments, en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Les traitements thermiques de courtes durées aux températures comprises entre 70- 90°C, de la PPO en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction catalytique (Vâmos-Vigyâzô, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Yemenicioglu et Cemerolu, 2003).

Plusieurs études ont montré que la PPO obtenue à partir de diverses source est inactivée thermiquement (Yemeniciolu et *al.*, 1997 ; McCord et Kilara, 1983; Weemaes et *al.*, 1998a,b; Soysal, 2008). L'inconvénient majeur du traitement thermique réside dans la production du mauvais goût et l'apparition d'une coloration indésirable causés par la réaction de Maillard.

La combinaison du traitement thermique avec d'autres méthodes physiques tels que la pression, les micro-ondes ou les ultrasons pouvons induire une inactivation réversible ou irréversible de la ppo à des températures relativement basses, en particulier lorsqu'il s'agit d'un produit sensible à la chaleur (Terefe et *al.*, 2009 ; Weemaes et *al.*, 1998 ; Buckow et *al.*, 2009 ; Rapeanu et *al.*, 2005 ; Devece et *al.*, 1999).

Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique.

1.11.2.2 Méthodes chimiques

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la PPO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source d'enzyme, de la disponibilité du substrat (O₂ et substrat phénolique) et du pH et de la température (Zawistowski et *al.*, 1991).

Il est commode de diviser les inhibiteurs de la PPO en trois catégories:

1) Les agents de chélation généraux pour le cuivre : petites molécule ou ions qui se lient au centre de cuivre dans le site actif compétitif en ce qui concerne l'oxygène,

- 2) les inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique,
- 3) les analogues des phénols compétitives vers des substrats (phénol et/ou diphéol) (Robb, 1984; Burton, 1994).

Les inhibiteurs de synthèse

Puisque la PPO est une métalloprotéine, elle peut être inhibée par des agents chélateurs de métal tels que le cyanure, le monoxyde de carbone, le diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA), l'éthylène diamine tétra-acétique acide (EDTA), le 2-mercaptobenzothiazole, l'azide, le méthyle xanthate de potassium, l'acide kojique, L-mimosine et le tropolone Vámos-Vigy. zô, 1981; Jolivet et *al.*, 1998; Anderson et Morris, 2001 ; Gasowska et *al.*, 2002 ; Mayer et Harel, 1979).

Les ions inorganiques, y compris les halogénures, sont également capables d'inhiber les PPOs de beaucoup de sources. Les inhibiteurs potentiels des PPOs de champignon, de cerises, de pommes, de poire, d'abricot et de pommes de terre sont principalement les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques, les acides carboxyliques, le dihydrate de phloridzine et certains acides cinnamiques substitués. Les ions halogénures se comportent comme étant des inhibiteurs purement compétitifs vis-à-vis de la fixation du dioxygène (Rescigno et *al.*, 2002; Robb, 1984).

L'acide ascorbique peut également agir directement sur la PPO du champignon par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu^2 en Cu Vámos-Vigy zô, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991).

En outre, les composés qui ne ressemblent pas à la structure de substrat (exemple : le 4-nitrophenol, la phénylalanine et le 4-chlorophénol) et qui sont lentement oxydés, ont été identifiés comme des inhibiteurs compétitifs de la PPO. Les analogues de substrat comme les acides aromatiques, tel que l'acide benzoïque et l'acide cinnamique, se comportent habituellement comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du substrat phénolique (Robb, 1984; Jolivet et *al.*, 1998; Gasowska et *al.*, 2002; Janovitz-Klapp et *al.*, 1990).

L'inhibition de la PPO est également provoquée par des agents réducteurs parmi lesquels, les sulfites ; SO₂; l'acide ascorbique, l'acide érythorbiques et les composés à fonction thiol (Kahn, 1985; Zawistowski et *al.*, 1991). Les composés à fonction thiol, comme la L-cystéine, le glutathion, le dithiotreitol, le mercaptoéthanol et le thiourée, sont des inhibiteurs efficaces de la PPO de plusieurs sources (Zawistowski et *al.*, 1991; Burton, 1994 ; Rescigno et *al.*, 2002).

Les polymères solubles tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP), agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs de la PPO, mais on sait pas s'il agissent sur l'enzyme liée au phénol ou sur l'enzyme (Jolivet et *al.*, 1998 ; Vâmos-Vigyâzô, 1981).

Les acides aminés, peptides et protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement la PPO, soit en réagissant avec les o-quinones (McEvily et *al.*, 1992). Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu²⁺ du site actif de la PPO (O'Sullivan, 1969).

Les cyclodextrines peuvent inhibées la PPO par fixation sur le substrat phénolique (Irwin et *al.*, 1994). L'acide citrique inactive la PPO par deux mécanismes: élimination du cuivre du site actif et par la diminution du pH du milieu (MeEvely et *al.*, 1992). La grande majorité de ses inhibiteurs n'est pas spécifique seulement pour les PPO (Mayer et Harel, 1991).

Les inhibiteurs naturels

Les plantes sont considérées actuellement, comme étant une source potentielle d'inhibiteurs de la PPO (Baurin et *al.*, 2002). Un certain nombre d'inhibiteur de la PPO, de source naturelle ont été identifiés. Ils appartiennent à deux grand groupes: les polyphénols et les aldéhydes et d'autres dérivés (Rescigno et *al.*, 2002; Chang, 2009). Parmi les composés isolés et considérés comme des inhibiteurs puissants de la PPO, nous pouvons cité, le cuminaldéhyde, l'oxyrésveratrol, le kaempferol, la quercétine, la morine, la lutéoline, l'ansaldéhyde, la kurarinone et l'acide gallique (Parvez et *al.*, 2007).

1. 12 Les applications de la PPO

La PPO est l'une des enzymes ayant de multiples applications. Elle est utilisée dans la production des o-diphenols comme la L-dopamine et le catéchol (Min et *al.*, 2010; Seetharam et Saville, 2002 ; Marin-Zamora et *al.*, 2009 ; Tuncagil et *al.*, 2009).

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

Dans le domaines agroalimentaire et environnemental, les biocapteurs à tyrosinase peuvent être utilisé également pour le dosage de certains polluants chimiques (Durân et Esposito, 2000), comme le cyanure (Shan et *al.*, 2004), l'acide benzoïque (Li et *ai.*, 2010), l'azide de sodium (Cui et *al.*, 2006), et le fluorure de sodium (Asav et *ai.*, 2009).

La PPO sous forme soluble ou immobilisée est largement utilisée pour la dégradation du phénol et ses dérivée au niveau des eaux usées (Yamada et *ai.*, 2005 ; Seetharam et Saville, 2003 ; Ikehata et Nicell, 2000).

Chapitre 2.

Matériels et méthodes

Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.1 Matériels

2.1.1 Matériel biologique

Le champignon de couche *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach est utilisé comme source de la polyphénol oxydase (PPO). Le champignon doit être blanc, frais, jeune et petit si possible (Figure 6).



Figure 6: Champignon de couche *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach.

2.1.2 Produits chimiques

La L-tyrosine, le pyrogallol et le pyrocatechol sont fournis par Fluka. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude, sont d'un grade analytique.

2.2 Méthodes

2.2.1 Extraction et purification de la PPO

L'extraction et la purification de la PPO de champignon de couche suit le protocole indiqué par Dawson et Magee (1955). Il comporte trois étapes principales : extraction, précipitation par l'acétone à 99.5 % et précipitation par le sulfate d'ammonium (60 % de saturation).

Etape 1. Préparation de l'extrait brut

745.5 g de champignon frais sont lavés abondamment à l'eau distillée afin d'éliminer les résidus du sol, séchés à l'air libre, découpés et broyés pendant 2 min à l'aide d'un broyeur dans 1230 ml d'acétone, préalablement refroidie à -15°C afin d'éliminer les phénols endogènes, les composés chromogènes et pour enlever l'eau (Nelson and Mason, 1970; Ben-Shalom et al., 1977; Vâmos-Vigyâzô, 1981). La suspension de pulpe est filtrée à travers quatre couches de gaze et est pressée manuellement jusqu'à l'obtention d'un résidu sec dit poudre d'acétone. La pulpe pressée, pesant 93.5 g est refroidie au contact avec de la glace pendant au moins 4 heures. Elle peut être conservée par congélation pendant plusieurs mois si désiré. La pulpe froide est ensuite broyée et suspendue dans environ 960 ml d'eau distillée, puis laisser une nuit à 5°C dans un réfrigérateur. La suspension est filtrée à travers de la gaze, et la pulpe qui se dépose sur le tissu est pressée à sec manuellement.

Le filtrat obtenu (800 ml) est ensuite filtré deux fois sur le papier Whatman N°1, sous vide, à l'aide d'un filtre Büchner, pour pouvoir éliminer au maximum les particules solides restantes. Il constitue l'extrait brut.

Etape 2. Fractionnement par l'acétone (99.596)

1200 ml d'acétone (99.5%) sont ajoutés au 800 ml d'extrait brut. Le précipité qui en résulte est filtré sur la célite. La célite offre quelques avantages lors de la purification de la PPO, car elle est susceptible de former des liaisons spécifiques avec les protéines à cuivre (Mayer et Harel, 1979). Le précipité et la pâte de célite sont mis en suspension et agités dans 252 ml d'eau distillée froide (5°C) pour redissoudre les protéines. La solution est filtrée encore une fois sur une autre pâte de célite. Le filtrat (224 ml) est placé dans un réfrigérateur à 5°C.

Etape 3. Précipitation par le sulfate d'ammonium à 60% de saturation

103.6 g de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ sont dissous dans les 224 ml de solution froide, préparée dans l'étape 2 pour obtenir une solution à 60 % de saturation. Après agitation durant quelques minutes, le mélange est filtré sur la célite. Les protéines précipitées sur la pâte sont lavées avec une solution froide de (NH₄)₂SO₄ à 0.35 M. Les protéines précipitées sont ensuite

redissoutes par agitation dans environ 100 ml d'eau distillée froide, comme dans l'étape 2.

Les extraits enzymatiques ainsi obtenus sont divisés en petites parties dans des tubes Eppendorf et conservés à -15°C dans un réfrigérateur. On a observé que l'activité crésolase diminue après le stockage prolongé des extraits enzymatiques.

2.2.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Afin de pouvoir établir le tableau de purification et de déterminer le taux et le rendement de purification au cours des étapes d'extraction et de purification des activités enzymatiques, la quantité de protéines contenue dans chaque extrait enzymatique est dosée selon la méthode de Lowry et *al.* (1951). Les concentrations protéiques ont été calculées par interpolation linéaire, à partir d'une gamme étalon contenant de l'albumine sérique bovine.

2.2.2.1 Principe de la méthode

Le groupe phénolique des résidus tyrosine d'une protéine, produit une couleur bleu- pourpre, avec un maximum d'absorption dans la région de longueur d'onde 660 nm avec le réactif de Folin-Ciocalteu (à base de tungstate de sodium, molybdate et phosphate). La méthode est sensible à moins de 10 jig/ml et elle est certainement la méthode de dosage des protéines la plus répandue, bien qu'elle soit seulement relative. Le principe de cette méthode, est la production d'ions cuivreux qui réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu. La réaction dépend aussi du pH et il est essentiel de travailler dans une gamme de pH compris entre 10.0 à 10.5 (Wilson et Walker, 1996).

L'addition au réactif d'une certaine quantité de cuivre (méthode de Lowry), augmente considérablement la sensibilité de la méthode (100 fois plus sensible que la réaction de Biuret). Cette méthode, ne présente d'intérêt que pour un travail semi-quantitatif appliqué à des protéines en solution diluée (Métais, 1979).

2.2.2.2 Mode opératoire

Au temps (t_{po}), dans des tubes à essais on ajoute 20 il d'échantillon à doser, dilué 6 fois dans de l'eau distillée à 0.5 ml de réactif (A) (Annexe 1).

On mélange les tubes au vortex et on laisse incuber 10 minutes à température ambiante. Au temps (t_{po}+ 10 mm), on ajoute 2 ml de réactif (B) (Annexe 1) dans chaque tube. Les tubes sont placés au bain-marie réglé à 50°C pendant 5 minutes puis refroidis rapidement sous l'eau froide. La lecture de la densité optique est effectuée à 650 nm contre un blanc réactif. Une courbe d'étalonnage, établie à partir de diverses dilutions d'une solution mère d'albumine sérique bovine à 1 g/l, permet de déterminer la concentration en protéines (Figure 7).

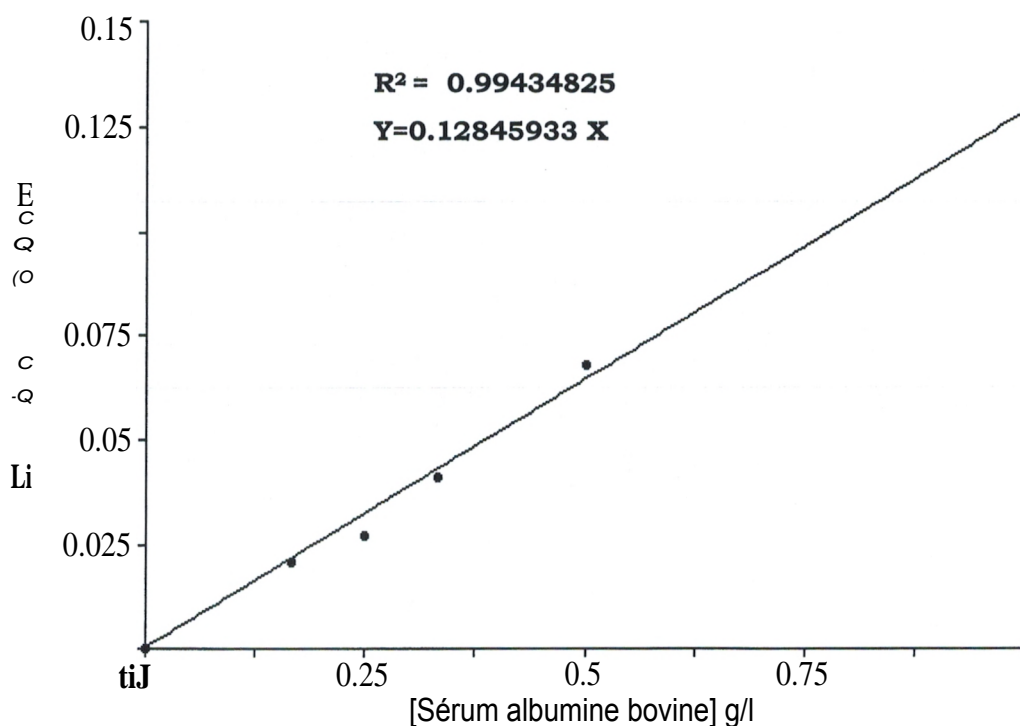


Figure 7: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et *al.* (1951).

2.2.3 Mesure de l'activité PPO

Les activités crésolase et catécholase de la PPO, sont déterminées par la mesure directe de la formation des o-quinones, à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 6405 UV/Vis) en présence oxygène/aire (Espin et *al.*, 1995).

L'activité crésolase est mesurée à 475 nm en utilisant la L-tyrosine comme substrat monophénolique (Pérez-Gilabert et *al.*, 2001).

La vitesse à l'état stationnaire (V_o), est calculée après la phase de latence (t_i), à partir de la partie linéaire de la courbe d'absorbance, en fonction du temps (Figure 8). Le milieu réactionnel contient, 0.1 ml de solution d'enzyme et 2 ml de la L-tyrosine à 2.5 mM, préparée dans du tampon phosphate de sodium à 0.1 M et à pH 7.0.

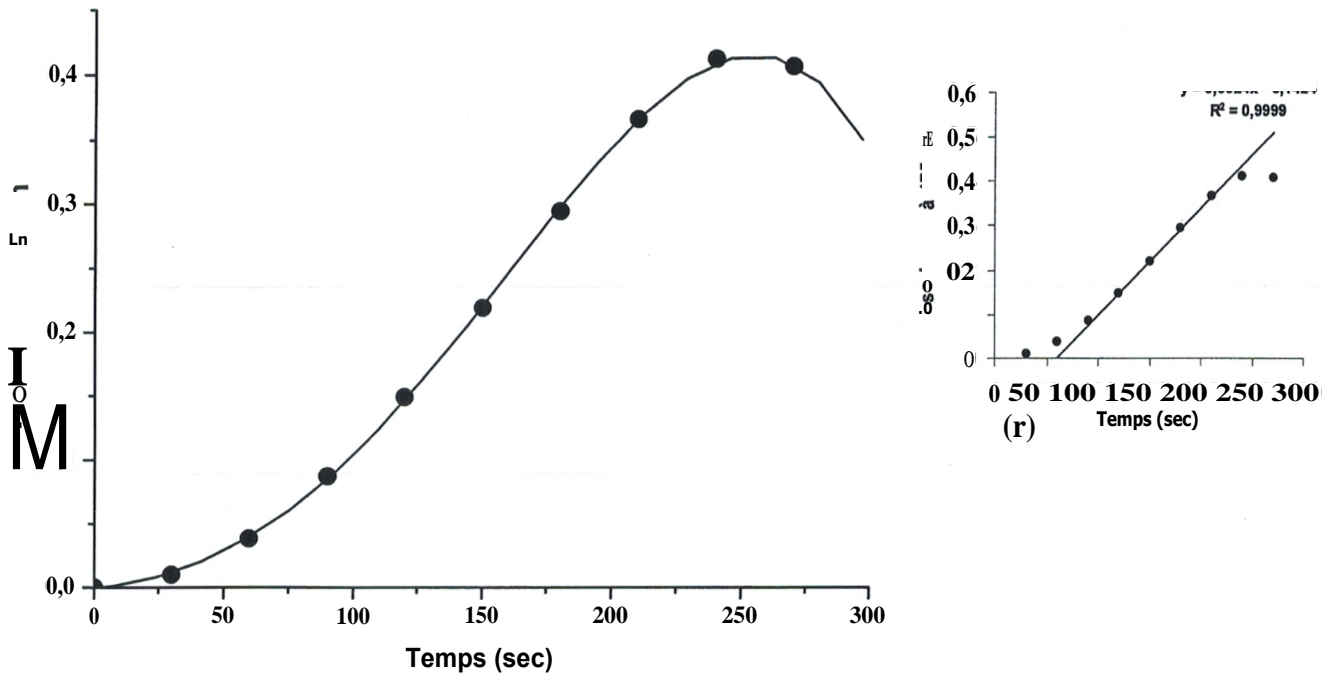


Figure 8: Variation de l'absorbance à 475nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation de la L-tyrosine par l'extrait brut de la PPO du champignon de Paris. Conditions expérimentales : tampon phosphate de sodium 0.1 M, pH 7; température 30°C; L-tyrosine 2.5 mM; volume réactionnel 2 ml; volume de l'enzyme 0.1 ml.

L'activité catécholase a été suivie par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 410 nm ou à 420 nm pour le pyrocatechol (Figure 9) ou le pyrogallol (Figure 10) comme substrats, respectivement (Fan et Flurkey, 2004 ; Dnez et *al.*, 2008).

La vitesse initiale (V_o), est calculée à partir de la pente de la courbe de l'absorbance en fonction du temps (Figures 9-10) (Ûnal, 2007).

La solution mère de pyrogallol ou de pyrocatechol à 0.1 M, est préparée dans de l'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM (Fan et Flurkey, 2004). Pour l'activité catécholase, le milieu réactionnel contient 2 ml de substrat à 20 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par ajout de 5 µl de solution d'enzyme. Les solutions d'enzyme et de substrat, doivent être pré incubées pendant 5 min dans un bain marie à 30°C avant d'être mélangées.

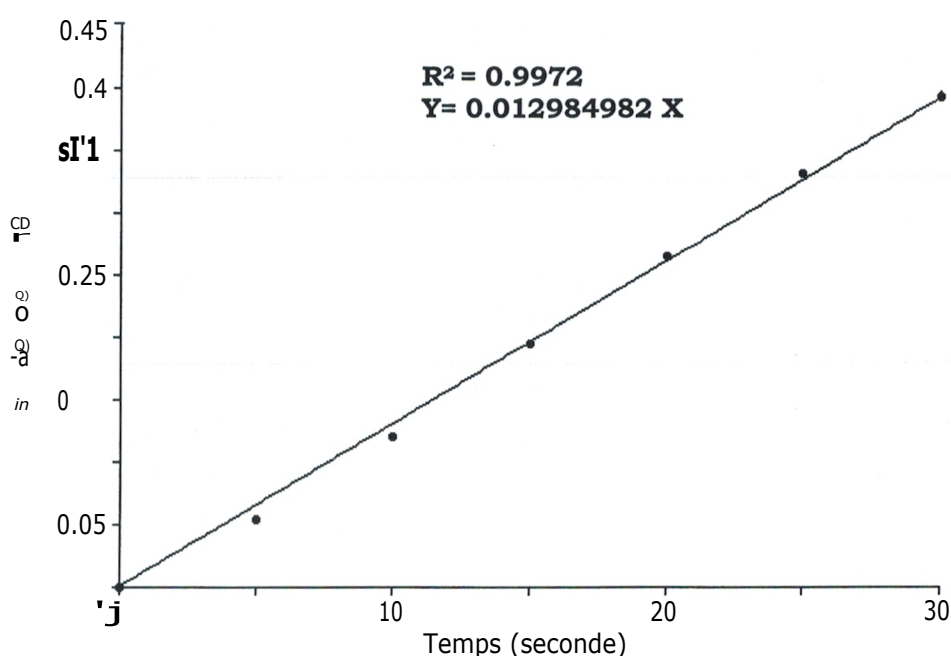


Figure 9: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol par la PPO (Pyrocatechol à 20 mM, volume de l'extrait enzymatique 5 µl (extrait brut), tampon phosphate de sodium 0.1 M-pH 7.0, température 30°C, volume du milieu réactionnel 2 ml).

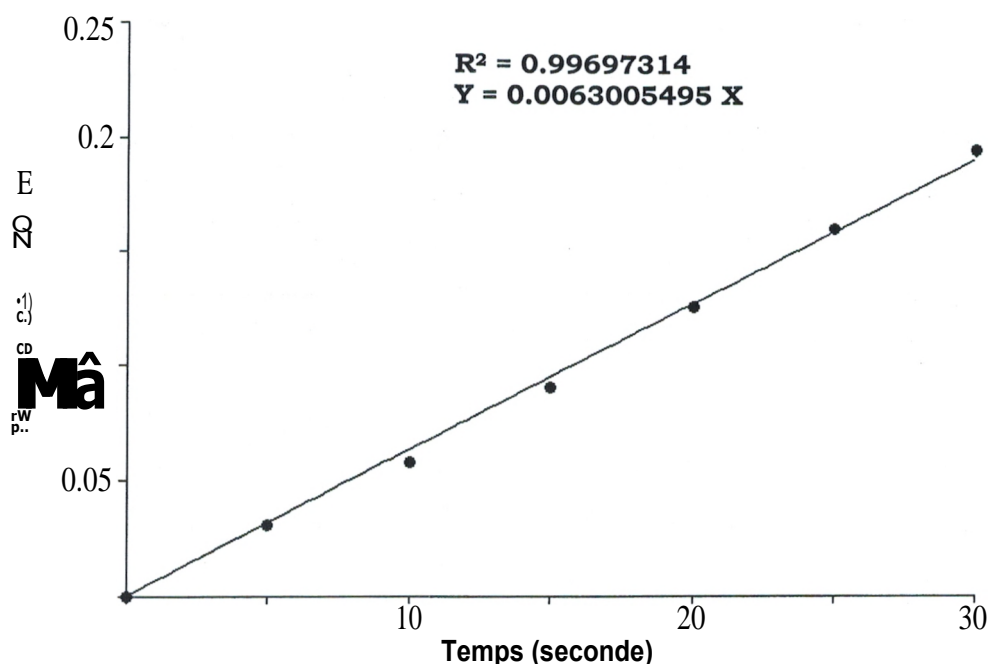


Figure 10: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par la PPO (Pyrogallol à 20 mM, volume de l'extrait enzymatique 5 .il (extrait brut), tampon phosphate 0.1 M-pH 7.0, température 30°C, volume réactionnel 2 ml).

2.2.4 Mesure de l'activité laccase

La mesure de l'activité laccase a été effectuée à 30°C dans 2 ml de tampon citrate (pH 3.5), contenant 50 µg de guaïacol (0.1 ml de la solution mère de guaïacol (98 %) dans 10 ml de méthanol). L'oxydation est suivie à 470 nm après l'addition de 75 µl d'extrait enzymatique (Zhang et Flurkey, 1997; Johannes et Majcherczyk, 2000).

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

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois et, c'est leurs valeurs moyennes qui sont représentées.

2.2.5 Etude de la stabilité de la PPO durant le stockage à -15°C

Les extraits enzymatiques brut et partiellement purifiés sont stockés dans un réfrigérateur à -15°C. Leurs activités PPO est mesurée chaque 2 jour pendant 45 jours de stockage. Les conditions de mesure de l'activité enzymatique sont: pyrogallol à 20 mM, 5 µl de solution d'enzyme, pH 7.0 (tampon phosphate de sodium à 0.1 M) et à 30°C).

2.2.6 Effet du pH sur l'activité de la PPO

La détermination du pH optimum de l'extrait brut et partiellement purifiés, a été effectuée dans du tampon citrate-phosphate à 0.1 M, dans une gamme de pH comprise entre 3.15 et 5.3 et dans du tampon phosphate à 0.1 M, dans une gamme de pH comprise entre 6.0 et 8.0. L'activité catécholase a été mesurée à 30°C en présence du pyrogallol à 20 mM comme substrat.

L'activité PPO a été aussi mesurée à 30°C dans une gamme de pH comprise entre 3.75 et 8.15, en utilisant le tampon citrate-phosphate à 0.1 M en présence du pyrocatechol à 20 mM comme substrat.

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

Une autoxydation négligeable du pyrogallol et du pyrocatechol a été produite dans les essais standards au pH inférieur ou égale à 7.0. Les activités enzymatiques mesurées à des pH supérieurs à 7.0, on été corrigées à cause de l'autoxydation du pyrogallol en purpurogalline et le pyrocatechol en o-benzoquinone (Abrash, 1989; Palmer, 1963).

Chaque essai d'activité a été répété trois fois en utilisant la même solution mère de l'extrait enzymatique brut ou partiellement purifié.

2.2.7 Etude de la spécificité de substrat

La spécificité de substrat a été déterminée par l'utilisation de cinq différents substrats potentiels de la PPO d'un grade commercial (L-tyrosine (475 nm), phénol (390 nm), pyrocatechol (410 nm), pyrogallol (420 nm), phloroglucinol (390 nm)). Les activités mono-, di- et triphénol oxydase de l'extrait brut de la PPO ont été mesurée à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.1 M) et à 30°C.

La vitesse initiale de la réaction a été mesurée à partir de la partie rectiligne de la courbe de l'augmentation de l'absorbance en fonction du temps due à la formation des o-quinones à partir de chaque substrat.

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

2.2.8 Détermination des paramètres cinétiques de la PPO

Pour la détermination de la constante de Michaelis-Menten (K_m), de la constante d'inhibition par excès de substrat (K_s) et la vitesse maximale (V_{max}) de l'enzyme, les activités de la PPO ont été mesurées à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium à 0.1) et à 30°C, pour le pyrogallol (420 nm) et le pyrocatechol (410 nm), à différentes concentrations de substrat comprises entre 0.1 à 50 mM. Les valeurs de K_m , K_s et V_m de la PPO, pour chaque substrat, ont été estimées à l'aide des représentations graphiques de Michaelis-Menten (v_o vs $[s]$) et de Lineweaver-Burk (1934) ($[s]/v_o$ vs $[s]$). Pour déterminer l'efficacité catalytique ou le pouvoir catalytique de l'enzyme, le rapport V_{max}/K_m a été calculé à partir des données obtenues à partir du graphique de Lineweaver-Burk.

Tous les essais expérimentaux ont été répétés trois fois et les valeurs moyennes ont été représentées.

2.2.9 Effet de la concentration de l'enzyme

L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse d'oxydation du pyrogallol (20 mM) à été étudié par la mesure de la vitesse initiale pour des volumes croissants de l'extrait brut de la PPO compris entre 0.5 et 6.5 il. L'activité enzymatique à été mesurée à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.1 M) et à 30°C.

2.2.10 Effet des inhibiteurs

Pour déterminer l'effet des inhibiteurs (acide benzoïque (0.05 et 0.1 mM), azide de sodium (1 et 2.5 mM), fluorure de sodium (40 et 100 mM)), l'activité de la PPO a été mesurée dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations constantes de chaque inhibiteur et à différentes concentrations de pyrocatechol comprises entre 0.125 à 1 mM.

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

Les constantes d'inhibition (K_i et K_{is}) ont été calculées à partir des graphes secondaires des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur, comme c'est décrit précédemment (Chen et *al.*, 1998). K_i et K_{is} représentent les constantes de dissociation du complexe Enzyme-Inhibiteur (EI) et du complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur (ESI), respectivement.

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

Pour déterminer la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC₅₀), l'activité de la PPO a été mesurée à 25°C et pH 7.0 (tampon phosphate 0.1 M), en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs pour une concentration constante de pyrocatechol (0.4 mM). Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (Chen et *al.*, 1998).

2.2.11 Etude de la stabilité thermique de la PPO

L'activité résiduelle de la PPO (A_t) a été évaluée après incubation des tubes à hémolyse de 1 mm d'épaisseur, contenant 1 ml d'extrait enzymatique brut pendant 30 minutes dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 et 70°C.

Après chauffage, les échantillons sont refroidis rapidement dans l'eau glacée et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) et à 30°C, en présence de 20 mM de pyrocatechol comme substrat.

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

$$\text{Activité enzymatique relative (\%)} = \left(\frac{A}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{Equation (1)}$$

Où

A_0 : est l'activité enzymatique initiale;

A : est l'activité enzymatique résiduelle à l'instant t .

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

2.2.12 Étude cinétique de l'inactivation thermique de la PPO

La cinétique d'inactivation thermique de la PPO a été étudiée par incubation des tubes à hémolyse de 1 mm d'épaisseur, contenant 1 ml d'extrait enzymatique brut dans un bain marie réglé à différentes températures: 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 67.5°C, 70°C et 73°C.

Des prélèvements de 100 μ l ont été effectués à différents intervalles fixes de temps, refroidis et leurs activités enzymatiques résiduelles mesurées.

Le pourcentage de l'activité résiduelle de la PPO est calculé par rapport à l'activité initiale de l'enzyme non traité thermiquement (Doan et al., 2005).

2.2.13 Analyse des résultats expérimentaux

L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants: Table Curve 2DTM (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). Enzyme Kinetics ^{PrO}TM Version 2.36, SigmaPlot 2004 (Windows Version 9.01) et Origin 6.0 (Microcal (TM) Origin Version 6.0, Copyright (© 1991-1999 Microcal Software, Inc.).

Chapitre 3.

Résultats et discussion

Chapitre 3. Résultats et discussion

3.1 Extraction et purification partielle de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach)

L'extraction de la poiphénol oxydase (PPO) à partir du champignon de Paris, nécessite la préparation d'une poudre acétonique (Anderson, 1968). Cette technique classique présente l'avantage d'éliminer l'eau, les pigments et les phénols endogènes solubles dans l'acétone, tout en conservant l'activité PPO (Nelson et Mason, 1970; Vâmos-Vigyâzô, 1981 ; Mari, 1998). La poudre d'acétone est obtenue après plusieurs lavages dans de l'acétone à 99.5%. C'est une matière première concentrée en protéine facile à stocker et d'une utilisation aisée pour l'extraction (Ben-Shalom et *al.*, 1977; Mari, 1998).

Dans l'extrait brut et partiellement purifié, nous avons constaté la présence de deux activités enzymatiques, crésolase et catécholase, lorsque la L-tyrosine et le pyrogallol ont été utilisés comme substrats. Ces deux activités enzymatiques sont portées par la même protéine. Elles peuvent être appelée selon les auteurs, polyphénol oxydase (PPO) ou encore tyrosinase (Mari, 1998; Palmer, 1963). Vanni et *al.* (1990) ont signalé, la présence de deux sites actifs sur la PPO du champignon pour les activités catécholase et crésolase. L'activité crésolase étant très faible par rapport à l'activité catécholase. Le problème majeur reste sa stabilité (Mari, 1998). Cette activité présente, un temps de latence de quelques minutes avant d'atteindre la vitesse de l'état stationnaire (Nufiez-Delicado et *al.*, 1996). Ce qui pourrait expliquer le peu de travaux concernant cette activité enzymatique (Espin et *al.*, 1997). L'enzyme obtenue à partir du champignon de Paris sera donc, une tyrosinase vraie, car elle possède les deux activités, diphénolase et monophénolase, activités démontré en 1962 par Smith et Krueger.

Il est intéressant de remarquer, que d'autres préparations de la PPO obtenues à partir d'autres sources d'origine végétale sont dépourvues d'activité crésolasique (Rivas et Whitaker, 1973; Vâmos-Vigyâzô, 1981; Mayer et Harel, 1991; Yue-Ming et *al.*, 1997; Eidhin et *al.*, 2006; Gawlik-Dziki et *al.*, 2007), car, est souvent perdue au cours des étapes de

purification. Des traitements doux sont requis pour pouvoir l'extraire et la garder (Espin et *al.*, 1995).

Le Tableau 1 présente les rendements et taux de purification au cours du procédé de purification partielle de l'activité PPO de 745.5 g du champignon de Paris. Ce procédé comprend principalement suite à l'extraction : une précipitation par l'acétone suivie d'un fractionnement au sulfate d'ammonium (60% de saturation). De bons résultats ont été obtenus en termes de rendement d'activité enzymatique et du taux de purification.

L'extrait obtenu après fractionnement au sulfate d'ammonium (60% de saturation), possède les activités catécholase et crésolase les plus élevées.

L'extrait brut du champignon de Paris, contient une enzyme capable d'oxyder la L-tyrosine et le pyrogallol comme substrats.

D'après Adnan et *al.* (1986), la précipitation par l'acétone a été souvent employée dans les étapes d'extraction et de purification de la PPO. L'extrait brut de la PPO du champignon de Paris a été soumis à une précipitation par l'acétone afin d'éliminer les substances pectiques provenant des tissus du champignon (Vâ.mos-Vigyâzô, 1981). L'extrait enzymatique ainsi obtenu, a subi une seconde précipitation au sulfate d'ammonium à 60% de saturation, afin de concentrer l'enzyme et d'éliminer l'acétone, les protéines inactives et les sucres de poids moléculaire élevé (Mayer et Harel, 1979 Loncle, 1992; Xu et *al.*, 2004). Durant ces deux étapes de purification, l'emploi de la célite comme support de filtration, c'est avéré très utile pour récupérer l'enzyme par adsorption sélective (Mathew et Parpia, 1971 ; Soysal et Sôylemez, 2004; Khan et *al.*, 2006).

Après le fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60% de saturation, 30% de l'activité enzymatique est retenue accompagnée d'une élimination de 86.3% de protéine. Remarquons qu'une grande partie de l'enzyme (70%) est perdu durant les étapes de son purification. Ceci peut être expliqué par l'élimination de différents isoformes d'enzyme (Marri et *al.*, 2003).

Par comparaison avec l'extrait brut, un taux de purification d'environ 2 fois est obtenu pour les deux activités (Tableau 1).

Dans le cas de la PPO de champignon de Paris, 99 % de l'enzyme semble être présent à l'état de latence (Van Gelder et al., 1997). Pour cela, l'augmentation de l'activité spécifique après le fractionnement au sulfate d'ammonium à 60 %, peut être attribuée à l'élimination des inhibiteurs endogènes ou, à la dégradation de la protéine enzymatique sous sa forme active ou également à l'activation de l'enzyme latent par ce traitement (Golbeck et Cammarata, 1981; Sanchez-Ferrer et al., 1989; Vâ.mos-Vigyž6, 1981 ; Steffens et al., 1998).

Plusieurs auteurs ont trouvé des taux de purification compris entre 1.44 et 8-fois pour la PPO des différentes sources purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium (Erat et al., 2006; Neyes et Da Silva, 2007; Gawlik-Dziki et al., 2008; Gao et al., 2009 ; Jiang, 1999; Onez et al., 2008 ; Yaar, 2004; Sojo et al., 1998; Ziyani et Pekyardimci, 2004; Yaar et Sagiro1u, 2002; Yemenicioglu, 2002; Frieden et Ottesen, 1959; Yang et al., 2000; Cho et Ahn, 1999a; Park et al., 1980; Socerhall et Soderhall, 1989; Zawistowski et al., 1988; Wisemann et Montgomery, 1985; Dawson et Magee, 1955).

Nous avons également constaté que, l'activité spécifique catécholase, des extraits enzymatiques brut et partiellement purifiés, est de loin plus élevée que l'activité spécifique crésolase. Constatation confirmée par, Jolivet et al. en 1998 et Zynek et al. en 2010. Le rapport de l'activité catécholase sur l'activité crésolase, diminue au cours de la précipitation de la PPO par le sulfate d'ammonium. Ceci peut être dû à la conversion des formes *Met-* et *Dexoy-PPO* en forme *Oxy-PPO* (Ikehata et Niceil, 2000).

D'après Vaughn et Duke (1984), la PPO a normalement un taux d'activité diphénolasique très élevé par rapport à l'activité monophénolasique. Selon Smith et Krueger (1962) le rapport de l'activité catécholase sur l'activité crésolase se situe entre 10:1 à 80:1. La valeur du rapport entre ces deux activités dépend d'une part de la source d'obtention de l'enzyme et de sa méthode de purification (Bonner, 1956; Smith et Krueger, 1962; Bouchilloux et al., 1963).

o

.-

,ci q

Otri

D t.-

cd q

cd cd

i E
o!

q

Q

E-

ci | q

E-

a

.4
CD

o v CD

E

o CD

.4 o

E^o

o! .24
4 cy)

c.,

Q QIC

Co

E^o

o

oo

o

cti

r.

CYD

L()

—

c)

C'

oo

C)

c.i

cx)

CD
C',

Lr)

CD

c

CD

tr)
C

Q

CI

t-

Co

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

LO
a»

o

d) C'

Q

Q

—

CD

LrD

'cd

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

EEB
Q

CD

LO

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

oo

Nos activités enzymatiques catécholase et crésolase sont respectivement, 189.3 et 3.35 UE/ml. Nous avons observés la présence d'une activité laccase négligeable. Elle représente à peine 0.22% de l'activité totale de la PPO.

L'activité enzymatique totale de notre extrait brut, est plus élevée que celles mentionnées dans la littérature (Gawlik-Dziki et *al.*, 2007; Yue-Ming et *al.*, 1997; Eidhin et *al.*, 2006; Hasegawa et Maier, 1980; Dnez et *al.*, 2008; Ylostalo et *al.*, 2001; Fan and Flurkey, 2004). Aussi, l'activité catécholase demeure stable pendant plusieurs semaines lorsque l'extrait enzymatique été conservé à -15°C (Figure 11), à l'inverse de l'activité crésolase. Sharma et *al.* (2003) ont constaté que la PPO du champignon reste stable pendant 28 jours lorsqu'elle est placée entre -10 et 10°C .

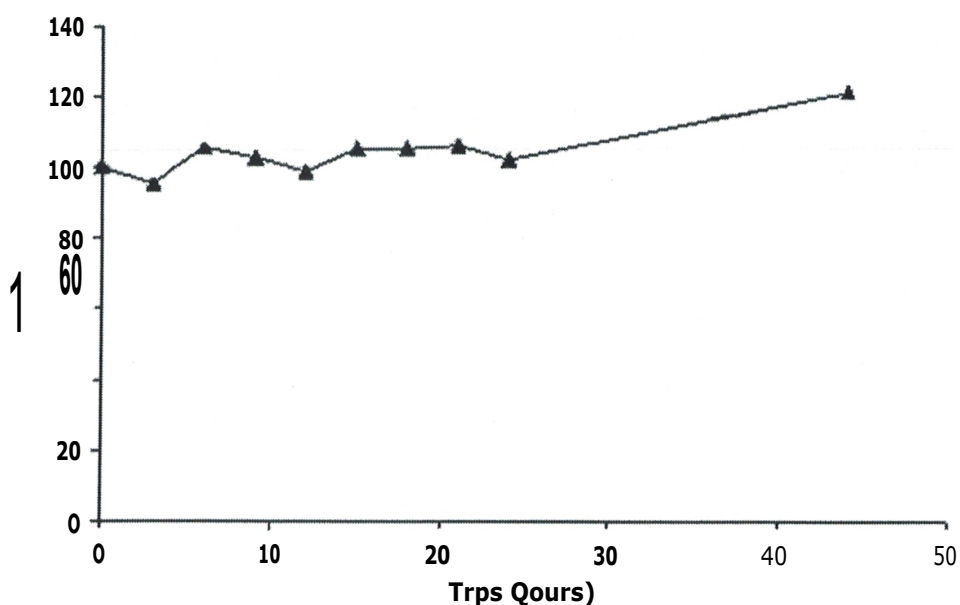


Figure 11: Stabilité de l'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO du champignon de Paris durant le stockage à -15°C .

Le champignon de Paris peut être considéré comme étant une source naturelle, très intéressante et bon marché de la PPO (Seo et *al.*, 2003).

Dans la suite de nos travaux, nous désignerons sous l'appellation de PPO, uniquement l'activité o-diphénol oxydase.

3.2 Effet du pH sur l'activité PPO

Les valeurs de l'activité PPO mesurée aux pH supérieurs à 7, ont été corrigées à cause de l'autoxydation du pyrogallol en purpurogalline et du pycatéchol en o-benzoquinone, qui a lieu en milieu basique et en présence d'oxygène moléculaire (Palmer, 1963, Abrash et *al.*, 1989).

Les Figures 12 et 13, montrent l'effet du pH sur l'activité PPO du champignon de Paris, en utilisant deux substrats phénoliques (pyrocatechol -20 mM et pyrogallol -20 mM). On remarque que l'activité PPO, est considérablement affectée par le changement de pH du milieu réactionnel.

L'activité o-diphénol oxydase du champignon de Paris, est maximale à pH 7 et 7.5 respectivement, pour le pyrogallol et le pyrocatechol. De part et d'autre de ces deux valeurs de pH, l'activité enzymatique diminue à cause du changement du degré d'ionisation des groupements localisés à l'intérieur ou au voisinage du site actif de l'enzyme, qui seront impliqués dans la fixation et/ ou la transformation des substrats (Khatun et *al.*, 2001).

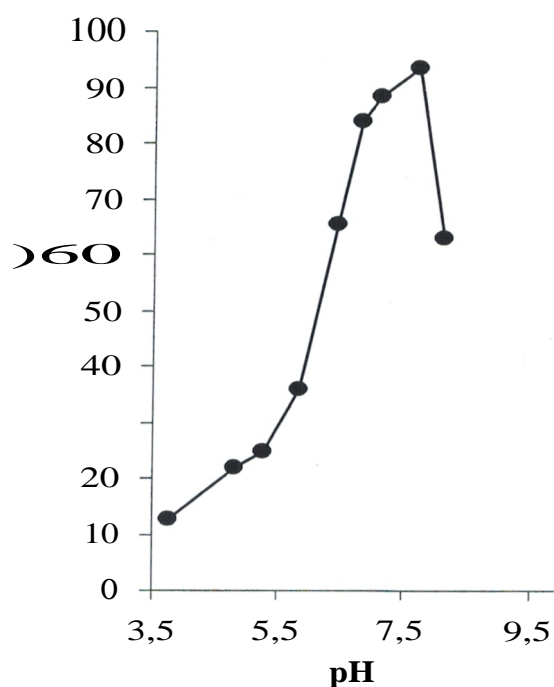


Figure 12: Activité PPO du champignon de Paris vis-à-vis du pyrocatechol comme substrat. Le milieu réactionnel contient 20 mM de pyrocatechol et 5 pl de l'extrait brut de la PPO.

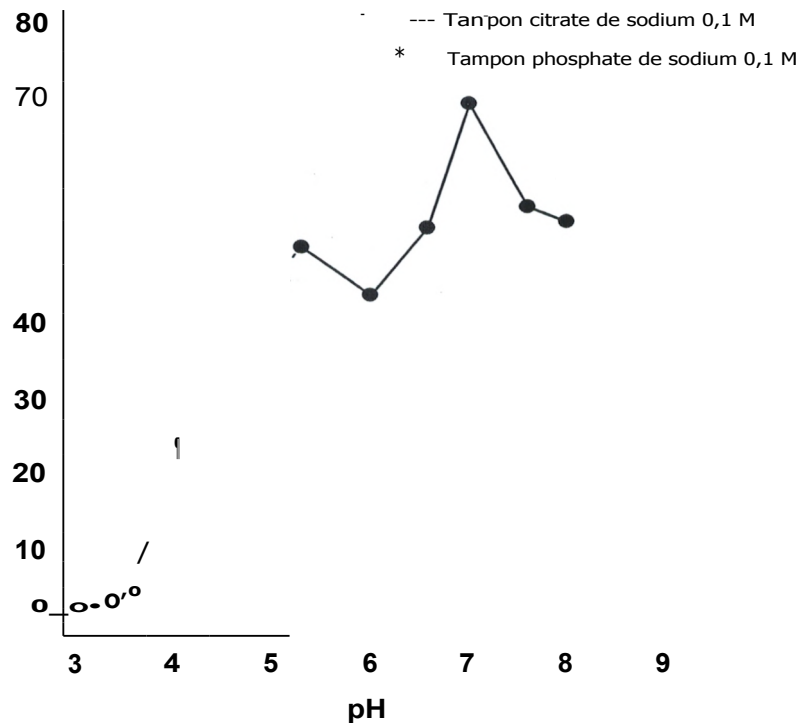


Figure 13: Activité PPO du champignon de Paris vis-à-vis du pyrogallol comme substrat. Le milieu réactionnel contient 20 mM de pyrogallol et 5 iii de l'extrait brut de la PPO.

L'activité PPO était également optimale à pH 5.3, lorsque le pyrogallol a été utilisé comme substrat. Ceci est un indicateur probablement de l'existence des isoformes de la PPO dans l'extrait brut (Van Gelder et *al.*, 1997).

Selon Vâ.mos-Vigy.z6 (1981), la plupart des préparations enzymatiques ont un seul pH optimum. Un deuxième optimum observé dans certains cas, est dû à une purification insuffisante de l'enzyme. Patil et Zucker (1965) suggèrent que l'activité optimale observée à pH 5.3, est liée à l'ionisation des résidus histidines de la PPO plutôt qu'à l'ionisation du substrat.

D'autres chercheurs ont trouvé l'existence de deux pH optimaux pour la PPO, un au alentour de pH 7.0, l'autre autour du pH 5.0 (Harel el *al.*, 1964; Stelzig et *al.*, 1972).

Le pH optimal de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Mayer et Harel, 1979; Yoruk et Marshall, 2003). Il dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la

température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Whitaker, 1994; Luh et Phithalopol, 1972; Vâmos-Vigy.zô, 1981; Kolcuolu et ai, 2006).

Le type de tampon et la pureté de l'enzyme affectent aussi la valeur du pH optimal (Vâmos-Vigy.zô, 1981).

3.3 Spécificité de substrat

Les résultats de l'étude de la spécificité de substrat de l'extrait brut de la PPO, est représentée dans le Tableau 2. Sur les substrats potentiels testés, seuls le pyrocatechol et le pyrogallol ont été oxydés activement par la PPO.

Une faible activité PPO a été observée avec la L-tyrosine et le phénol. Ces résultats suggèrent que la PPO, possède les activités mono-, di- et triphénol oxydases. L'activité enzymatique mesurée en présence du phioroglucinol, provient de l'existence d'une laccase dans l'extrait brut de la PPO (Flurkey, 2002). Nous avons remarqué que l'oxydation des composés monophénoliques est caractérisée par une phase de latence, suivie d'une vitesse initiale de la réaction jusqu'à l'état stationnaire.

Tableau 2: Spécificité de substrat de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

Substrat	Longueur d'onde (nm)	Activité enzymatique relative au pyrocatechol (%)
<i>Monophénols</i>		
L-tyrosine (2 mM)	475	0.7
Phénol (10 mM)	395	0.54
<i>Diphénol</i>		
Pyrocatechol(10mM)	410	10(154UE/ml)
<i>Tnphénols</i>		
Pyrogallol (10 mM)	420	43.5
Phioroglucinol (10 mM)	395	0.29

3.4 Les paramètres cinétiques de la PPO

L'effet de la nature du substrat et de sa concentration sur l'o-diphénol oxydase du champignon de Paris a été étudié en utilisant le pyrocatechol et pyrogallol à des concentrations comprises entre 0.2 et 50 mM. Les autres paramètres physico-chimiques sont maintenus constants (tampon phosphate 0.05 M; pH 7.0; 30°C).

Nos résultats expérimentaux ont été ajustés à l'aide des deux équations non-linéaires suivantes:

$$V_0 = \frac{V_m(S)}{K_m + (S) + (S)^2 / K} \quad \text{Equation (1) (Haldane, 1930)}$$

L'équation (1) peut être écrite sous la forme:

$$(S) / V_0 = K_m / V_m + (1 / V_m) \left((S) + (S)^2 / K \right) \quad \text{Equation(2) (Lineweaver-Burk, 1934)}$$

Où

V_0 est la vitesse initiale de la réaction (Abs/min)

V_{max} est la vitesse maximale de la réaction (Abs/min);

K_m est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (mM) ou constante du Michaelis-Menten, mesure l'affinité du substrat pour l'enzyme, c'est-à-dire la stabilité du complexe ES (mM);

K_s est la constante de dissociation du complexe inactif ESS (mM).

D'après les valeurs du coefficient de corrélation linéaire (R^2), l'oxydation du pyrocatechol et du pyrogallol par la PPO du champignon de Paris, suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten tenant compte du phénomène d'inhibition par excès de substrat.

Sur la Figure (14), est indiquée la vitesse initiale en fonction de la concentration des deux substrats utilisés. On constate que l'activité o-diphénol oxydase augmente jusqu'à 10 et 20 mM de pyrogallol et pyrocatechol, respectivement. Au-delà de ces deux concentrations saturantes, on assiste à une diminution d'activité PPO.

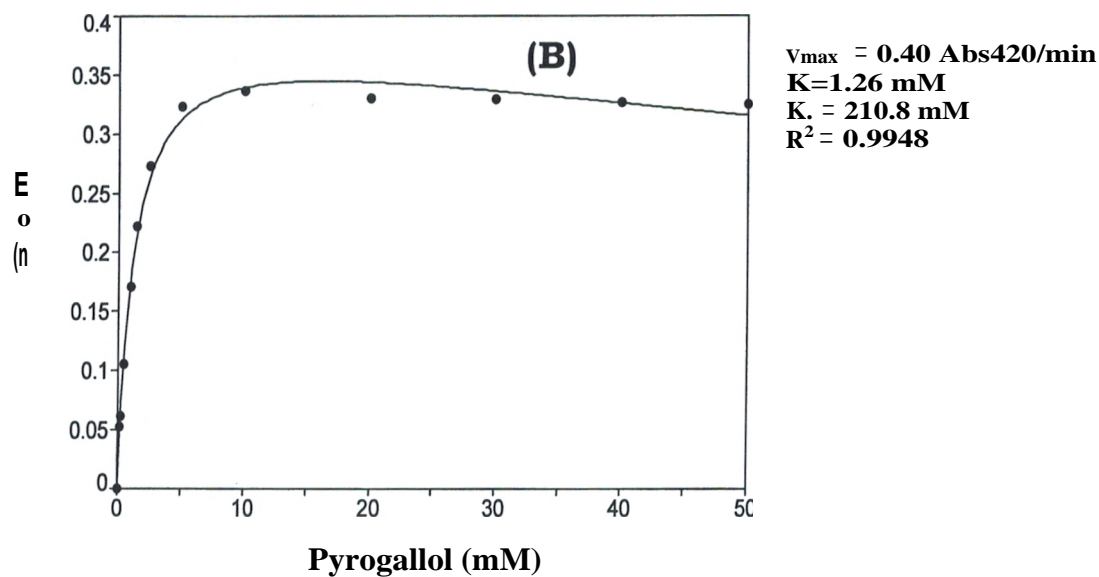
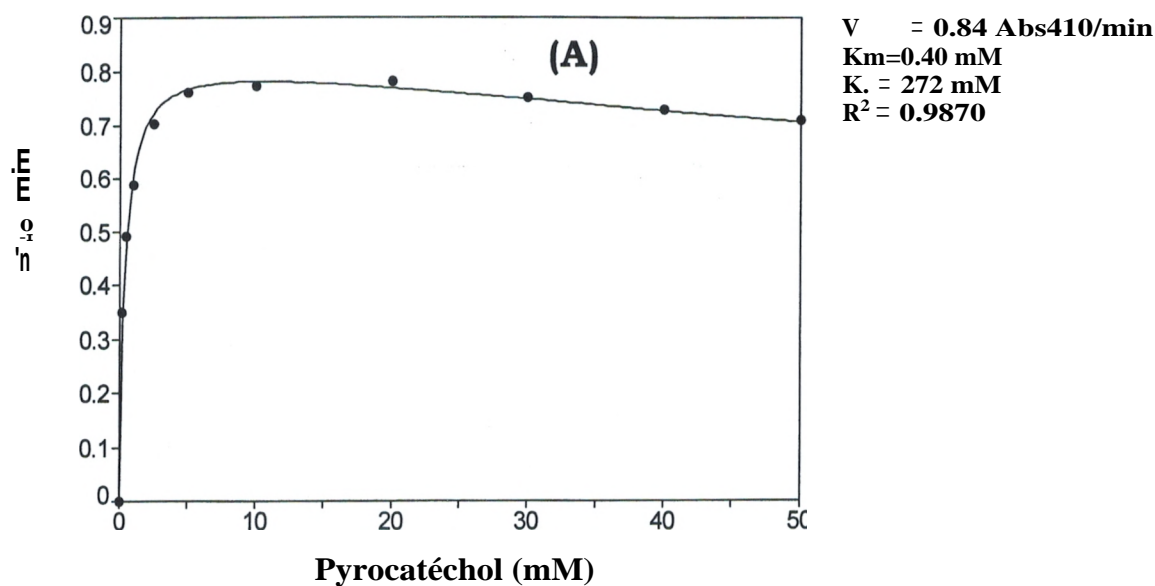


Figure 14: Représentation graphique de Haldane (1930) de l'influence de la concentration du substrat dans le milieu réactionnel sur l'activité o-diphénol oxydase du champignon de Paris (30°C-tampon phosphate pH 7.0 et 0.1 M-extrait enzymatique brut 5 pl-volume du milieu réactionnel 2.05 ml): (A) Pyrocatechol, (B) Pyrogallol.

La raison de cette diminution, est liée au phénomène d'inhibition par excès de substrat (Mayberry et Mallette, 1962; Palmer, 1963; Duckworth et Coleman, 1970; Varoquaux, 1978). Cet effet inhibiteur est souvent attribué à une forte inhibition de l'enzyme par le produit de la réaction et parfois, à la compétition entre le produit et le substrat (Palmer, 1985; Macrae et Duggleby, 1968).

L'inhibition de l'enzyme par le substrat à concentrations élevées a été observée pour la PPO de différentes sources végétales.

Deux hypothèses sont émises:

1- On suppose qu'à des concentrations élevées de substrat, le complexe actif enzyme-substrat (ES) et le complexe ternaire inactif (ESS) sont formés simultanément.

2- On suggère qu'une deuxième molécule de substrat peut se lier inefficacement près du site actif de l'enzyme, retardant ainsi son action catalytique (Zawistowski et *al.*, 1991; Palmer, 1985).

Haldane (1930) a proposé une théorie très simple pour expliquer ce phénomène. Il suppose que l'enzyme possède au moins deux sites actifs successifs et voisins, ce qui implique le passage du substrat par au moins un état transitoire. Cette théorie a été soutenue par Ludwig et Nelson (1939), pour expliquer l'inactivation de l'enzyme. En présence d'un excès de substrat, deux molécules de pyrocatechol ou de pyrogallol vont se fixer simultanément sur les deux sites actifs de l'enzyme, empêchant ainsi l'orientation nécessaire à la réaction catalytique (Varoquaux, 1978).

L'oxygène semble jouer un rôle actif dans cette inhibition. Duckworth et Coleman (1970) ont démontré que l'inhibition par excès de pyrocatechol, de la catécholase du champignon, était d'autant plus marquée que la teneur en oxygène dissous dans le milieu réactionnel était faible.

Le Tableau (3) regroupe les valeurs des paramètres cinétiques (V_{max} , K_m et K_i) de la PPO calculés à partir de la régression non linéaire de Lineweaver-Burk (1934) (Figure 15). Le V_m et K_m de la PPO sont respectivement, 168 UE/min/ml et 0.4 mM, pour le pyrocatechol et 80 UE/min/ml et 1.40 mM, pour le pyrogallol.

Les valeurs de K_m et V_{max} de la PPO varient avec le type de substrat, le tampon, la concentration ionique, la température, la source d'enzyme, le degré de pureté de l'enzyme et la méthode utilisée pour son extraction (Arsian et al., 1997 ; Dogan et Dogan, 2003; Ziyan et Pekyardimci, 2004).

Dogan et al. (2005) supposent que le pH affecte aussi les valeurs apparentes du K_m .

Tableau 3: Valeurs des constantes cinétiques (V_m , K_m et K_i) apparentes et efficacité catalytique de substrat vis-à-vis de l'activité o-diphénol oxydase de la PPO du champignon de Paris (tampon phosphate 0.1 M-pH 7.0 ; 30°C).

Substrat	Longueur d'onde (nm)	V_{max} (Abs/min)	K_m (mM)	(mM)	Efficacité catalytique ($V./K_i$; i Abs/min.mM)	R^2
Pyrocatechol	410	0.84	0.40	270	2.10	0.9999
Pyrogallol	420	0.40	1.40	250	0.28	0.9992

La valeur de K_m obtenue pour le pyrocatechol à pH 7.0, est du même ordre de grandeur que celles trouvées par Garcia-Molina et al. (2005) (0.3 mM) Selinheimo et al. (2009) (0.25 mM) et Rodakiewicz-Nowak et al. (2002) (0.39 mM) avec la catécholase du champignon *Agaricus bisporus*.

Garcia-Molina et al. (2005) ont trouvé un K_m de 2.16 mM pour l'o-diphénol oxydase du champignon *Agaricus bisporus* utilisant le pyrogallol comme substrat.

Palma-Orozco et al. (2011) ont trouvé un résultat analogue pour la PPO de la sapote (*Pouteria sapota*) (1.3 mM).

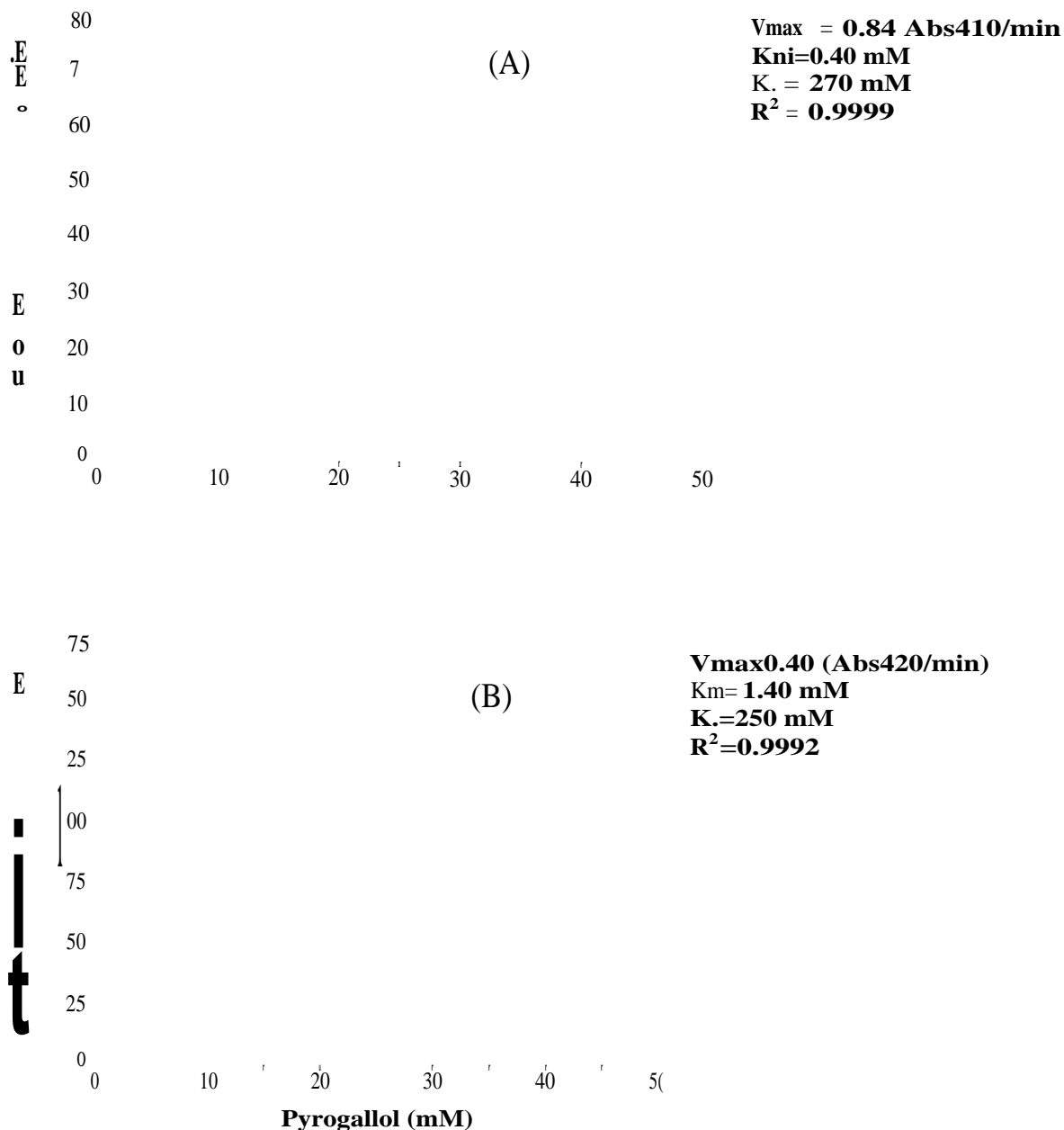


Figure 15: Représentation graphique de Lineweaver-Burk (1934) de l'influence de la concentration du substrat dans le milieu réactionnel sur l'activité o-diphénol oxydase du champignon de Paris (30°C-tampon phosphate pH 7.0 et 0.1 M-extrait enzymatique brut 5 pl-volume du milieu réactionnel 2.05 ml): (A) Pyrocatechol, (B) Pyrogallol.

Les valeurs de la constante d'affinité K_m , de la PPO pour le pyrocatechol rapportées par la littérature sont: 14.3 mM pour la PPO du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Aydemir, 2010), 10.7 mM pour la PPO de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) (Dogan et al., 2005); 5.55 mM pour la PPO de la poire (*Pyrus communis*) (Ziyan et pekyardimci, 2004), 4.5 mM pour la PPO du coing (Yagar et Sairolu, 2002), 5.2 mM pour la PPO de cerise (*Malpighia glabra* L.) (Kumar et al., 2008), 6.3 mM pour la PPO de la mangue (*Mangfera indica* L.) (Wang et al., 2007), 3.65 mM pour la PPO du raisin (*Vitis vinifera* L.) (Ônez et al., 2008) et 8.3 mM pour la PPO de céleri (*Apium graveolens* L.).

Les valeurs de K_m trouvées pour la PPO avec le pyrogallol comme substrat sont: le céleri 4.5 mM (Yagar, 2004); le tournesol (*Helianthus annuus*) 1.01 à 1.96 mM (Singh et al., 1999); la poire (*Pyrus communis*) 29 mM (Ziyan et Pekyardimci, 2004), l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) 5.2 mM (Doan et al., 2005), et le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) 20 mM (Aydemir, 2010).

L'affinité de l'enzyme *vis-à-vis* du substrat est d'autant plus importante que le K_m est petit (Varoquaux, 1978). Par conséquent, la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) a une affinité plus grande pour le pyrocatechol et le pyrogallol par rapport aux autres PPOs.

En termes d'efficacité catalytique ou efficacité physiologique (V_m/K_m), le pyrocatechol semble être le meilleur substrat pour la PPO du champignon de Paris *Agaricus bisporus*, confère Tableau (3) (Rocha et al., 1998; Yaar, 2004; Dagan et al., 2002 ; Dincer et al., 2002; Wang et al., 2007).

3.5 Effet de la concentration de l'enzyme

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de la PPO dans les conditions Michaeliennes, il était nécessaire de déterminer la concentration en enzyme qui permet d'obtenir une réponse linéaire de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'enzyme. Dans ces conditions, la vitesse de réaction dépend uniquement de la concentration en substrat. L'oxydation a été réalisée avec une concentration saturante en substrat, soit 20 mM de volume réactionnel et différents volumes d'extrait enzymatique allant de 0 à 6.5 il par 2 ml de volume réactionnel.

La Figure 16 représente l'évolution de la vitesse initiale de la réaction d'oxydation du pyrogallol par la PPO du champignon de Paris en fonction de la concentration de l'enzyme.

Dans cette expérience, le volume de 5 pl d'extrait enzymatique est convenable pour que la cinétique soit du premier ordre et donc pour la détermination des paramètres cinétiques de la PPO.

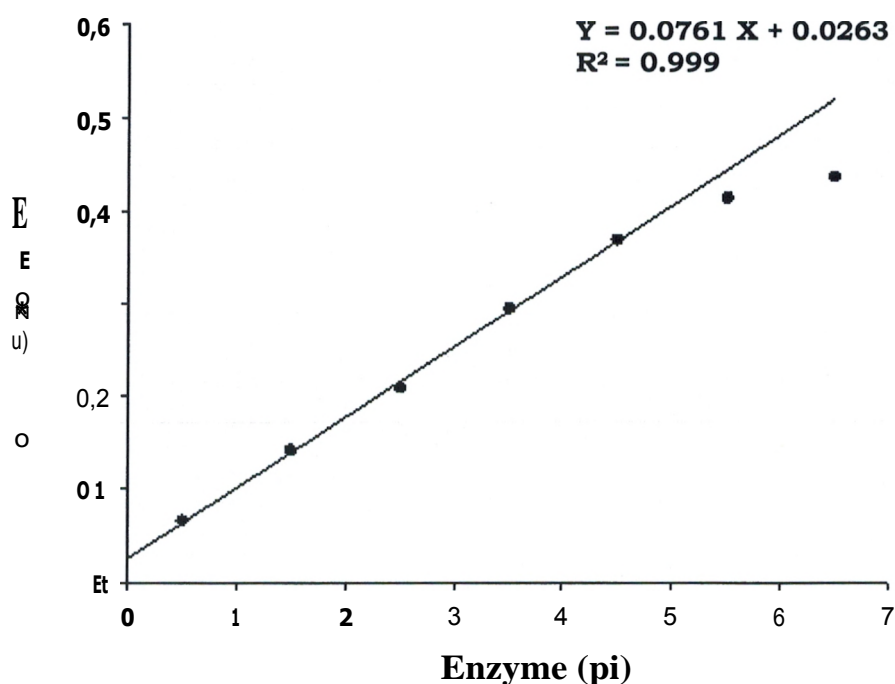


Figure 16: Vitesse initiale de l'oxydation du pyrogallol en fonction de la concentration de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

3.6 Stabilité thermique

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique de la PPO du champignon de Paris, sont représentés dans la Figure (17). La représentation graphique de l'activité o-diphénol oxydase résiduelle, exprimée en pourcentage de l'activité enzymatique relative à 30°C pour les différentes températures testées, montre que l'enzyme n'est pas stable thermiquement à des températures supérieures à 35°C. De 35 à 45°C, l'activité enzymatique résiduelle diminue légèrement (17%).

Une inactivation rapide se produit à entre 45 et 55°C. Cette baisse d'activité enzymatique, selon Khatun et *al.* (2001) ; Yemenicioglu (2002) ; Dogan et *al.* (2005b) ; est due aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme, à la destruction de son site actif et aussi à la présence des formes multiples d'enzyme de la PPO dont certaines sont extrêmement thermolabiles.

Il est également probable que le chauffage doux, cause la dissociation de quelques formes oligomères de la PPO vers des monomères moins actifs (Yemenicioglu, 2002).

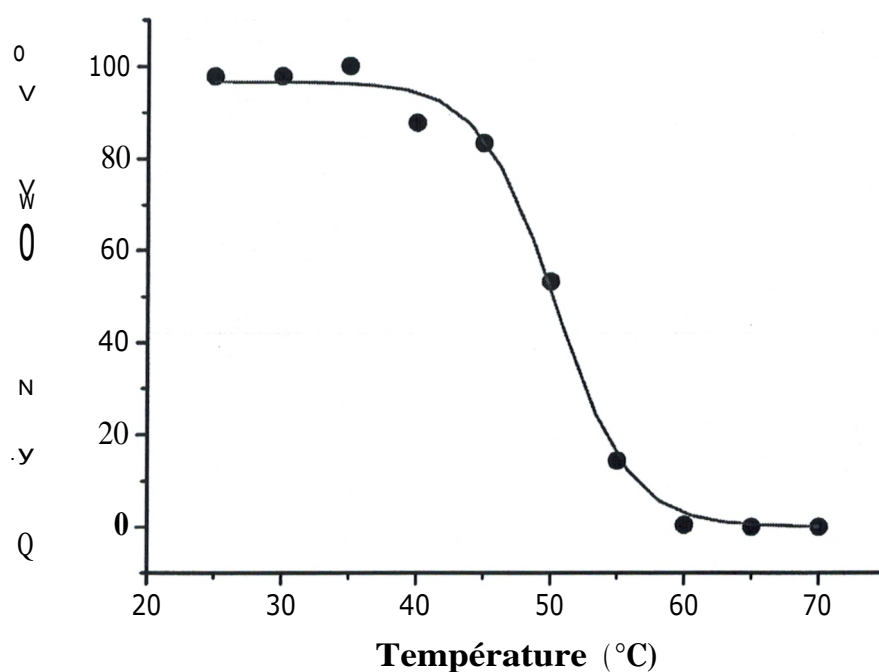


Figure 17: Stabilité thermique de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) après 30 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 20 mM de pyrocatechol dans 0.1 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.0.

Notons aussi que la PPO est complètement inactivée à 70°C. Ces propriétés enzymatiques sont similaires avec ceux trouvées pour la PPO des espèces: *Panaeus japonicus* (Benjakul et *al.*, 2005), *Macrolepiota mastoidea* (Kolcuoglu et *al.*, 2006), *Musa cavendishii* (Ünal, 2007), *Ocimum basilicum* (Dogan et *al.*, 2005a) et *Castanea henryi* (Xu et *al.*, 2004).

De façon générale, la PPO est considérée comme étant une enzyme non thermostable (Amiot et *al.*, 1987).

3.7 Etude cinétique de l'inactivation thermique de l'activité o-diphénol oxydase

En se basant sur les résultats de l'étude de la stabilité thermique, une étude cinétique de l'inactivation thermique de l'activité monophénolase détaillée a été entreprise, à pression atmosphérique dans l'intervalle des températures compris entre 45 et 73°C.

Après traitement thermique des extraits bruts de la PPO, l'activité enzymatique résiduelle a été mesurée dans les conditions optimales suivantes: pyrocatechol 10 mM et pH 7.0 dans tampon phosphate de sodium 0.05 M.

La Figure (18) montre les résultats de l'inactivation thermique de la PPO du champignon de Paris. On constate que l'ampleur de la dénaturation de l'activité diphénolase, augmente simultanément avec la température et le temps du traitement; et que l'activité enzymatique diminue de manière exponentielle avec le temps.

Selon Patnaik (2002), l'inactivation thermique de la PPO dépend non seulement de la température mais, dépend aussi, du temps d'incubation de l'enzyme. On remarque que l'incubation de l'enzyme à 45°C pendant 30 min, n'a pas causé une perte significative de son activité initiale. Par contre, elle augmente rapidement au dessus de 55°C. L'activité enzymatique à cette température, est réduite approximativement de 40%. Au dessus de 60°C, l'inactivation thermique de la PPO devient trop rapide. Les temps nécessaires pour une inactivation de 50% de l'activité enzymatique à 60 et 65°C sont respectivement 11 et 1.1 min. Elle a été presque complètement inactivée après 6 min d'incubation à 70°C (0.075%).

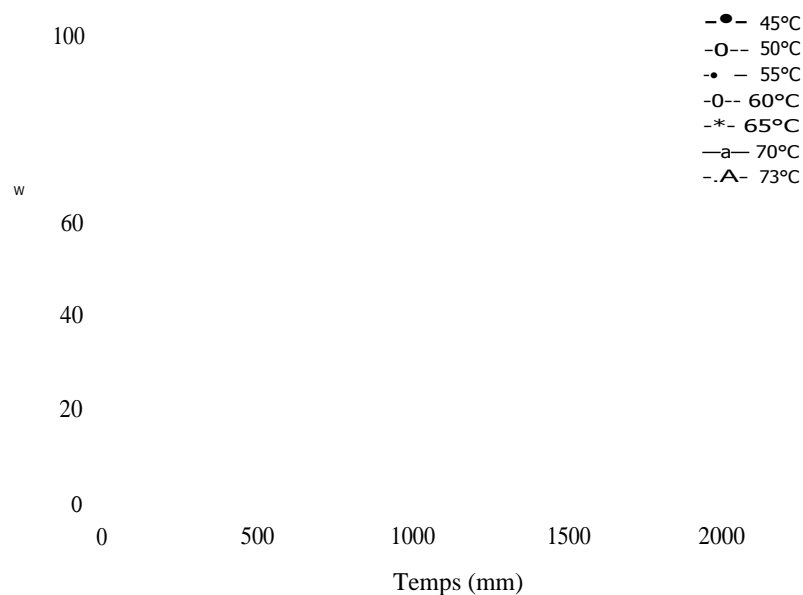


Figure 18: Effet de la température et du temps de traitement thermique sur l'extrait brut de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). L'activité enzymatique résiduelle est mesurée en présence de pyrocatechol 10 mM, à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) à 30°C.

La Figure (19), représente les courbes semi-logarithmiques de l'activité résiduelle de la PPO du champignon de Paris (At/A) en fonction du temps de traitement thermique. Toutes les courbes sont linéaires en fonction des températures étudiées conformément au processus d'inactivation du premier ordre (Fortea et *al.*, 2009). Leurs pentes représentent les constantes de vitesse d'inactivation (k). Elles ont été calculées à partir de l'équation de régression linéaire suivante, (Anthon et Barrett, 2002; Râpeanu et *al.*, 2006; Samborska, 2007):

$$\log \left(\frac{A_t}{A_0} \right) = (-2.03) \times t \text{ e Equation (3)}$$

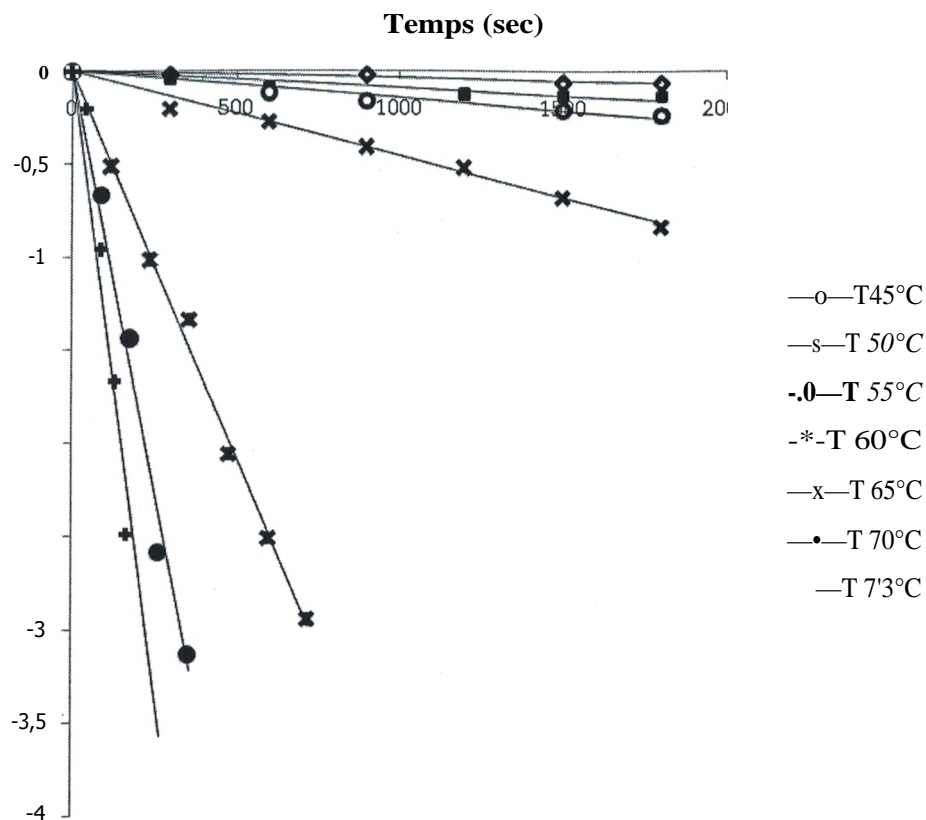


Figure 19: Constante de vitesse d'inactivation thermique (k) de la PPO du champignon de Paris à différentes températures.

Pour mieux décrire les cinétiques d'inactivation thermique des réactions du premier ordre, le modèle TDT (Thermal Death Time concept), a été utilisé pour déterminer les valeurs D et Z (Van Loey et *al.*, 1997). La valeur D est définie comme étant le temps nécessaire à une certaine température, pour réduire l'activité enzymatique initiale (A_0) à 90% ou d'une unité logarithmique. Pour les réactions du premier ordre, la valeur D est inversement proportionnelle à la constante de vitesse d'inactivation (k).

Le temps de réduction décimale D , est calculé à partir de l'équation suivante (Stumbo, 1973):

$$D = \frac{\ln 10}{k} \quad \text{Equation (4)}$$

Par conséquent, le temps de réduction décimale D a été estimé à partir de la pente de la régression linéaire du $\log (A_t/A_0)$ en fonction du temps selon l'équation suivante (Samborska, 2007):

$$\log\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -k \cdot t \quad \text{Equation (5)}$$

Z (°C) est l'augmentation de la température nécessaire pour une réduction de 90% de la valeur D (paramètre de sensibilité à la température). Il suit l'équation (Gnangui et al., 2009):

$$\log\left(\frac{D_2}{D_1}\right) = \frac{2.303 \cdot Z}{D} \quad \text{Equation (6)}$$

Avec:

T_1 et T_2 représentant respectivement la température la plus faible et la plus élevée, °C ou °K.

D_1 et D_2 sont les valeurs de D aux températures faible et élevée en minute.

La valeur Z_r est déterminée à partir de la régression linéaire du $\log D$ en fonction de la température (T).

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

$$t_{i,2} = \frac{\ln 0.5}{-k} \quad \text{Equation (7)}$$

Les valeurs des paramètres cinétiques (k , D et $t_{i,2}$) d'inactivation thermique de la PPO du champignon de Paris, ainsi calculés sont regroupés dans le Tableau (4).

Tableau 4: Les paramètres cinétiques estimés de l'inactivation thermique de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

Température (°C)	D (mm)	k (min ⁻¹)	t ₁₁₂ (mm)	R ²
45	491.06	0.004690	147.7925	0.9135
50	195.41	0.011785	58.816	0.8461
55	117.58	0.019586	35.3899	0.9359
60	36.82	0.062547	11.082	0.9896
65	4.05	0.568642	1.2189	0.9954
70	1.89	1.218518	0.5688	0.9875
73	1.28	1.799218	0.3852	0.9348

Le t₁₁₂ et D sont deux paramètres importants. Ils sont souvent utilisés pour caractériser la stabilité d'une enzyme (Onal et Sener, 2006; Marangoni, 2003). Le Tableau (4) montre que les valeurs D et t₁₁₂ diminuent rapidement avec l'augmentation de la température. Ce qui est conforme à l'inactivation thermique de l'enzyme PPO, reconnue comme une enzyme non thermostable.

La comparaison avec les valeurs de D et t₁₁₂ des PPOs obtenues à partir de quelques sources, la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (t₁₁₂ = 35.39 mm; 55°C, t_{1/2} = 11.08 mm; 60°C, t₁₁₂ = 0.56 mm; 70°C) est moins stable thermiquement que la PPO du Yali poire (*Pyrus bretschneiderz*) (t₁₁₂ = 6 mm; 70°C) (Zhou et al., 1991), de la pomme (t₁₁₂ = 6 mm; 70°C) (Yemenicioglu et al., 1997), de l'avocatier (*Persea americana*) (t₁₁₂ = 8 mm; 70°C) (Kahn, 1997), du Taro (t₁₁₂ = 26.9 mm; 60°C, t_{1/2} = 14.3 mm; 70°C) (Yemenicioglu et al., 1999) et de l'ananas (t₁₁₂ = 93.66 mm; 55°C, t_{1/2} = 79.67 mm; 60°C, t₁₁₂ = 63.01 mm; 70°C) (Chutintrasria et Noomhorm, 2006). Par contre la PPO du champignon de Paris est plus stable thermiquement par rapport à la PPO du raisin blanc (var. *Victoria*, l'Afrique du sud) (t₁₁₂ = 4.43 mm; 55°C, t₁₁₂ = 1.15 mm; 60°C) (Râpeanu et al., 2006).

Le Tableau (4) montre que les valeurs de la constante de vitesse d'inactivation (k) et D , augmentent et diminuent respectivement avec l'augmentation de la température. Ce qui indique clairement que la PPO s'inactive rapidement aux températures élevées (Gheibi et *al.*, 2006 Gnangui et *al.*, 2009).

L'influence de la température sur la constante de vitesse d'inactivation (k) est décrite à l'aide de la relation d'Arrhenius

$$\ln(k) = - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right) + \ln(A) \quad \text{Equation (8)}$$

Avec:

k Constante de vitesse d'inactivation (min^{-1}).

A Constante d'Arrhenius.

E_a Energie d'activation (J.mol^{-1}) (énergie requise pour que l'inactivation se produise).

R Constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{°K}^{-1}$).

T Température absolue en Kelvin (OK).

La Figure (20) représente le logarithme népérien de la constante de vitesse d'inactivation en fonction de l'inverse de la température absolue.

Le graphique Arrhenius pour l'inactivation thermique de la PPO, possède un aspect linéaire ($R^2 = 0.9667$) dans toute la gamme des températures explorée expérimentalement. La pente de la courbe vaut ($-E_a/R$). Elle permet de déterminer l'énergie d'activation de l'oxydation du catéchol par la PPO. Cette énergie est estimée à 208.37 kJ/mol . Elle est plus élevée que celle de la PPO du Taro (*Colocasia antiquorum*) 87.78 kJ/mol (Yemenicioglu et *al.*, 1999), de la PPO de l'ananas (Chutintrasri et Noomhorm, 2006) 23.70 kJ/mol ; de la PPO de Yam (*Dioscorea cayenerisis-roturidata cv* Longbô) (Gnangui et *al.*, 2009) 67.67 kJ/mol et de la PPO de banane 155 kJ/mol (*Musa cavendishiz*) (Onal et *al.*, 2007), mais inférieure que celles de la PPO du raisin blanc (var. Victoria, l'Afrique du sud) ; 221.5 kJ/mol (Râpeanu et *al.*, 2006), de la PPO du raisin de table (*Crimson Seedless*); 295.5 kJ/mol (Fortea et *al.*, 2009) et de la PPO de pêche; 502 kJ/mol (Chan et Yang, 1971).

Les grandes valeurs d'énergie d'activation (E_a) reflètent une grande sensibilité de la PPO au changement de la température (Weemaes et al., 1998; Chutintrasri et Noomhorm, 2006). Cependant, la PPO du champignon de Paris semblerait plus thermostable que les PPOs du raisin, de pêche et de la banane, mais moins thermostable que les PPOs de Taro, d'ananas et de Yam.

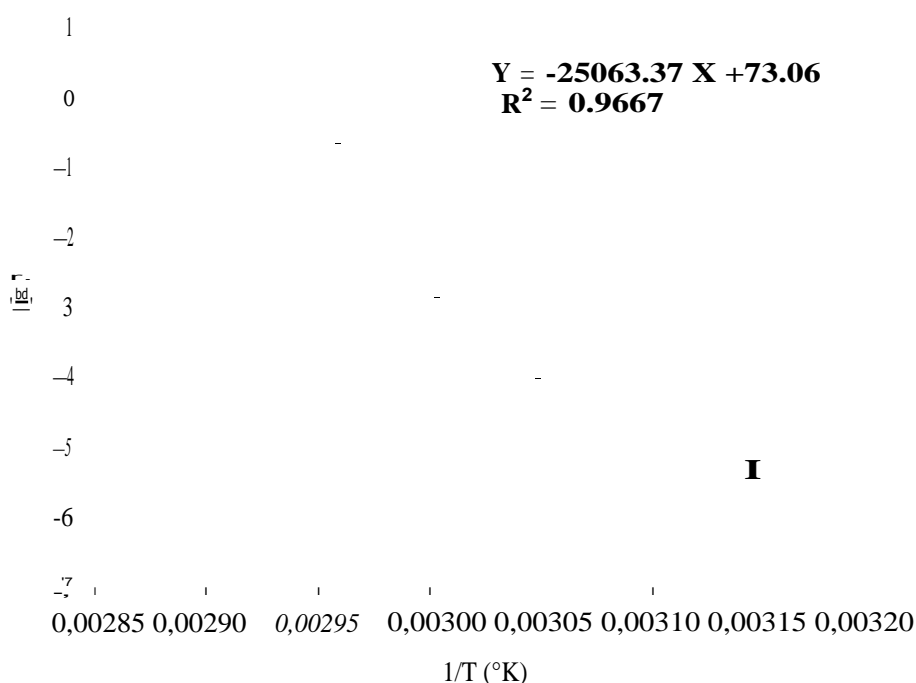


Figure 20: Graphique d'Arrhenius relatif à la vitesse d'inactivation thermique de la PPO de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

La relation entre le temps de réduction et la température est présentée dans la Figure (21). La pente de la courbe est représenté par $-1/Z_r$.

La valeur de Z_T pour la PPO du champignon de paris, 10.1°C, à 45-73°C, est dans la gamme des valeurs trouvées pour d'autres PPOs obtenues à partir de fruits qui sont comprises entre 8.5 à 10.95°C (Onal et al., 2007; Râpeanu et Bulancea, 2005; Ünâl et Sener, 2006; Râpeanu et al., 2006; Strubi et al., 1975; Vámos-Vigyâzô, 1981).

En générale, une faible valeur de Z'r indique une grande sensibilité vis-à-vis de la température (Barrett et *al.*, 1999). Cependant, la PPO du champignon de Paris est moins thermostable, comparativement parlant, aux PPOs obtenues à partir de l'ananas (ZT = 104.2 °C) (Chutintrasri et Noomhorm, 2006), de taro (ZT = 25.5°C) (Yemeniclolu et *al.*, 1999), d'haricot de vanille (ZT = 21 °C) (*Vanilla planifolia*) (Waliszewski et *al.*, 2009), de banane (*Musa cavendishiz*) (ZT = 14.2°C) (Onal, 2007) et de Yam (ZT = 29.41 °C) (*Dioscorea cayenensis-rotundata cv* Longbô) (Gnangui et *al.*, 2009).

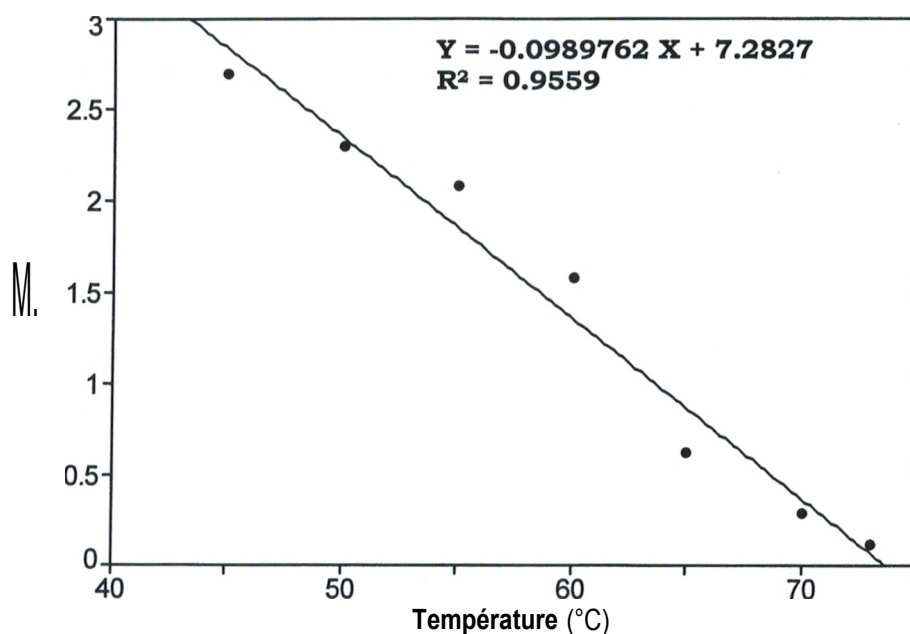


Figure 21: Effet de la température sur la valeur-D de l'inactivation de la PPO de champignon (*Agaricus bisporus*).

3.8 Etude cinétique de l'inhibition de la PPO d'*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach

L'effet inhibiteur de l'acide benzoïque, de l'azide de sodium et du fluorure de sodium sur les activités diphénol et triphénol oxydases de la PPO de champignon de couche (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach) est étudié en utilisant le pyrocatechol et le pyrogallol comme substrats.

Les résultats trouvés, montrent que tous les inhibiteurs testés, ont provoqués une diminution significative des activités di- et triphénol oxydases de la PPO et que leur pouvoir inhibiteur, dépend non seulement de leurs concentrations dans le milieu réactionnel, mais aussi de la concentration du substrat utilisé.

Les coefficients de régression linéaire (R^2) sont indiqués dans les Tableaux (5) et (6). Leurs valeurs sont comprises entre 0.99-1.00, ce qui indique bien que les données expérimentaux, sont parfaitement ajustées par les équations d'inhibitions choisies.

3.8.1 Inhibition compétitive de l'activité triphénol oxydase de la PPO du champignon de couche par l'acide benzoïque et l'azide de sodium

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation du pyrogallol par la PPO de champignon de couche, suit une cinétique de Michaelis-Menten. Les cinétiques d'inhibitions de l'acide benzoïque et l'azide de sodium agissant sur l'enzyme ont été déterminées par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk.

Les Figures (22) et (23) montrent respectivement, les graphiques de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence d'acide benzoïque et d'azide de sodium. La représentation graphique de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$ est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, qui se croisent l'une sur l'autre sur l'axe des ordonnées. La valeur de V_m demeure constante tandis que, la valeur de K_m augmente avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. Ceci indique que, l'acide benzoïque et l'azide de sodium sont considérés comme des inhibiteurs compétitifs de l'activité triphénolase de la PPO du champignon de couche. Ces deux inhibiteurs se fixent uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

La constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_i , est obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m) en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Comme c'est indiqué dans le Tableau (5), les constantes d'inhibition (K_i) pour l'acide benzoïque et l'azide de sodium, utilisant le pyrogallol comme substrat sont respectivement, 0.0498 et 3.22 mM.

L'inhibition compétitive de la PPO par l'acide benzoïque et par l'azide de sodium observée dans notre étude, est en accord avec les résultats trouvés pour d'autres PPOs obtenues à partir de différentes sources (Anosike et Ayaebene, 1982; Ziyani et Pekyardimci, 2004; Dogan et al., 2005; Robert et al., 1997). Le caractère inhibiteur de l'acide benzoïque est due à la présence du cycle benzène au niveau de sa structure (Pifferi et al., 1974).

Dogan et al. (2005) ont trouvé que l'azide de sodium est un inhibiteur compétitif de la PPO d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) lorsque le pyrogallol est utilisé comme substrat. Ce même auteur (Dogan et al. 2007), observe une inhibition de type non compétitif pour la PPO de basilic (*Ocimum basilicum* L.) par l'azide de sodium, même en présence du pyrogallol comme substrat.

A ce jour, l'azide est toujours considéré comme étant un inhibiteur de la PPO. Ce comportement est lié à son aptitude à former des complexes avec plusieurs enzymes à cuivre. La toxicité des métalloenzymes par l'azide de sodium, en particulier les enzymes à cuivre, est due principalement à sa susceptibilité de s'associer fortement au métal du site actif, ce qui provoque un changement du nombre de coordination et la conformation du site actif (Shi et al., 2002 ; Gundogmaz et al., 2003).

L'interaction entre l'azide et l'ion cuivre du site actif, peut entraîner une perte de l'ion cuivre de la protéine et par conséquent l'inactivation de l'enzyme (Burton, 1994).

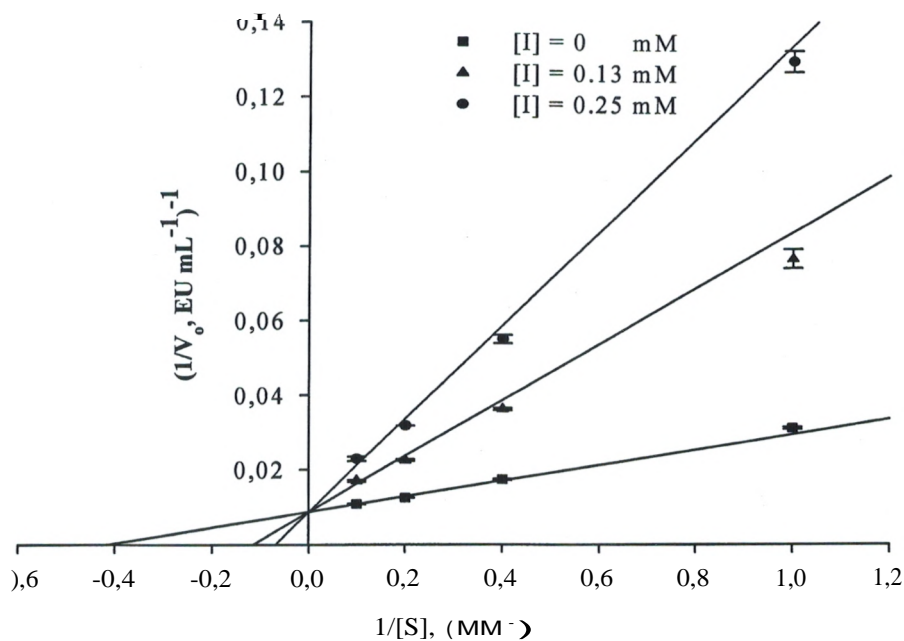


Figure 22: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrogallol par l'acide benzoïque. Concentrations de l'acide benzoïque sont: O (□), 0.13 (Δ), et 0.25 (●) mM. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES.

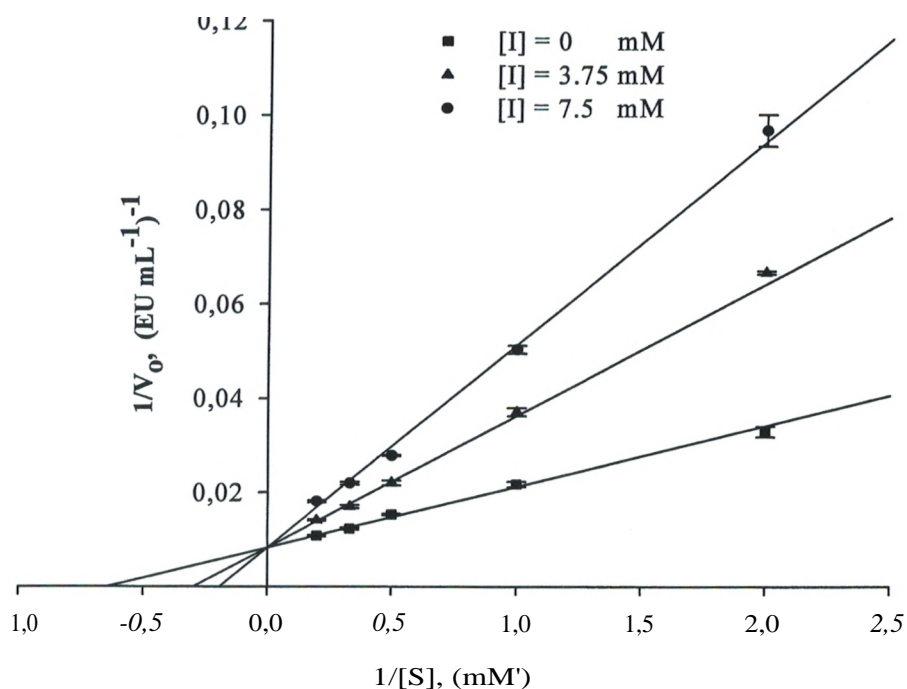


Figure 23: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrogallol par l'azide de sodium. Concentrations de l'acide benzoïque sont: O (□), 3.75 (Δ), et 7.5 (●) mM. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES.

3.8.2 Inhibition mixte-type I de l'activité triphénolase de la PPO du champignon de couche par le fluorure de sodium

Le mécanisme par lequel le fluorure de sodium inhibe l'activité triphénolase de la PPO de champignon de couche a été déterminé. Comme c'est indiqué dans la Figure (24), le fluorure de sodium agit comme un inhibiteur mixte-type I de la PPO lorsque le pyrogallol est utilisé comme substrat.

La Figure (24), montre les graphiques de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence de fluorure de sodium. La représentation graphique de $\frac{1}{11V_0}$ en fonction de $1/[S]$, et une série de courbes droites de pentes différentes, qui se croisent l'une sur l'autre coté abscisses négatives et ordonnées positives, au voisinage de -0.15 et $+0.5$, avec une diminution de la valeur de V_{max} et inversement, une augmentation du K_m . Ces résultats indiquent que le fluorure de sodium est un inhibiteur mixte-type I de l'activité triphénol oxydase de la PPO du champignon de couche.

Les constantes d'équilibre de la fixation de l'inhibiteur avec l'enzyme libre (K_i), et le complexe enzyme-substrat (K_{is}), sont obtenues respectivement à partir des représentations graphiques des pentes et des points d'intersection verticaux, en fonction de la concentration du fluorure de sodium. Les valeurs de K_i et de K_{is} déterminés sont respectivement, 81.08 et 161.14 mM.

Le Tableau (5) montre que pour le fluorure de sodium, le rapport K_{is}/K_i est plus que 1. Ce qui indique que cet inhibiteur se fixe préférentiellement sur la PPO libre (Bar, 2001). Ce comportement suggère que le fluorure de sodium peut se fixer sur l'enzyme libre et sur le complexe enzyme-substrat, et que les constantes d'équilibre pour ses deux interactions sont différentes. Dans ce cas, l'inhibition mixte signifie que, l'inhibiteur affecte l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat, sans pour autant se fixer sur le site actif du substrat (Macrae et Duggleby, 1968).

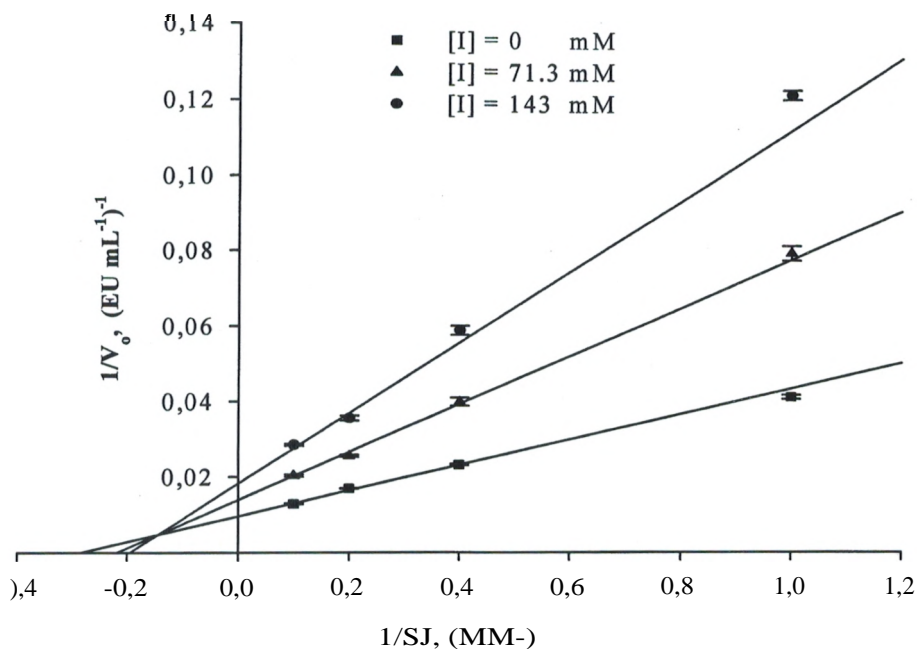


Figure 24: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrogallol par le fluorure de sodium. Concentrations de fluorure de sodium sont: O (.), 71.3 (Δ), et 143 (.) mM. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES.

3.8.3 Inhibition mixte-type II de l'activité diphénolase de la PPO du champignon de couche par le fluorure de sodium

Les constantes d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre (E), K_i , et sur le complexe enzyme-substrat (ES), K_{rs} , sont obtenues respectivement à partir des graphes secondaires de K_m/V_m et $1/V_{max}$ apparentes en fonction de la concentration de l'inhibiteur (I). La cinétique d'inhibition de l'activité diphénolase de la PPO du champignon de couche par le fluorure de sodium est illustrée dans la Figure (25).

Dans les conditions expérimentales utilisées dans cette étude, la réaction d'oxydation du pyrocatechol par la PPO, suit une cinétique de Michaelis-Menten. Les graphiques en double inverse, et une série de courbes droites de pentes différentes, qui se croisent l'une sur l'autre coté abscisses négatives et ordonnées négatives, au voisinage de -6 et -1. Les valeurs de K_m et V_m diminuent simultanément avec l'augmentation de la concentration du fluorure de sodium. Ce qui indique que l'inhibition est mixte-type II.

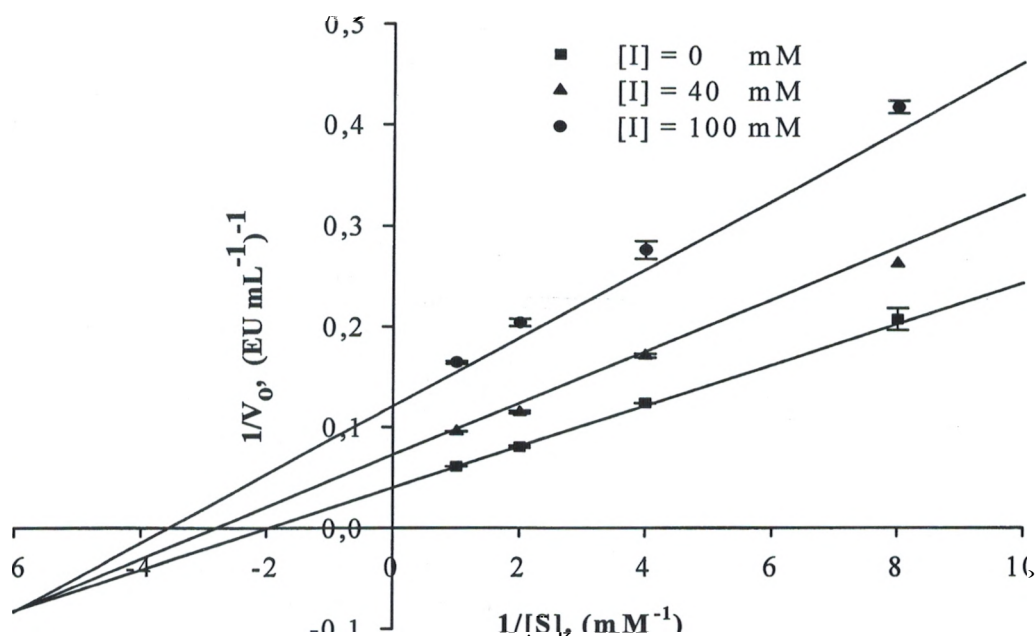


Figure 25: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrocatechol par le fluorure de sodium. Concentrations de fluorure de sodium sont: O (□), 40 (▲), et 100 (●) mM. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES.

L'effet non compétitif étant plus puissant que l'effet compétitif, indique que le fluorure de sodium, inhibe plus facilement l'enzyme libre qu'il inhibe le complexe enzyme-substrat.

Les constantes d'inhibition K_i et K_{i5} sont respectivement, 148.97 et 49.19 mM. La valeur K_i grande devant celle de K_{i5} , indique que l'affinité de l'inhibiteur est plus élevée pour le complexe enzyme-substrat par rapport à l'enzyme libre (Han et al., 2008). Ces résultats sont regroupés dans le Tableau (6).

En terme du mécanisme d'inhibition, les résultats suggèrent que le fluorure de sodium se fixe sur l'enzyme libre et aussi sur le complexe enzyme-substrat (Song et al., 2005).

A partir de ces résultats, on peut supposer que le site de fixation du substrat de l'enzyme peut être occupé soit par le substrat soit par l'inhibiteur; mais, on ne peut pas exclure la possibilité d'existence d'un site spécifique sur la PPO pour la fixation de l'inhibiteur (Waiker et Wilson, 1975).

3.8.4 Inhibition compétitive de l'activité diphénol oxydase de la PPO de champignon de couche par l'acide benzoïque

Le comportement cinétique de l'oxydation du pyrocatechol par la PPO du champignon de couche est étudié. Dans les conditions de l'étude, l'oxydation du pyrocatechol par la PPO suit une cinétique de Michaelis-Menten. Les études cinétiques de l'enzyme en présence de l'acide benzoïque sont représentées par le graphique de Lineweaver-Burk (Figure 26).

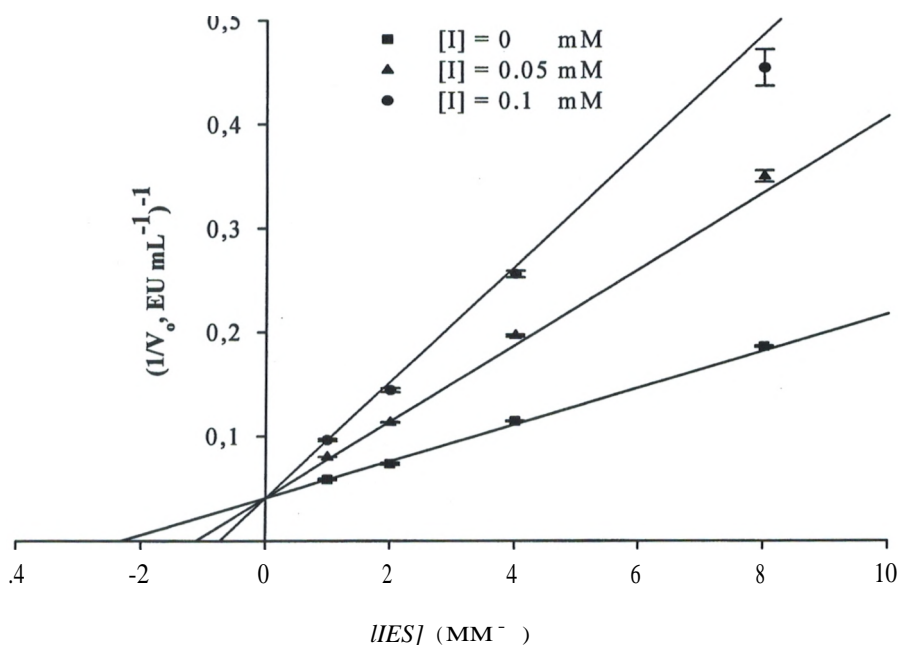


Figure 26: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrocatechol par l'acide benzoïque. Concentrations de l'acide benzoïque sont: O (.), 0.05 (Δ), et 0.1 (●) mM. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES.

Les résultats indiquent que l'acide benzoïque agit en tant qu'inhibiteur compétitif de la PPO. L'augmentation de la concentration de l'acide benzoïque se traduit par une série de courbes droites de pentes différentes, ayant le même point d'intersection sur l'axe $1/V_0$, à environ 0.05.

La constante d'équilibre de la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_i , a été obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m), en fonction de la concentration de l'acide benzoïque. La valeur de la constante ainsi obtenue est de 0.046 mM.

Les constantes cinétique et de l'inhibition sont indiquées dans le Tableau (6).

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Duckworth et Coleman (1970).

3.8.5 Inhibition mixte-type I de l'activité diphénol oxydase de la PPO du champignon de couche par l'azide de sodium

Dans les conditions expérimentales utilisées dans l'étude, l'oxydation du pyrocatechol par la PPO du champignon de couche suit une cinétique de Michaelis-Menten. D'après la représentation de Lineweaver-Burk, les droites pour l'enzyme non inhibée et pour les deux différentes concentrations d'azide de sodium se croisent du côté gauche de l'axe $1/V_0$ et au dessus de l'axe $1/[S]$, avec une diminution de V_{max} et inversement une augmentation du K_m , indiquant que l'azide de sodium provoque une inhibition mixte-type I pour l'oxydation du pyrocatechol par la PPO du champignon de couche (Figure 27).

L'inhibition mixte-type I, indique que l'azide de sodium affecte l'affinité de l'enzyme pour le pyrocatechol, sans se fixer sur le site actif de l'enzyme.

Dans le Tableau 6, on remarque que le rapport K_{is}/K_i est supérieur à 1 pour l'azide de sodium. Ce qui indique que l'affinité de ce composé pour l'enzyme libre est élevée par rapport à celle pour le complexe enzyme-substrat.

Doan *et al.* (2007) ont observé une inhibition de type non-compétitive par l'azide de sodium pour la PPO du basilic (*Ocimum basilicum* L.) utilisant le pyrocatechol comme substrat. Arslan et Dogan (2005) ont trouvé que l'azide de sodium est un inhibiteur non-compétitif pour les PPOs obtenues à partir d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) et de basilic (*Ocimum basilicum* L.) lorsque le pyrocatechol était utilisé comme substrat. De plus, Aydemir *et al.* (2003) ont trouvé que l'azide de sodium agit en tant qu'inhibiteur compétitif pour la PPO extraite à partir d'artichaut de Jérusalem (*Helianthus tuberosus*) lorsque le pyrocatechol était utilisé comme substrat.

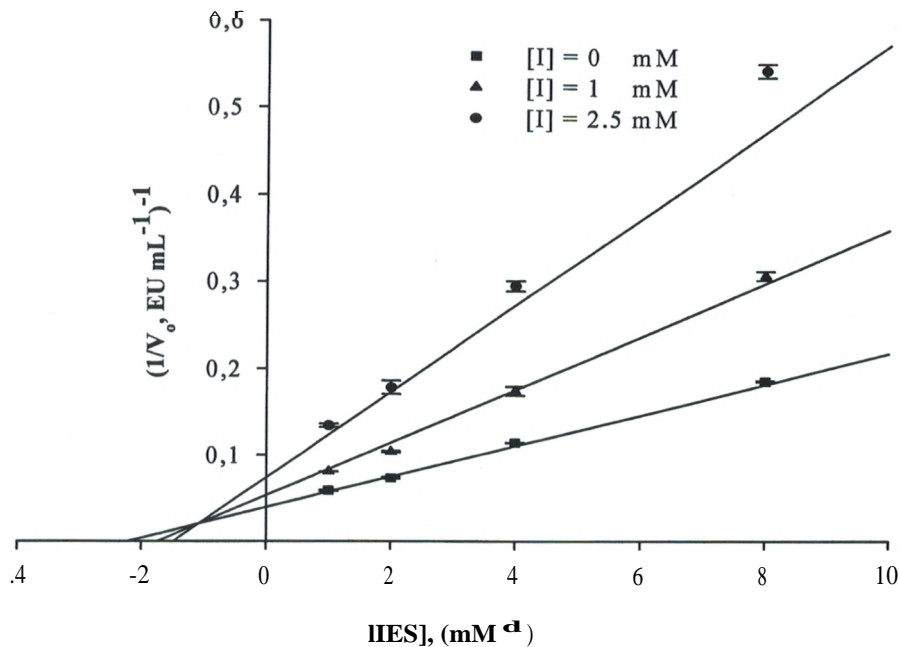


Figure 27: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la PPO de champignon de couche sur le pyrocatechol par l'azide de sodium. Concentrations de l'azide de sodium sont: O (.), 1 (Δ), and 2.5 (.) mM. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES.

Comme c'est décrit ci-dessus, le type d'inhibition et la valeur de K_i dépendent de la structure du substrat et de l'inhibiteur (Vâmos-Vigyâzô, 1981). Le type d'inhibition dépend aussi de l'origine de la PPO étudiée (Robert et *al.*, 1997). Par conséquent, aucune règle générale ne peut être établie pour le type d'inhibition observé.

Les valeurs de K_i et K_{is} indiquées dans les Tableaux (5) et (6) suggèrent que l'inhibiteur le plus efficace pour les deux activités, di- et triphénol oxydases de la PPO de champignon de couche est l'acide benzoïque, à cause de sa valeur K_i qui est la plus faible. Le fait qu'il est un analogue structural des substrats de la PPO peut expliquer son pouvoir inhibiteur élevé.

L'acide benzoïque et l'azide de sodium sont couramment utilisés en technologie alimentaire, et peuvent être utiles dans la prévention du brunissement enzymatique des champignons comestibles (Yagar et Sagirolu, 2002).

3.8.6 Effets de l'acide benzoïque, de l'azide de sodium et de fluorure de sodium sur l'activité diphénol oxydase de la PPO de champignon de couche

L'effet de différentes concentrations de l'acide benzoïque, de l'azide de sodium et du fluorure de sodium sur l'oxydation du pyrocatechol par la PPO de champignon de couche est étudié. Chacun de ces inhibiteurs montre un effet inhibiteur concentration-dépendant sur l'activité enzymatique de la PPO. Les Figures (28), (29) et (30) représentent respectivement le pourcentage d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque, le fluorure de sodium et l'azide de sodium, utilisant le pyrocatechol comme substrat.

L'activité diphénol oxydase diminue significativement avec l'augmentation de la concentration d'inhibiteur.

Afin de comparer le pouvoir inhibiteur de ces différents inhibiteurs, leurs valeurs d'IC₅₀, définie comme étant la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50%, ont été déterminées dans les mêmes conditions. Les valeurs d'IC₅₀ ainsi obtenues sont regroupées dans le Tableau (6).

Sur les trois inhibiteurs testés, l'acide benzoïque est le plus puissant avec une IC₅₀ de 0.147 mM. Le second est l'azide de sodium avec une IC₅₀ de 3.20 mM, suivie du fluorure de sodium avec une IC₅₀ de 123.94 mM.

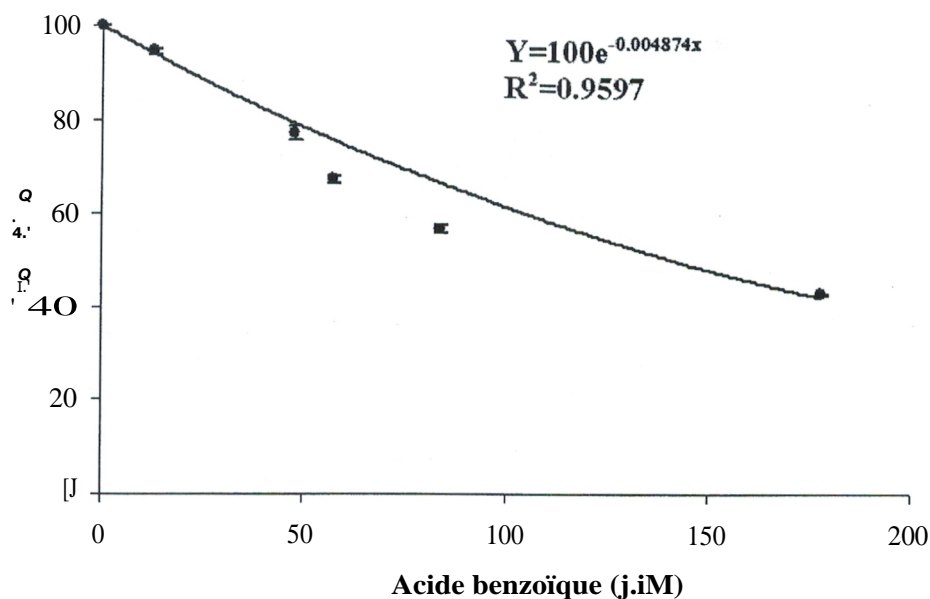


Figure 28: Effet de la concentration de l'acide benzoïque sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de champignon de couche. Les conditions d'essai: 25°C, 2.0 ml de milieu réactionnel contient 0.1 M de tampon K₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 7.0), 0.4 mM de pyrocatechol, et 10 il de la PPO de champignon de couche. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES.

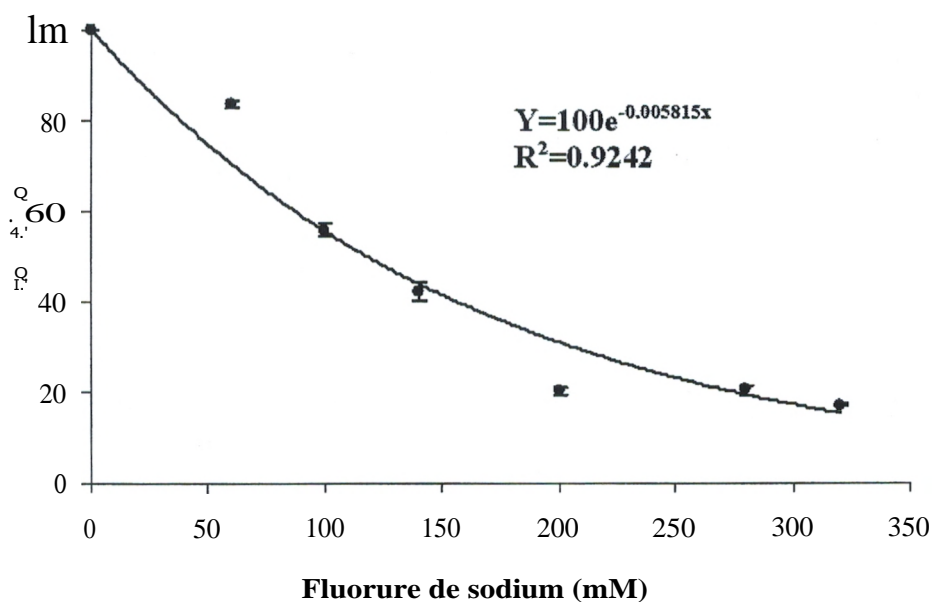


Figure 29: Effet de la concentration du fluorure de sodium sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de champignon de couche. Les conditions d'essai: 25°C, 2.0 ml de milieu réactionnel contient 0.1 M de tampon K₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 7.0), 0.4 mM de pyrocatechol, et 10 pl de la PPO de champignon de couche. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES.

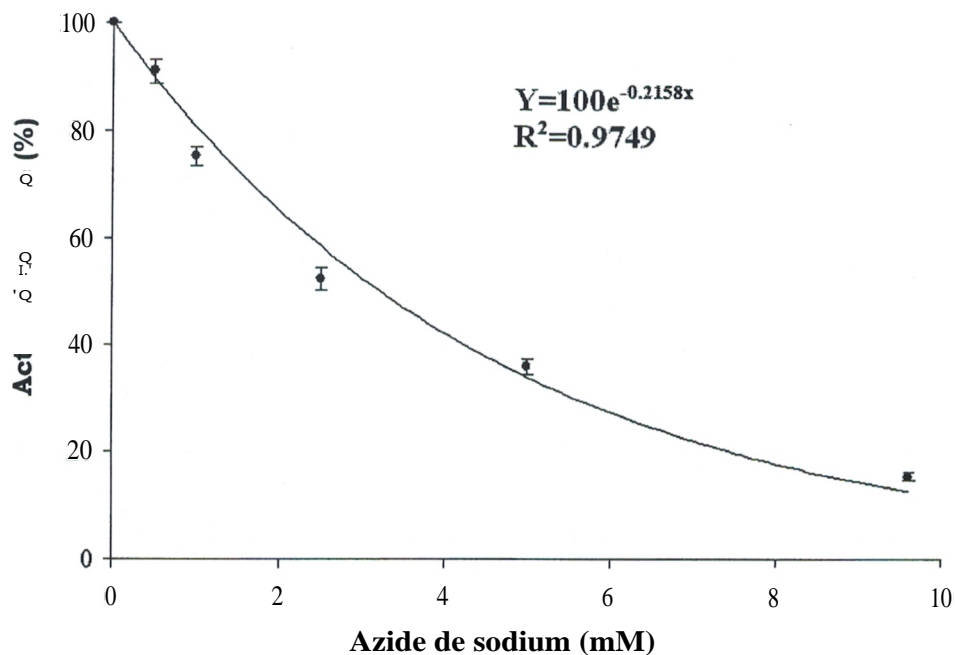


Figure 30: Effet de la concentration de l'azide de sodium sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de champignon de couche. Les conditions d'essai: 25°C, 2.0 ml de milieu réactionnel contient 0.1 M de tampon K₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 7.0), 0.4 mM de pyrocatechol, et 10 jil de la PPO de champignon de couche. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES.

Chapitre 4.
Conclusion générale
et perspectives

Chapitre 4. Conclusion générale et perspectives

Parmi les effecteurs qui interviennent dans le brunissement du champignon de Paris (*Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach) et de nombreux autres produits végétaux, la poiy phénol oxydase joue un rôle essentiel.

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

- 1- La méthode d'extraction et de la purification partielle de la PPO du champignon de Paris, simple à mettre en oeuvre, nous a permis d'obtenir un extrait enzymatique riche en PPO et également très stable. L'avantage principal de cette méthode, est de préserver les deux activités, crésolase et catécholase de l'enzyme.
- 2- L'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO du champignon de Paris est plus élevée par rapport à celles trouvées pour d'autres PPO obtenues à partir de diverses sources végétales.
- 3- La PPO est relativement stable pendant plusieurs jours de stockage à -15°C. Une activité laccase négligeable a été également observée.
- 4- La PPO du champignon de Paris peut oxyder les mono-, di- et les triphénols. La L-tyrosine et le pyrocatéchol ce sont les meilleurs substrats phénoliques de l'enzyme.
- 5- L'influence de la concentration en pyrocatéchol et en pyrogallol sur l'activité enzymatique fait apparaitre, outre la réponse michaelienne classique, l'effet inhibiteur d'un excès de substrat.
- 6- L'activité catécholase de la PPO est plus élevée aux pH voisins de la neutralité. Elle est maximale aux pH 7 et 7.5, en présence des deux substrats : le pyrocatéchol et le pyrogallol.
- 7- L'étude de la stabilité thermique de l'activité catécholase de la PPO montre que sa température optimale apparente est comprise entre 30°C et 40°C.
- 8- La PPO du champignon de Paris a été efficacement inhibée par quelques inhibiteurs classiques.

En particulier et par ordre d'inhibition décroissante: l'acide benzoïque, l'azide de sodium, et le fluorure de sodium. Il est intéressant de remarquer que l'acide benzoïque peut être utilisé pour empêcher le brunissement enzymatique du champignon durant le stockage. En effet c'est un inhibiteur même aux très faibles concentrations.

9- l'inactivation thermique, est le procédé le plus utilisé pour stabiliser les champignons. En effet, l'inactivation thermique de la PPO du champignon de Paris peut être convenablement décrite par un modèle cinétique de premier ordre, dans la gamme des températures comprise entre 45 à 73°, avec une $ZT = 10.1^{\circ}\text{C}$ et une Ea de 208.37 kJ/mol. Le traitement thermique de courte durée à 70°C est efficace pour inactiver totalement l'enzyme et pourrait être considéré donc comme un moyen efficace pour le contrôle de brunissement enzymatique du champignon de Paris.

Aussi un aspect directement pratique de ce travail, est l'étude de l'action des inhibiteurs sur les activités diphénolase et triphénolase de la PPO.

En perspectives, il serait envisageable d'ajouter des étapes de purification supplémentaires pour pouvoir purifier et concentrer la PPO. L'enzyme ainsi obtenue peut être utilisée aussi bien pour le développement de biocapteurs pour le dosage des composés phénoliques, ainsi que pour la dégradation des phénols présents dans les eaux usées industrielles.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abrash, H.I., Shih, D., Elias, W., and Malekmehr, F. 1989. A kinetic study of the air oxidation of pyrogallol and purpurogallin. *International Journal of Chemical Kinetics*. 21: 465-476.
- Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J. 2010. Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*. 55: 2363-2367.
- Adnan, T. A. B. T., Augustin, M.A., and Ghazali H M. 1986. Polyphenoloxidase from Starfruit (*Averrhoa carambola*, L.). *Pertanika*. 9 : 219-224.
- Ameer, Q and Adeloju, S.B. 2009. Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B*. 140: 5-11.
- Amiot, M.J; Flueriet, A; Chenynier, V; Nicolas, J. 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: Phytochemistry of fruits and vegetables. (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) *Clarendon Press, Oxford*. 51-85.
- Anderson, J.V and Morris, C.F. 2001. An improved Whole-Seed Assay for Screening Wheat Germplasm for Polyphenol oxidase activity. *Crop Science*. 41: 1697-1705.
- Anderson, J.W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*. 7: 1973-1988.
- Anosike, E.O and Ayaebene, A.O. 1982. Properties of polyphenol oxidase from tubers of the yam *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*, 21: 1889-1893.
- Anthony G. E and Barrett D. M. 2002. Kinetics parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in canots and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4119-4125.
- Arsian, O and Dogan, S. 2005. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 1499-1504.
- Arsian, O., Temur, A., Tozlu, t. 1997. Polyphenol oxidase from *Allium sp.* *J. Agric. Food Chem*. 45: 2861-2863.
- Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E. 2009. An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78: 553-556.
- Atlow, S.C., Bonadonna-Aparo, L., Klibanov, A.M. 1984. Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnol. Bioeng*. 26: 599-603.
- Aydemir, T. 2010. Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus officinalis* L. *International Journal of Food Properties*. 13: 475-485.
- Aydemir, T., Kavrayan, D., Çinar, S. 2003. Isolation and characterisation of polyphenoloxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) Sayi. 21: 115-25.
- Baldwin M.J., Root D.E., Pate J.E., Fujisawa K., Kitajima N., Solomon E.I. 1992. Spectroscopic studies of side-on peroxide-bridged binuclear copper (II) model complexes of relevance to oxyhemocyanin and oxytyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10421-10431.
- Bar, M. 2001. Kinetics and physico-chemical properties of white-rot fungal laccases.. 113 p. Magister scientiae, University of the Free State, Bloemfontein., 113 p.
- Barrett, N. E., Gryison, A.S., and Lewis, M. J. 1999. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Dairy Research*. 66: 73-80.
- Barthet, V. J. 1997. Polyphenol Oxidases from Cassava (*Manihot esculenta* C.) Root: Extraction, Purification and Characterization. A Thesis Submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements for the degree Philosophiae Doctor in the Department of Food Science and Agricultural Chemistry University McGill (Macdonald Campus) Montreal, PQ, Canada, i-ii.
- Baurin, N., Arnouit, E., Scior, T., Do, Q.T., Bernard, P. 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopharmacol*. 82: 155-8.
- Benjakul, S., Visessanguan W., Tanaka M. 2005. Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Journal of Food Biochemistry*. 29: 470-485.
- Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E., Mayer, A. 1977. Catechol oxidase from green olives: properties and partial purification. *Phytochemistry*. 16: 1153-1158.

- Bertrand, G., 1896. Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxidant, d'origine végétale. *Comt. Rend. Acad. Sci. Paris.* 122: 1215-1217.
- Bevilaqua J.V., Cammarota M.C., Freire D.M.G., and Sant'Anna Jr, G.L. 2002. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazil. J. Chem. Eng.* 19: 151-158.
- Bonner, Jr W.D. 1956. Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology.* 8: 427-452.
- Bonner, W.D. 1955. *Plant Physiol.*, 30, XXX.
- Bouchilloux, S., McMachffl, P., and Mason, H.S. 1963. The Multiple forms of mushroom tyrosinase, purification and molecular properties of the enzymes. *The Journal of Biological Chemistry.* 238: 1699-1706.
- Braaksma A., Schaap D.J. 1996. Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. *Postharvest Biology and Technology.* 7: 119-127.
- Buckow, R., Weiss, U., Knorr D. 2009. Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 10 : 441-448.
- Burton, S.G. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today.* 22: 459-487.
- Burton, S.G., Boshof, A., Edwards, W., Rose, P.D. 1998. Biotransformation of phenols using immobilized polyphenol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 5: 411-416.
- Cabanes, J., Chazarra, S., and Garcia-Carmona, F. 2002. Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. *J. theo. Biol.* 214: 321-325.
- Carvalho, G.M.J., Alves, T.L.M., Freire, D.M.G. 2000. L-DOPA production by immobilized tyrosinase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84: 791-800.
- Casafiola-Martin, G.M., Khan, M.T.H., Marrero-Ponce, Y., Ather, A., Sultankhodzhaev, M.N and Torrens, F. 2006. New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 16: 324-330.
- Chan, H. T and Yang, H. Y. 1971. Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the mcfarlin cranberry. *Journal of food science.* 35: 169.
- Chang, T. S. 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2440-2475.
- Chen, L and Flurkey, W.H. 2002. Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry.* 5: 109-120.
- Chen, Q.X., Lu, H.Y., Zhu, C.M., Lin, H.N., Zhou, H.M. 1998. The effect of Nthiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem Mol Biol Int.* 45: 465-73.
- Chevalier, T., Rigal, D.D., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Gaillard, F., Richard-Forget, F., and Fils-Lycaon, B.R. 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiology.* 119: 1261-1269.
- Cho, Y.K and Ahn, H.K. 1999a. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry.* 23: 577-592.
- Cho, Y.K and Ahn, H.K. 1999b. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry.* 23: 593-605.
- Chutintrasri, B and Noomhorm, A. 2006. Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. *LWT-Food Sei. Technol.* 39: 492-495.
- Claus, H and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology,* 29: 13-14.
- Craft C. C., Audia W. M. 1962. Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Bot. Gaz.* 123: 211-219.
- Cui, Y., Barford, J.P., and Renneberg, R. 2006. A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences.* 22: 1279-1281.
- Dawson, C.R and Magee, R.J. 1955. Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology.* 2: 817-831.

- Decker, H and Terwilliger N. 2000. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 1777-1782.
- Decker, H. 2005. Copper proteins with dinuclear active sites. In: King, B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, II: 1159-1173.
- Decker, H., Jaenicke, E. 2004. Recent findings on the phenoloxidase activity and antibacterial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 673-687.
- 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.
- Devece, C., Rodriguez-Lopez, J. N., Fend!, L. G., Tudela, J., Catala, J. M., de los Reyes, E., Garcia-Canovas, F. 1999. Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4506-4511.
- Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., and Voragen, A.G.J. 2002. Note & Tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 306: 336-339.
- Dijkstra, L., Waiker, J. R. L. 1991. Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sei. Food Agric.* 54: 229-234.
- Dincera, B., Colaka, A., Aydinb, N., Kadioglu, A., Gfner, S. 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). *Food Chemistry*. 77: 1-7.
- Dogan, M and Dogan, S. 2003. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *Chaubardii* var. *chaubardiz*). *J Food Chem.* 39: 1-9.
- Dogan, M., Arslan, O., Dogan, S. 2002. Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars. *Int. J Food Sci. Technol.* 37: 415-423.
- Dogan, S., Turan, P., Dogan, M., Alkan, M., Arsian, O. 2007. Inhibition kinetic of *Ocimum basilicum* L. polyphenol oxidase. *Int J Chem React Eng.* 5: 1-12.
- Dogan, S., Turan, P., Dogan, M., Arslan, O., and Alkan, M. 2005a. Purification and characterization of *Ocimum basilicum* L. Polyphenol Oxidase. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 10224-10230.
- Dogan, S., Turan, Y., Ertfirk, H., Arsian, O. 2005b. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 53: 776-785.
- Duckworth, H.W and Coleman, J.E. 1970. Physicochemical and kinetic Properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 245: 1613-1625.
- Duran, N., Esposito, E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ.* 28: 83-99.
- Eicken, C., Krebs, B and Sacchettini, J.C. 1999. Catechol oxidase - structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.
- Eidhin, N., Myrphy, E., O'Beirne, D. 2006. Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh. cv Bramley' Seedling) purification strategies and characterization. *Journal Of Food Science*. 71: 51-58.
- El-Bayoumi, M.A and Frieden, E. 1957. A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications. 79: 4854-4858.
- Erat, M., Sakiroglu, H., and Kufrevioglu, O. I. 2006. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from *Ferula* sp.. *Food Chemistry*. 95: 503-508.
- Escribano J., Tudela J., Garcia-Carmona F., Garcia-Canovas F. 1989. A kinetic-study of the suicide inactivation of an enzyme measured through coupling reactions: application to the suicide inactivation of tyrosinase, *Biochem. J* 262: 597-603.
- Espin, J. C., Wichers, H. J. 1999. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3518-3525.

- Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F. 1997. Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chemistry*. 45: 1090-1094.
- Espin, J.C., Morales, M., Varôn, R. 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 231: 237-246.
- Fan, Y and Flurkey, W.H. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabellamushrooms*. *Phytochemistry*. 65: 671-678.
- Fenoli, L.G., Pefialver, M.J., Rodriguez-López, J.N., Garcia-Ruiz, P.A., Garcia-Cánovas, F and Tudela, J. 2004. Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- Fenoil, L.G; Rodríguez-López, J.N; Varôn, R; Garcia-Ruiz, P.A; Garcia-Cánovas, F and Tudela, J. 2000. Action mechanism of tyrosinase on meta-and para-hydroxylated monophenols. *Biol. Chem.* 381: 313-320.
- Flurkey, W.H. 2002. 'Laccase". In *Handbook of Food Enzymology* (J.R. Whitaker, A.G.J.Voragen, and D.W.S. Wang, Eds.) Marcel Dekker, Inc. Chapter 40, 525-538.
- Fortea, M. I., Lapez-Miranda, S., Serrano-Martinez, A., Carreno, J and Nunez-Delgado, E. 2009. Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (*Crimson seedless*). *Food Chemistry*. 113: 1008-1014.
- Frieden, E and Ottesen, M. 1959. A Simplified method for the purification of mushroom polyphenol oxidase. *Short Communications*. 34: 248-251.
- Friedman, M. 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540.
- Gabriela, R and Bulancea, M. 2005. Thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase extracted from white grapes. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. IX: 3-10.
- Gandia-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F and Escribano, J. 2005. Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* 386: 601-607.
- Gao, Z.J., Han, X.H., Xiao, X.G. 2009. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves. *Food Chemistry*. 117: 342-348.
- Garcia-Borrón J. C., Solano F. 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173.
- Garcia-Molina, F., Pefialver, M.J., Fenoil, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varôn, R., Garcia-Cánovas, F., Tudela, J. 2005. Kinetic study of monophenol and o-diphenol binding to oxytyrosinase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 32: 185-192.
- Gasowska, B., Wojtasek, H., Hurek, J., Drag, M., Nowak, K and Kafarski, P. 2002. Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl)methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* 269: 4098-4104.
- Gauillard, F., Richard-Forget, F and Nicolas, J. 1993. New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry*. 215: 59-65.
- Gawlik-Dzild, U., Szymanowska, U; Baraniak, B. 2007. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *Botrytis italica*) florets. *Food Chemistry*. 105: 1047-1053.
- Gawlik-Dziki, U., Ziotek, Z., and Swieca, M. 2008. Characterisation of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var capitata* L.). *Food Chemistry*. 107: 129-135.
- Gheibi, N., Saboury, A. A., Haghbeen, K and Moosavi-Movahedi, A. A. 2006. The effect of some osmolytes on the activity and stability of mushroom tyrosinase. *J. Biosci.* 31: 355-362.
- Giannenas I., Tontis D., Tsalie E., Chronis E.F., Doukas D., Kyriazakis I. 2010. Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*. 89 : 78-84.

- Gnangui, S. N., Dué E. A., N'guessan Kouadio, J-P. E and Kouamé, L. P. 2009. Effect of heat treatment on edible yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata* cv longbô) polyphenol oxidase activity: kinetic and thermodynamic analysis. *Journal of animal and plant sciences*. 2: 128 - 137.
- Golbeck, J.H and Cammarata, K.V. 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol*. 67: 977-984.
- Gouzi, H and Benmansour, A. 2007. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 5: 1-11.
- Gundogmaz, G., Dogan, S., Arsian, O. 2003. Some kinetic properties of polyphenol oxidase obtained from various salvia species (*Salvia viridis* L., *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia tomentosa* Miller). *Food Sci Technol Int*. 9: 308-315.
- Haghbeen, K., Saboury, A.A., Karbassi, F. 2004. Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1675: 139-146.
- Haldane, J.B.S. 1930. The enzymes. Green and Co Ed, Londres.
- Han, P., Chen, C.Q., Zhang, C.L., Song, K.K., Zhou, H.T., Chen, Q.X. 2008. Inhibitory effects of 4-chlorosalicylic acid on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities. *Food Chem*. 107: 797-803.
- Haïe! E., Mayer A. M., Lerner H. R. 1970. Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sa. Food Agric*. 21: 542-544.
- Haïe!, E., Mayer, A.M., Shain, Y. 1964. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiologica Plantarum*. 17: 921-930.
- Hasegawa, S and Maier V. P. 1980. Polyphenol Oxidase of Dates *J. Agric. Food Chem*. 28: 891-893.
- Himmelwright R. S., Eickman N. C., Solomon E. I. 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc*. 102.
- Ikehata, K and Nieceil, J.A. 2000. Celer and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog*. 16: 533-540.
- Irwin, P.L., Pfeffer, P.E., Doner, L.W., Sapers, G.M., Brewster, J.D., Nagahashi, G., Hicks, K.B. 1994. Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomalto-cligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydr. Res*. 256: 13-27.
- J Njagi, M M. Chernov, J. C. Leiter, and S Andreescu. 2010. Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem*. 82: 989-996.
- Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Nicolas J. 1989. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*. 28: 2903-2907.
- Janovitz-Klapp, A. H., Richard, F. C., Goupy, P. M., Nicolas, J. J. 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem*. 38: 926-931.
- Jeong S.C, Jeong Y.T, Yang B.K, Islam R, Koyyalamudi S.R, Pang G, Cho K. Y, Song C. H. 2010. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research*. 30: 49-56.
- Jiang, Y. M. 1999. Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chemistry*. 66: 75-79.
- Johannes, C., Majcherczyk, A. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*. 78: 193-199.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res*. 102: 1459-1483.
- Joslyn, M.A and Penting, J.D. 1951. Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res*. 3: 1-44.
- Kahn, V. 1985. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenylase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sa*. 50: 111-115.
- Kahn, V. 1997. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *J. Food Sa*. 42: 38-43.

- Keilin, D and Mann, T. 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B*. 125: 187-204.
- Keilin, D., Mann T. 1940. Some properties of laccase from the latex of Lacquer trees. *Nature*. 145: 304.
- Kent D., Sheridan C., Tomkinson H.A., White S., Hiscott P., Grierson I. 2003. Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin modulates human retinal pigment epithelial cell behaviour *in vitro*. *Experimental Eye Research*. 76: 213-219.
- Kertesz, D and Zito, R. 1962. Phenolase. In *Oxygenases*, ed. O. Hayaishi. Academic Press, New York. 307.
- Khan, A.A., Akhtar, S., Husain, Q. 2006. Direct immobilization of polyphenol oxidases on Celte 545 from ammonium sulfate fractionated proteins of potato (*Solanum tuberosum*). *J. Mol. Catal B: Enzym.* 40: 58-63.
- Khatun, S., Absar, N., and Ashraduzzaman, M. 2001. Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4: 1129-1132.
- Kiabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.O and Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*. 5: 1084-1090.
- Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bierofi, M. 2008. Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*. 89: 171-174.
- Kolcuolu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N. 2006. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*. 101: 778-785.
- Kubowitz, F. 1938. Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung*. 299: 32-57.
- Kuby, S. A. 1991. In a study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding (Volume I), CRC Press Inc., Boca Raton. 301-339.
- Kumar Anil, V.B., Mchane Kishor, T. C., Murugan. K. 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra* L.). *Food Chemistry*. 110: 328-333.
- Kuwabara T and Katoh Y. 1999. Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol*. 40: 1029-1035.
- Lax A. R and Vaughn K. C. 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol*. 96: 26-31.
- Lerch K. 1995. Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. In *Enzymatic browning and its prevention*. C. Y. Lee, J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society: 64-80.
- Lerch, K. 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine 3-monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. Marcel Dekker, New York, Basel. 143-86.
- Lerch, K. 1982. Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem*. 257: 6414-6419.
- Lerman, L.S. 1953. A biochemically specific method for enzyme isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 39: 232-236.
- Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J. 2010. Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B*. 144: 18-22.
- Likhitwitayawuid, K. 2008. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Curr. Sci*. 94: 44-52.
- Lineweaver, H and Burk, D. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc*. 56: 658-666.
- Loncle, D. 1992. Génie enzymatique. Biosciences et Techniques. Éditeurs doin, Paris. 393 pages.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randail, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 93: 265-271.

- Luh, B.S and Phthalopol, B. 1972. Characteristics of polyphenol oxidase related to browning in Cingstone peaches. *J. Food Sci.* 37, 264
- Macrae, A.R and Duggleby, R.G. 1968. Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase. *Phytochemistry*. 7: 855-861.
- Maeda, K and Fukuda, M. 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem.* 42: 361-368.
- Marangoni, AG. 2002. Enzyme kinetics: a modern approach. John Wiley and Sons, N.Y. p 248.
- Marin-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., Garcia-Canovas, F., Garcia-Ruiz, P.A., 2006. Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on d-sorbitol cinnamic ester. *J. Biotechnol.* 126: 295-303.
- Marin-Zamora M. E., Rojas-Melgarejo, F., Garcia-Cánovas, F., Garcia-Ruiz P. A. 2009. Production of o-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *Journal of Biotechnology*. 139: 163-168.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A., Poggi, V. 2003. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*. 63: 745-752.
- Martinez, M. V., Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 195-200.
- Matheis, G. 1987a. Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11: 5-12.
- Matheis, G. 1987b. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic Browning and Potato Constituents. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11: 33-41.
- Mathew, A.G and Parpia, H.A. 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Adv. Food Res.* 19: 75-145.
- Mayberry, J.M and Mallette, M.F. 1962. Inhibition of the tyrosinase oxidation of one substrate by another. *Journal of General Physiology*. 45: 1239-1245.
- Mayer, A.M and Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*. 18: 193-215.
- Mayer, A.M. 1987. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants-Recent progress. *Phytochemistry*. 26: 11-20.
- Mayer, A.M., Harel, E and Ben-Shaul, R. 1966. Assay of catechol oxidase-A critical comparison of methods. *Phytochemistry*. 5: 783-789.
- Mayer, A. M.; Harel, E. 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. *Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science.* 373-398.
- McCord, J. D and Kilara A. 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Food Sci.* 48: 1479-1483.
- McEvily, A. J., Iyengar, R., Otwell, W. S. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 253-273.
- Métais, P. 1979. Biochimie clinique. 1 - Biochimie analytique. *Ed. Simep.* Page 93.
- Min, K., Park, D-H., Yoo, Y. J. 2010. Electroenzymatic synthesis of L-DOPA. *Journal of Biotechnology*. 146: 40-44.
- Mm, K., Yoo, Y.J., 2009. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase-SWNTs-Ppy composite electrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.
- Miranda, M., Bonfigli, A., Zai'ivi, O., Ragnelli, M., Pacioni, G., Botti, D. 1992. Truffle tyrosinase: Properties and activity. *Plant Science*. 81: 175-182.
- Miranda, M., Zarivi, O., Bonfigli, A., Ragnelli, M., Rocchina, P., Aimola, P., Pacioni, G. 1996. White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science*. 120: 29-36.
- Monteriali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R. 2010. A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in *must* and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189-194.
- Mosher, D.B., Pathak, M.A., Fitzpatric, T.B eds. 1983. Update: dermatology in general medicine. pp 205-225; McGraw Hill, New York.
- Naish-Byfield, S and Riley, P.A. 1992. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.* 288: 63-67.

- Nelson, R.M and Mason, H.S. Tyrosinase (mushroom).1970; *In Methods in Enzymology* (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.), *Academic Press*, New York. 17: 626-632.
- Neyes, V.A., da Silva, M.A., 2007. Polyphenol oxidase from yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*). *J. Agric. Food. Chem.* 55: 2424-2430.
- Nufiez-Deicado, E., Bru, R., Sé.nchez-Ferrer, A., Garcia-Carmona, F. 1996. Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. *Journal of Chromatography. B* 680: 105-112.
- Ôba, K; Iwatsuki, N; Uritani, I; Alvarez, A.M; and Garcia, V.V. 1992. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes in banana bud. *.Biosci. .Biotech. Biochem.* 56: 1027-1030.
- Ônez, Z., Karaku, E., and Pekyardimci, . 2008. Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera* L.): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry.* 32: 396-414.
- O'Sullivan, W. J. 1969. Stability constants of metal complexes. *In Data for biochemical research.* R. M.C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot, K. M. Joncs. Oxford, England: 423-434.
- Palma-Orozco, G., Ortiz-Moreno, A., Dorantes-Alvarez, L., Sampedro, J.G., Najera H. 2011. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). *Phytochemistry.* 72: 82-88.
- Palmer, J.K. 1963. Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology.* 38: 508-513.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C. 1994a. *Agaricus bisporus* tyrosinase-I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215-221.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C. 1994b. *Agaricus bisporus* tyrosinase-II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities. *Int. J. Biochem.* 26: 223-228.
- Park, Y.K., Sato, H.H., Almeida, T.D., and Moletti, R.H. 1980. Polyphenol oxidase of mango. *J. Food Sei.* 45: 1619-1624.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S., Bac, H. 2007. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *PhytotherRes.* 21: 805-816.
- Pathak, S.O and Ghole, V.S. 1994. Affinity purification and properties of polyphenoloxidase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry.* 36: 1165-1167.
- Patil, S.S and Zucker, M. 1965. Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of Biological Chemistry.* 240: 3938-3943.
- Patnaik, P.R. 2002. Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology.* 31: 198-200.
- Pena, N., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. 2001. Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase modified reticulated vitreous carbon electrodes. *Talanta.* 55: 179-187.
- Pérez-Gilabert M., Morte A., G-Carmona, F. 2004. Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science.* 166: 365-370.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M and Garcia-Carmona, F. 2001. Monophenolase activity of latent *Terfezia claveryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiology Plantarum.* 133: 203-209.
- Pifferi, P.G., Baldassari, L., Cultrera, R. 1974. Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J Sci Food Agric.* 25: 263-270.
- Powell, A., Siu, N., Inlow, J., and Flurkey, W.H. 2007. Immobilized metal ion affinity chromatography of mushroom tyrosinase. *Scientific Journals International: Journal of Physical and Natural Sciences.* 1:1-13.
- Qiu, L., Chen, Q.H., Zhuang, J.X., Zhong, X., Zhou, J.J., Guo, Y.J., Chen, Q.X. 2009. Inhibitory effects of a-cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry.* 112: 609-613.
- Râpeanu, G., Van Loey A., Smout, C., and Hendrickx, M. 2006. Thermal and high pressure inactivation kinetics of Victoria grape polyphenol oxidase: from model systems to grape must. *Journal of Food Process Engineering.* 29: 269-286.

- Reinhammar B., Malmström B. G. 1981. "Blue" copper-containing oxidases. in *Copper Proteins*. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons: 109-149.
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A and Sanjust, E. 2002. Tyrosinase Inhibition: *General and Applied Aspects*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 17: 207-218.
- Rivas, N.D.J and Whitaker, J.R. 1973. Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*. 52: 501-507.
- Robb, D.A. 1984. Tyrosinase. In *copper Proteins and Copper Enzymes*, ed. R. Lontie. *CRC Press, Boca Raton, Florida*. 207-241.
- Robert, C., Rouch, C., Cadet, F. 1997. Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem*. 59: 355-60.
- Rocha, A.M.C.N., Cano, M.P., Galeazzi, M.A.M., and Morais, A.M.M.B. 1998. Characterisation of "Starking" apple polyphenoloxidase. *J. Sci. Food Agric*. 77: 527-534.
- Rodakiewicz-Nowak, J and Ito, M. 2003. Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces sp.* REN-2 1. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 78: 809-816.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Monkiewicz, M., Haber, J. 2002. Enzymatic activity of the *A. bisporus* tyrosinase in AOT/isooctane water-in-oil microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect*. 208: 347-356.
- Rodriguez-Lopez J. N., Tudela J., Varon R., Garcia-Cannonas F., Garcia-Canovas F. 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem*. 267: 3801-3810.
- Ros, J.R., Rodriguez-López, J.N and Garcia-Cánovas, F. 1994. Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42.
- Royse, D. J. 1996. Specialty mushrooms. - *In Progress in New Crops (Ed. J. Janick)*, 464-475. *ASHS Press, Arlington, USA*.
- Samborska, K. 2007. Enhancement of thermal stability of aspergillus oryzea alpha-amylase using stabilizing additives. *Acta Agrophysica*. 9: 233-244.
- Sârichez-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., Rodriguez-Lopez J. N., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F. 1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1247: 1-11.
- Schoenbein, C.F. 1856. On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine*. 11: 137-141.
- Seetharam, G., Saville, B.A. 2002. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. *Enzyme Microb. Technol*. 1: 747-753.
- Seetharam, G. and Saville, B.A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res*. 37: 436-440.
- Selinheimo, E., Gasparetti, C., Mattinena, M-L, Steffensen, C.L., Bucherta, J., Kruus, K. 2009. Comparison of substrate specificity of tyrosinases from *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 44: 1-10.
- Seo, S-Y., Sharma, V. K., and Sharma, N. 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chemistry*. 51 : 2837-2853.
- Shan, D., Mousty, C., and Cosnier, S. 2004. Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem*. 76: 178-183.
- Sharma, N.M., Kumar, S., and Sawhney, S.K. 2003. A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 38: 137-141.
- Shi Y-L., Benzie I.F.F., Buswell J A. 2002. Role of tyrosinase in the genoprotective effect of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Lfe Sciences*. 70: 1595-1608.
- Shi, C., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y., and Liu, Q. 2001. The Purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 381a-381h.

- Shi, C., Liu, Q., Dai, Y., Xie, Y., Xu, X. 2002. The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco. *Acta Biochim Polon.* 49: 1029-1035.
- Siegbahn, P.E.M. 2003. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Bio! Inorg Chem.* 8: 567-576.
- Siegbahn, P.E.M. 2004. The catalytic cycle of catecho! oxidase. *J Biol Inorg Chem.* 9: 577-590.
- Singh, N., Singh, R., Kaur, K., Singh, H. 1999. Studies of the physico-chemical properties and polyphenoloxidase activity in seeds from hybrid sunflower (*Helianthus annuus*) varieties grown in India. *Food Chemistry.* 66: 241-247.
- Smith, D.M and Montgomery, M.W. 1985. Improved methods for the extraction of polyphenol oxidase from d'Anjou pears. *Phytochemistry.* 24: 901-904.
- Smith, J.L and Krueger, R.C. 1962. Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *The Journal of Biological Chemistry.* 237: 1121-1128.
- Socerhall, I and Soderhall, K. 1989. Purification of prophenol oxidase from *Dacus carota* cell cultures. *Phytochem.* 28: 1805-1809.
- Sojo, M.M., Nufiez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., and Séxichez-Ferrer, A. 1998. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 800 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4924-4930.
- Solomon, E.I., Chen, P., Metz, M., Lee, S-K., and Palmer, A.E. 2001. Oxygen binding, activation and reduction to water by copper proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 4570-4590.
- Solomon, E.I; Sundaram, U.M and Machonkin T.E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
- Song, K.K., Lin, J.F., Chen, Q.X. Inhibitory effects of 4-isopropylsalicylaldehyde on mushroom tyrosinase. *Food Chem* 2005; doi: 10.1016/j.foodchem. 2005.08.02 1.
- Soysal, Ç. 2008. Kinetics and thermal activation /inactivation of starking apple poly phenol oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation.* 32: 1034-1046.
- Soysal, C., and Söy!emez, Z. 2004. Properties of wheat bran polyphenol oxidase. *Nahrung/Food.* 48: 5-8.
- Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., Thipyapong, P. 1998. Polyphenol oxidase. *In Polyphenols* 96. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 23-250.
- Stelzig, D.A., Akhtar, S. and Ribeiro, S. 1972. Catechol oxidase of red delicious apples. *Phytochem.* 11: 535 - 539.
- Strothkamp, K.G., Jolley, R.L and Mason, H.S. 1976. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical And Biophysical Research Communications.* 70: 519-524.
- Strubi, P., Escher, F., and Neukom, H. 1975. Neuere arbeiten uber die technologie der apfehiektar herstellung. *Industry Obst-Gemuseverwert.* 60: 349-351.
- Stumbo, C. R. 1973. *Thermobacteriology in food processing* (2nd Ed). New York: Academic Press, pp. 336.
- Sun, W.Q., Payne, G.F., Moas, W.S.G.L., Chu J.H., Wallace K.K. 1992. Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater. *Biotechnol. Prog.* 8: 179-186.
- Tan, Y., Guo, X., Zharig, J., Kan, J. 2010. Amperometric catechol biosensor based on polyani!ine-polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics.* 25: 1681-1687.
- Terefe, N. S., Yang, Y. H., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C. 2009. High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 11: 52-60.
- Thomas, P and Janave, M.T. 1986. Isoelectric focusing evidence for banana isoenzymes with mono and diphenolase activity. *Journal Of Food Science.* 51: 384-387.
- Thygesen, P.W., Dry, I.B., and Robinson, S.P. 1995. Polyphenol oxidase in potato. *Plant Physiol.* 109: 525-531.
- Topçu, S., Sezgintirk M. K., Dinçkaya, E. 2004. Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosensors and Bioelectronics.* 20: 592-597.
- Trebst, A and Depka, B. 1995. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research.* 46: 41-44.

- Tsai S-Y, Wu T-P, Huang S-J, Mau J-L. 2007. Nonvolatile taste components of *Agaricus bisporus* harvested at different stages of maturity. *Food Chemistry*. 103: 1457-1464.
- Tuncagil, S., Kayahan, S.K., Bayramoglu, G., Arica, M.Y., Toppare, L. 2009. L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 58: 187-193.
- Turner, E.M. 1974. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society*. 63: 541-547.
- Ûnal, M. Û. and Sener, A. 2006. Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *J. Sci. Food Agric*. 86: 2374-2379.
- Ûnal, M. U., Sener, A., and Sen, K. 2007. Characterization of Sultaniye grape (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana) polyphenol oxidase. *International Journal of Food Science and Technology*. 42: 1123-1127.
- Ûnal, M.Û. 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anarnur banana (*Musa cavendishiz*). *Food Chemistry*. 100: 909-913.
- Vémos-Vigyâzô, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 15: 49-127.
- Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H and Wichers, H.J. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*. 45: 1309-1323.
- Van Leeuwen J and Wichers H.J. 1999. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol Res*. 103: 413-418.
- Van Loey, A., Haentjens, T.H., Hendrickx, M.E and Tobback, P.P. 1997. The development of an enzymic time temperature integrator to assess thermal efficacy of sterilisation of low-acid canned foods. *Food Biotechnol*. 11: 147-168.
- Vanni, A., Gastaldi, D and Giunta, C. 1990. Kinetic investigations on the double enzymatic activity of the mushroom tyrosinase. *Ann. Chim. (Rome)*. 80: 35-60.
- Varoquaux, P. 1978. Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). *Thèse Univ. de Dijon*, 134 p.
- Vaughn K. C., Lax A. R., Duke S. O. 1988. Polyphenol oxidase : The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant*. 72: 659-665.
- Vaughn, K.O and Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant*. 60: 106-112.
- Waliszewski, KN., Márquez, O., Pardio, VT. 2009. Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry*. 117: 196-203.
- Waiker J. R. L and Ferrar P. H. 1995. The control of enzymic browning in foods. *Chem. Id.:* 836-839.
- Waiker J. R. L and Ferrar P. H. 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev*. 15: 457-498.
- Waiker, J.R.L and Wilson, E.L. 1975. Studies on the enzymatic browning of apples. Inhibition of apple o-diphenol oxidase by phenolic acids. *J Sci Food Agric*. 26: 1825-1831.
- Wang, J., Jiang, W., Wang, B., Liu, S., Gong, Z., and Luo, Y. 2007. Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tainong") pulp. *Journal of Food Biochemistry*. 31: 45-55.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, I.V and Hendrickx M.E. 1998. Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and Bioengineering*. 60: 292-300.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, IV., Hendrickx, M .E and Tobback, P.P. 1998b. Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Lebensm. -wiss. U.-Technol*. 31: 44-49.
- Whitaker J., Lee C. Y. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society: 2-7.
- Whitaker, J.R. 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences, second ed. Marcel Dekker, New York. 271-556.

- Whitaker, J.R. 1995. Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) Food enzymes: Structure and Mechanism. New York: Chapman and Hall. 271-307.
- Wichers, H. J., Gerritsen, Y. A. M., & Chapelon, C. G. J. 1996. Tyrosinase isoforms from 392 the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*. 43: 333-337.
- Wichers, H. J., Van den Bosch, T., Gerritsen, Y.A.M., Oyevaar, J.I., Ebbelaar, M.C.E.M., Recourt, K and Kerrigan, R.W. 1995. Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Science and Cultivation of Edible Fungi, Elliott* (cd.) © Balkema, Rotterdam: 723-728.
- Wilson, K and Waiker, J. 1996. Practical biochemistry principles and techniques. Fourth Edition. Cambridge Low Price Editions. *Cambridge University Press*. 586 pages.
- Wisemann, K.W and Montgomery, M.W. 1985. Purification of d'Anjou pear (*Pyrus communis* L.) polyphenol oxidase. *Plant physiol.* 78: 256-260.
- Wong, T.C., Luh, B.S., and Whitaker, J.R. 1971. Isolation and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes of clingstone peach. *Plant Physiol.* 48: 19-23.
- Xu, J., Zheng, T., Meguro, S. 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryz*). *J Wood Sci.* 50: 260-265.
- Yagar, H and Sagiroglu, A. 2002. Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *TurkJChem.* 26: 97-103.
- Yagar, H. 2004. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from celery. *Preparative Biochemistry & Biotechnology.* 34: 387-397.
- Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, K., Kashiwada, A., Matsuda, K., and Hirata, M. 2005. Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829.
- Yang, C-P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M.D., Nakamura, N., and Hayashi, N. 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) Pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2732-2735.
- Yemenicioglu, A and Cemeroglu, B. 2003. Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca*L.): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J. Agric. Food chem.* 51: 2371-2379.
- Yemenicioglu, A. 2002. Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.
- Yemenicioglu, A., ûzkan, M and Cemeroglu, B. 1999. Some characteristics of polyphenol oxidase and peroxidase from taro (*Coloca.sia antiquorum*). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* 23: 425-430.
- Yemenicioglu, A., Zkan, M and Cemeroglu, B. 1997. Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510.
- Ylostalo, J., Srivastava, K and Flurkey, W.H. 2001. Characterization of a tyrosinase isoform from the cap skin of *Portabella* mushrooms. *Journal of Food Biochemistry.* 25: 493-507.
- Yoruk, R and Marshall, M. R. 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry.* 27: 361-422.
- Yue-Ming, J., Zauberman, G., and Fuchs, Y. 1997. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biology and Technology.* 10: 221-228.
- Zarivi, O., Bonfigli, A., Cesare, P., Amicarelli, F; Pacioni, G., Miranda, M. 2003. Truffles thio- flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters.* 220: 18-88.
- Zawistowski, J., Biliadenes, C.G., and Murray, E.D. 1988. Purification and characterization of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L) polyphenol oxidase. *J. Food Biochem.* 12:1-4.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- Zhang, X and Flurkey, W.H. 1997. Phenoloxidases in *Portabella* Mushrooms. *Journal Of Food Science.* 62: 97-100.

- Zhou, H.W and Feng, X. 1991. Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *J.Scz.FoodAgric.* 57: 307-313.
- Zinkernagel, V. 1986. Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehitzen (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol.* 115: 257-266.
- Ziyan, E and Pekyardimci, S. 2003. Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem.* 27: 217-225.
- Ziyan, E and Pekyardimci, S. 2004. Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.* 28: 547-557.
- Zynek, K., Bryjak, J., Polakovič, M. 2010. Effect of separation on thermal stability of tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 66: 172-176.

Annexes

Annexes

Annexe 1.

1. Composition du réactif de Folin-Ciocalteu

Le réactif de Folin-Ciocalteu comprend deux solutions (A) et (B) qui sont préparés comme suit:

Solution (A): mettre dans l'ordre

• CuSO ₄ anhydre	0.05 g
• Tartrate de K	0.1 g
• Carbonate de Na (Na ₂ CO ₃)	10g
• NaOH	2g
• Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Chaque produit chimique est mis successivement en diluant à chaque fois avec de l'eau distillée, jusqu'à un volume de 100 ml.

Solution (B): (A préparer au dernier moment.)

0.5 ml de réactif de Folin dans 8.5 ml d'eau distillée.

Remarque : Il faut adapter le volume total au nombre de tubes à doser.

2. Calcul de l'activité enzymatique volumique (AV):

L'activité enzymatique volumique (UE/ml) est calculée par la formule suivante

$$AV(UE/mL) = \frac{V_0}{E} \times 1$$

Avec:

Vo : Vitesse initiale de la réaction enzymatique (Abs/min);

VE: Volume de l'enzyme dans le milieu réactionnel (ml);

1: Une unité enzymatique (1 UE) est définie par la quantité d'enzyme qui cause l'augmentation d'une unité d'absorbance par minute.

3. Calcul de l'activité enzymatique spécifique (AS):

L'activité enzymatique spécifique est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique volumique AV (UE/ml) et la concentration totale en protéine de l'extrait enzymatique (mg/ml)

L'activité enzymatique spécifique (AS) est déterminée par le calcul suivant:

$$AS_{(UE/mg)} = \frac{AV(UE/m)}{[Proteines]}$$

Annexe 2. Publications internationales

Ce travail de thèse a donné lieu à quatre publications dans des revues renommées internationales à comité de lecture

GOUZI, H., and Benmansour A. 2007. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. Vol. 5: A76, pp. 1-11.

GOUZI, H, Flurkey, W H., and BENMANSOUR, A. 2007. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus*. *Récents Progrès en Génie des Procédés*. Numéro 94, ISBN 2-910239-68-3, Ed. SFGP, Paris, France. pp 1-8.

GOUZI, H., Gaouar, O., Benmansour A. Partial purification and characterization of tyrosinase extracted from mushroom (*Agaricus bisporus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. Volume 150, Issue 3, Supplement 1, July 2008, Page S47.

GOUZI H, Coradin, T., Ni.ifiez Delicado, E., Ünäl, M. Ün., and Benmansour A. 2010. Inhibition kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach polyphenol oxidase. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, Vol. 3: 1-7.

INTERNATIONAL JOURNAL OF CHEMICAL
REACTOR ENGINEERING

Volume 5

2007

Article A76

**Partial Purification and Characterization of
Polyphenol Oxidase Extracted from
Agaricus bisporus (J.E.Lange) Imbach**

Hicham Gouzi*

Abdelhafid Benmansour

*Abou Bekr Belkaïd University, gouzLh@yahoo.fr

tAbou Bekr Belkaïd University, ben_afid13@yahoo.fr

ISSN 1542-6580

Copyright ©2007 The Berkeley Electronic Press. All rights reserved.

Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase Extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach*

Hicham Gouzi and Abdelhafid Benmansour

Abstract

Polyphenol oxidase (PPO) from mushrooms (*Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach) was partially purified and characterized. The enzyme exhibited both monophenolase and diphenolase activities that were measured spectrophotometrically using L-tyrosine and pyrogallol as substrates. A two-fold purification in both activities was achieved by ammonium sulfate fractionation. The monophenolase activity was 3.35 EU/ml, and the diphenolase activity was 189.3 EU/ml. PPO was relatively stable at -15°C for 44 days. The enzyme was not very heat stable, and its activity decreased when incubated at the temperatures higher than 35°C. PPO activity showed two pH optima, at 5.3 and 7.0 at 25°C when pyrogallol was used as the substrate.

Mono-, di- and triphenols were substrates for PPO. Using V_{max}/K_m as a specificity constant, pyrocatechol was the better substrate followed by pyrogallol. The kinetic parameters of the enzyme were: $V_{max} = 78$ EU/min/ml, $K_m = 1.4$ mM and $K_S = 250$ mM for pyrogallol and $V_{max} = 168$ EU/min/ml, $K_m = 0.40$ mM and $K_S = 270$ mM for the pyrocatechol. Of the inhibitors tested, competitive-type inhibition was observed with benzoic acid and sodium azide. A mixed-type inhibition was observed with L-cysteine and sodium fluoride.

KEYWORDS: mushroom, *Agaricus bisporus*, polyphenol oxidase, purification, characterization

*Particular thanks to Dr. William H. Flurkey and Dr. Loic J. Blum for valuable suggestions, comments and helpful support during the realization of this work. Send correspondence to: University of Abou Bekr Belkaid, Faculty of Science, Department of Biology, BP 119, Tlemcen/Algeria.

1. INTRODUCTION

Enzymatic browning in fruits and vegetables is often an undesirable reaction and responsible for unpleasant sensory qualities and lowers the nutritional and market value (Inal, 2007). The prevention of this reaction has always been a challenge to food scientists (Matheis, 1987).

The main enzyme involved in this reaction is tyrosinase, (polyphenol oxidase (PPO), monophenol, o-diphenol: oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.1) a copper protein widely distributed in nature (Casafiola-Martin *et al.*, 2006).

The PPO also has potential as a biocatalyst for applications involving the removal of phenols from water, to prepare biosensor, for detecting the concentration of phenols in water, and to produce L-dopa from L-tyrosine (Sun *et al.*, 1992; Burton *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2000; Pena *et al.*, 2001). In the presence of molecular oxygen, PPO catalyzes both the o-hydroxylation of monophenols (monophenolase or cresolase activity) and the oxidation of the o-diphenols into o-quinones (diphenolase or catecholase activity) which polymerize to form brown or black pigments (Kolcuoglu *et al.*, 2006).

PPO found in mushroom (*Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach) has been used in this study since it is readily obtainable in relatively large quantities. We used a method for the extraction of plant enzymes using acetone powders (Anderson, 1968).

The aim of this work was to isolate, purify and characterize the PPO from mushroom and determine some of its enzymatic properties. The characteristics of the enzyme were investigated at different pH levels and temperatures. Substrate, and inhibitor effects were also studied. This resulting information will be useful for devising effective methods for enhancing the quality of mushroom.

ig 9i li'.11:1 113I il = OJJ

2.1 Materials

The source of the enzyme was the common commercially cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) bought on the free market. The mushrooms must be white, fresh and as small and young as possible. The stalks were cleaned and stored at 4°C until use.

Pyrogallol, pyrocatechol and guaracol were obtained from Fluka. All other chemicals and reagents employed were of analytical grade.

2.2 Methods

2.2.1 Enzyme extraction and purification: Polyphenol oxidase was extracted according to the method of purification described by Dawson and Magee (1955).

Step 1. Preparation of crude extract: 745.5 g of fresh mushroom were washed abundantly with distilled water in order to eliminate the soil residues and air dried then were crushed in a mixer containing 1230 ml of prechilled acetone (-15°C) to remove endogenous phenols, chromogenic substrates and to displace water (Nelson and Mason, 1970; Ben-Shalom *et al.*, 1977; Vmos-Vigyã.zÔ, 1981).

The pulp was filtered through cheese-cloth and was manually pressed until obtaining a dry residue or acetone powder. The pressed pulp, which weighed 93.5 g, was frozen by being placed in contact with dry ice for at least 4 hours. It may be stored in this frozen condition for several months, if desired. The frozen pulp was then broken up, suspended in about 960 ml of distilled water and allowed to stand overnight in the refrigerator at about 5°C. The suspension was filtered through cheese-cloth, and the pulp wrapped in cheese-cloth and squeezed dry. The filtrate obtained (800 ml) was then filtered twice using vacuum filtration in order to eliminate the remaining particles.

Step 2. Precipitation with acetone: 1200 ml of acetone was added to 800 ml of the filtrate from step 1, and the resulting precipitate was filtered on Celite. The precipitate and the Celite pad were suspended and stirred in 252 ml of cold distilled water (5°C) to redissolve the protein.

The solution is then refiltered through another Celite pad. Filtrate (224 ml) is placed in a refrigerator at 5°C.

Step 3. Fractionation with ammonium sulfate: 103.6 g of ammonium sulfate ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was dissolved in 224 ml of the cold solution from the step 2 to make 60 % saturation solution. After stirring for a few minutes, the mixture was filtered on Celite, and the precipitated proteins on the pad were washed with cold 0.35 M of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The precipitated protein was then redissolved by stirring in 100 ml of cold distilled water as in step 2.

Protein concentration of the enzyme preparation at different stages of purification was determined according to the method of Lowry *et al.* (1951) with bovine serum albumin as standard.

2.2.2 Enzyme assays: The mono- and diphenolase activities of the PPO were determined by measuring the formation of o-quinones directly by means of a spectrophotometer (Jenway 6405 UV/Vis) in the presence of air/oxygen (Espin *et al.*, 1995). The monophenolase activity was monitored at 475 nm using L-tyrosine as the substrate. The steady-state rate of monophenolase activity was calculated from the linear zone of the product accumulation curve after the lag period. The standard reaction mixture contained 0.1 ml of enzyme solution and 2 ml of 2.5 mM L-tyrosine in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0).

The diphenolase activity was followed by monitoring the increase in absorbance at 420 nm using pyrogallol as the substrate. The initial rate was calculated from the slope of the absorbance-time curve (Unal, 2007). Stock solution of pyrogallol was prepared in 5 mM of ortho-phosphoric acid.

The standard reaction mixture for diphenolase activity contained 2 ml of pyrogallol at 20 mM. The reaction was started by addition of 5 μ l enzyme solution. The substrate and the enzyme fraction were mixed after a pre-incubation period of 5 min at 30°C.

Assays for laccase activity were carried out at 30°C in 2 ml of 0.1 M citrate buffer (pH 3.5) containing 50 μ l of guaiacol (0.1 ml of the stock solution of guaiacol (98%) in 10 ml of methanol). Oxidation was monitored at 470 nm following addition of 75 μ l of enzyme extract (Zhang and Flurkey, 1997; Johannes and Majcherzyk, 2000).

In our study, one unit of enzyme activity was defined as a change in one absorbance unit/min/ml (Fan and Flurkey, 2004). Specific activity was expressed as units/mg protein.

All experiments were performed in triplicate and the corresponding mean values plotted.

2.2.3 Data analysis: Kinetic data analysis was carried out using linear and nonlinear regression fittings, applying the Table Curve 2D™ v2.03 and Enzyme Kinetics Pro™ Version 2.36 programs.

2.2.4 Stability of the PPO activity during storage at -15°C: The crude extract and partially purified enzyme were frozen at -15°C in refrigerator. Their catecholase activity was determined every two days during 44 days of storage. The specific enzyme assay conditions were: 25°C, pH 7 (0.1 M sodium phosphate buffer), 20 mM pyrogallol and 5 μ l of enzyme extract.

2.2.5 Effect of the pH on PPO activity: Determination of the pH optimum was carried out in 0.1 M citrate buffer ranging in pH from 3.15 to 5.3 and in 0.1 M phosphate buffer ranging as above from pH 6 to 8. Catecholase activity was monitored using 20 mM pyrogallol as substrate. PPO activity was also determined using 0.1 M citrate buffer from pH 3.75 to 8.15 with 20 mM pyrocatechol as the substrate.

Enzyme was added directly into quartz cuvettes containing buffer and substrate at each specific pH before monitoring absorbance versus time curves. Each assay mixture was repeated in triplicate using the same stock of crude or partially purified enzyme extract.

Negligible autoxidation of the pyrogallol and pyrocatechol occurred in the standard assay at pH 7 or below. Enzymatic activities in pH higher than 7 were corrected for the autoxidation of pyrogallol in purpurogalline and the pyrocatechol in o-benzoquinone (Abrash, 1989; Palmer, 1963).

After ammonium sulfate fractionation 30% of activity remained, while 86.3% of protein was lost. A 2 fold increase in purity was obtained for the PPO from the mushroom with 0-60% ammonium sulfate fractionation. The enzymatic catecholase activity was 189.3 EU/ml and 3.35 EU/ml for the cresolase activity. The enzyme obtained from mushroom is a real tyrosinase because it showed both diphenolase and monophenolase activities (Figure. 1 (a)-(b)), when L-tyrosine or pyrogallol were used as substrates.

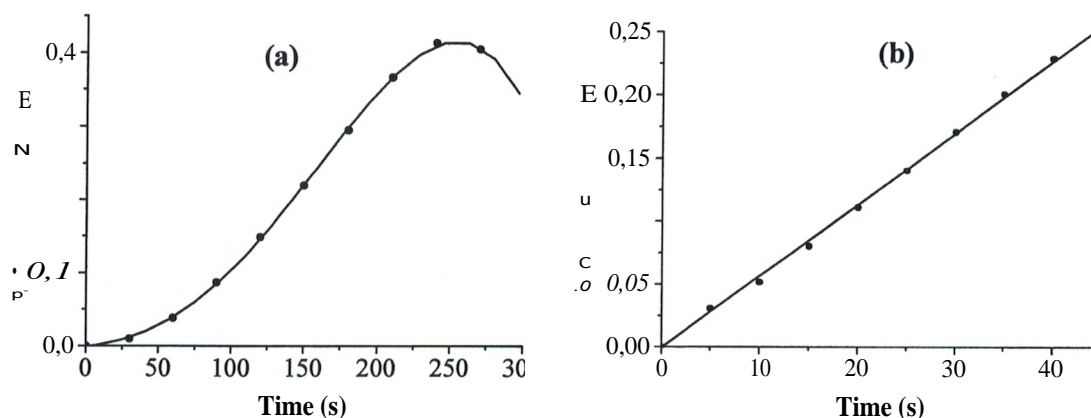


Figure 1. Enzymatic activities of mushroom polyphenol oxidase measured as described in methods
(Curve a) Monophenolase activity L-tyrosine
(Curve b) Diphenolase activity pyrogallol

The monophenolase activity was characterized by a lag period prior to the attainment to the steady state rate (Nuflez-Delgado *et al.*, 1996). Smith and Krueger (1962) have demonstrated that both types of activities occurred in the mushroom. However, many polyphenol oxidases lack cresolase activity (Jesus Rivas and Whitaker, 1973). The total enzymatic activity of the crude extract was higher than these reported in the literature (Ylostalo *et al.*, 2001; Fan and Flurkey, 2004). In addition, the catecholase activity remained stable, even for several weeks at -15°C but the cresolase activity was less stable. Sharma *et al.* (2003), found that mushroom tyrosinase extracts retain their residual activities when stored for a 28 day period at -10 to 10°C . A negligible laccase activity was observed and represented only 0.22 % of the activity total polyphenol oxidase in ammonium sulfate fraction.

3.2 Effect of pH

The pH activity profile for the oxidation of pyrogallol of mushroom PPO is shown in Figure 2. Two apparent pH optima were observed for PPO activity at 25°C : one at pH 5.3 and the other at pH 7.0.

The first peak could be due to an artefact caused by changing buffers (Ünal, 2007). The presence of two pH optima, suggests that the enzyme extract contains more than one enzyme (Harel *et al.*, 1964).

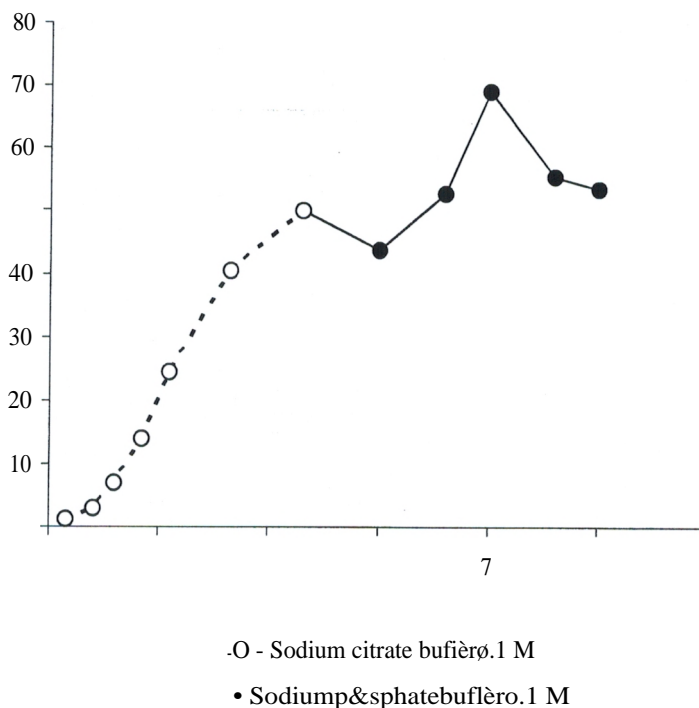


Figure 2. Effect of pH on mushroom PPO activity in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 3.15-5.3) and 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6-8). The reaction medium contained 20 mM pyrogallol and 51 μ l PPO

The pH optimum for PPO was also found to be dependent on the degree of purity of enzyme and the substrate used (data not shown). However, Dawson and Magee (1955) also found two pH optima (pH 5.5 and 7.0) for mushroom PPO.

3.3 Enzymes kinetics and substrate specificity

When the pyrogallol and pyrocatechol concentration were increased from 0 to 50 mM (Figure. 3 (a)-(b)), an increase in diphenolase activities were observed up to 10 mM and 20 mM for pyrogallol and pyrocatechol respectively. Higher concentrations led to substrate inhibition. The apparent V_m , K_m and K_5 for pyrogallol as substrate were $V_m = 78$ EU/min/ml, $K_m = 1.4$ mM and $K_5 = 250$ mM, and those for pyrocatechol were $v_{max} = 168$ EU/min/ml, $K_m = 0.40$ mM and $K_5 = 270$ mM.

In terms of substrate efficiency (V_m/K_m), pyrocatechol appeared to be the best substrate. These K_m values were similar to others reported for PPO using spectrophotometric assays. Garcia-Molina *et al.* (2005) found a K_m for pyrogallol of 2.16 and a K_m for pyrocatechol of 0.3 mM using *Agaricus bisporus* PPO. Rodakiewicz-Nowak *et al.* (2002) reported a K_m of 0.39 mM for pyrocatechol using *Agaricus bisporus* PPO.

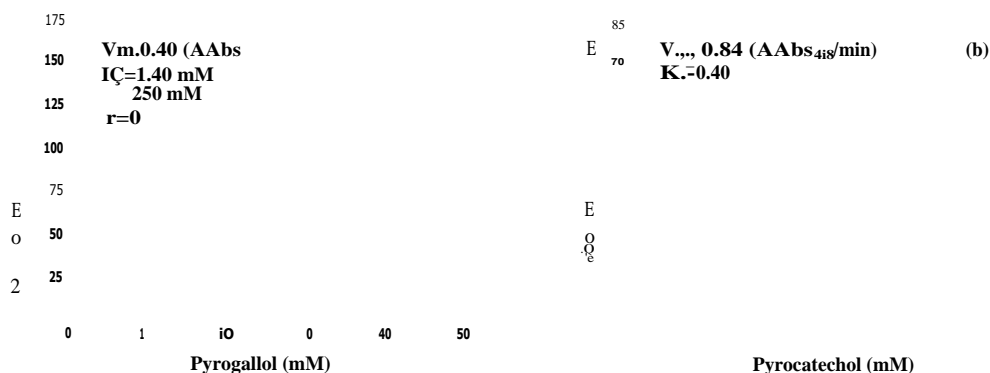


Figure 3. (a). Lineweaver-Burk plot of pyrogallol oxidation by the mushroom PPO
 (b). Lineweaver-Burk plot of pyrocatechol oxidation by the mushroom PPO

The reaction medium contained 5µl PPO and substrate concentrations ranging from 0 to 50 mM

The PPO in crude extracts was able to use mono-, di-, and trihydroxy phenolic compounds as substrates. The enzyme showed low activity using mono- and triphenols as substrates but much greater activity with the diphenolic substrate Table 2.

Table 2. Monophenolase, di- and triphenol oxidase activity of crude PPO

Substrate	Wavelength (nm)	Activity Relative to Pyrocatechol, %
Monophenols		
L-tyrosine (2 mM)	475	0.7
Phenol (10 mM)	395	0.54
Diphenol		
Pyrocatechol (10 mM)	410	100 (154 EU/ml)
Triphenols		
Pyrogallol (10 mM)	420	43.5
Phloroglucinol (10 mM)	395	0.29

Tyrosine has been shown substrate for the PPO from the champignon mushroom *Agaricus bisporus* (Sanjust *et al.*, 2003). The enzymatic oxidation of L-tyrosine and other monophenols is accompanied by a typical lag or induction phase before a constant reaction velocity is reached. Because of its dual substrate and catalytic activities, the enzyme could be classified as a tyrosinase.

3.4 Thermal stability

The enzyme was stable between 25 and 35°C. From 35 to 45°C, the residual activity decreased slightly (17%), but rapid inactivation occurred from 45 to 55°C. At 70°C the residual activity was 0% (Figure. 4). At high temperature, the enzyme most likely underwent denaturation and lost its activity.

These enzymatic properties were similar to those reported for PPO in *Panaeu.sjaponicus* (Benjakul *et al.*, 2005), *Macrolepiota mastoidea* (Kolcuoglu *et al.*, 2006) and *Musa cavendishii* species (Onal, 2007). PPO is generally considered to be an enzyme of low thermostability (Amiot *et al.*, 1987).

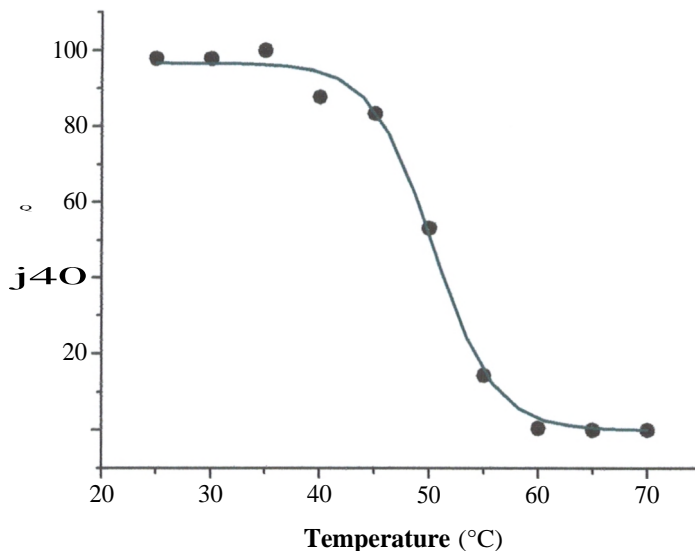


Figure 4. Thermal stability of the enzyme after heating for 30 min. The reaction medium contained 20 mM pyrocatechol in 100 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0

3.5 Inhibition studies

Four compounds were examined as inhibitors of PPO activity. All inhibitors used in this study inhibited PPO activity, the extent of the inhibition was dependent on the concentration of the compound used.

Figures 5 and 6 demonstrate the effect of benzoic acid and sodium azide as an inhibitor of PPO using pyrogallol as substrate. The Lineweaver-Burk double reciprocal plot showed that these inhibitors changed the K_m value but not the V_{max} value.

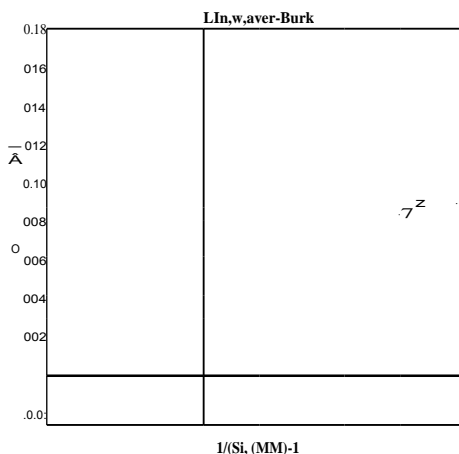


Figure 5. Competitive inhibition of polyphenol oxidase from *Agaricus bisporus* by benzoic acid (at 0.13-0.25 mM using pyrogallol as substrate)

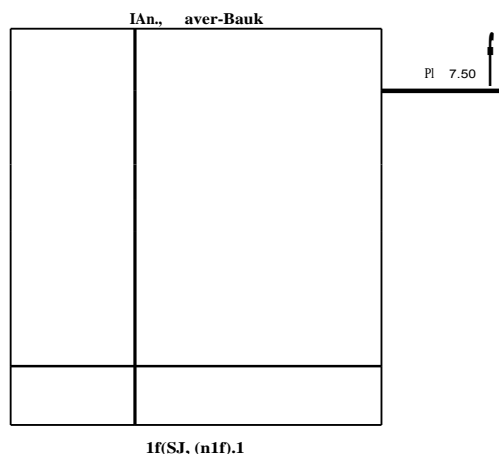


Figure 6. Competitive inhibition of polyphenol oxidase from *Agaricus bisporus* by sodium azide (at 3.75-7.5 mM using pyrogallol as substrate)

This indicated that benzoic acid and sodium azide were competitive inhibitors of the enzyme. The inhibitor constants K_i values for these cases were calculated to be 0.043 and 3.2 mM for benzoic acid and sodium azide respectively.

Azide can form complexes with many copper enzymes, inhibiting their activity (Shi *et al.*, 2002). The competitive inhibition by benzoic acid is also in accord with that reported for other PPO (Jesus Rivas and Whitaker, 1973).

Dogan *et al.* (2005) showed that the inhibition of polyphenol oxidase extracted from the artichoke (*Cynara scolymus L.*) by sodium azide was competitive inhibition.

The effect of L-cysteine and sodium fluoride as inhibitor using pyrogallol as substrate is illustrated in Figures 7 and 8. Both inhibitors changed the K_m and V_{max} . This implies the inhibition type of L-cysteine and sodium fluoride was of a mixed type. Their inhibitor constants K_i were calculated to be 1.47 and 73.68 mM respectively.

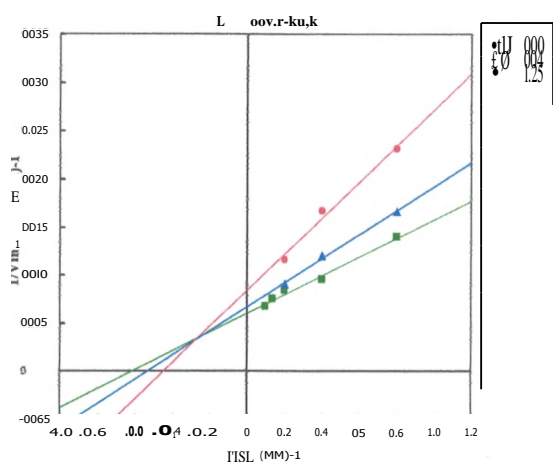


Figure 7. Mixed inhibition of polyphenol oxidase from *Agaricus bisporus* by L-cystein (at 0.94-1.25 mM using pyrogallol as substrate)

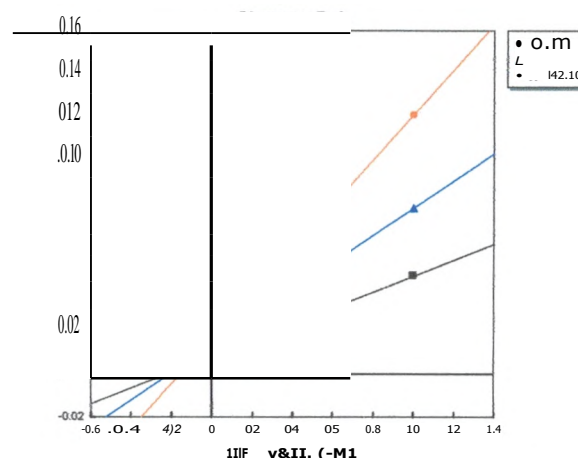


Figure 8. Mixed inhibition of polyphenol oxidase from *Agaricus bisporus* by sodium fluoride (at 71.3-143 mM using pyrogallol as substrate)

Inhibition of PPO by sodium fluoride was shown to be pH dependent. It seems likely that the F^- anions react with the copper at the active site, and the pH dependence has been explained on the basis of the involvement of histidine residues complexing the metal at the active site (Martinez *et al.*, 1986).

4. CONCLUSION

This paper describes a simple purification method of PPO, which not only increases the recovery of the enzyme, but also renders it less brown and stable. The PPO was relatively stable during storage at $-15^\circ C$ for several days. The main advantage of this method lies in the preservation of both mushroom PPO monophenolase and diphenolase activities. Other more drastic methods lead to the loss of the monophenolase activity of PPO from other biological sources, such as fruits and vegetables.

Mushroom PPO can oxidize mono-, di-, and triphenols. The enzyme maximum activity had a pH optimum at 7 and the temperature optimum was $35^\circ C$. Moreover, *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach PPO was very sensitive to some general PPO inhibitors, especially benzoic acid, sodium azide, L-cysteine and sodium fluoride.

9 ai W 31 Li [I

Abrash, H.I., Shih, D., Elias, W., Malekmehr, F. "A Kinetic Study of the Air Oxidation of Pyrogallol and Purpurogallin." *International Journal of Chemical Kinetics.*, Vol.21, 465-476 (1989).

Amiot, M.J., Flueriet, A., Chenyner, V., Nicolas, J. "Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables." In: *Phytochemistry of fruits and vegetables.* (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) Clarendon Press, Oxford, 51-85 (1997).

Anderson, J.W. "Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues." *Phytochemistry.*, Vol.7, 1973-1988 (1968).

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

Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E., Mayer, A. "Catechol oxidase from green olives: properties and partial purification." *Phytochemistry.*, Vol. 16, 1153-1158 (1977).

Burton, S.G., Boshoff, A., Edwards, W., Rose, P.D. "Biotransformation of phenols using immobilized polyphenol oxidase." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, Vol.5, 411-416 (1998).

Carvalho, G.M.J., Alves, T.L.M., Freire, D.M.G. "L-DOPA production by immobilized tyrosinase." *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol.84, 791-800 (2000).

Casaflores-Martín, G.M.; Khan, M.T.H.; Marrero-Ponce, Y.; Ather, A.; Sultankhodzhaev, M.N., Torrens, F. "New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, Vol. 16, 324-330 (2006).

Dawson, C.R., Magee, R.J. "Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase)." *Methods in Enzymology.*, Vol.2. 817-827 (1955).

Dogan, S., Turan, Y., Ertürk, H., Arslan, O. "Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.)." *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 53, 776-785 (2005).

Espin, J.C., Morales, M., Varón, R. "A continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple Polyphenol Oxidase." *Analytical Biochemistry.*, Vol.23 1, 237-246 (1995).

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

García-Molina, F., Pefialver, M.J., Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Cánovas, F., Tudela, J. "Kinetic study of monophenol and o-diphenol binding to oxytyrosinase." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, Vol.32, 185-192 (2005).

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

Huang, X.H., Chen, Q.X., Wang, Q., Song, K.K., Wang, J., Sha, L., Guan, X. "Inhibition of the activity of mushroom tyrosinase by alkylbenzoic acids." *Food Chemistry.*, Vol.94, 1-6 (2006).

Jesus Rivas, N.D., Whitaker, J.R. "Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett Pears." *Plant Physiol.*, Vol.52, 501-507 (1973).

Johannes, C., Majcherczyk, A. "Laccase activity tests and laccase inhibitors." *Journal of Biotechnology.*, Vol.78, 193-199 (2000).

- Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N. "Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*)." Food Chemistry., Vol. 101, 778-785 (2006).
- Lineweaver, H., Burk D. "The Determination of Enzyme Dissociation Constants." Vol.56, 658-666 (1934).
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randali, R.J. "Protein measurements with the Folin phenol reagent." J. Biol. Chem., Vol.93, 265-271 (1951).
- Martinez, J.H., Solano, F., Peflañel, R., Galindo, J.D., Iborra, J.L., Lozano, J.A. "Comparative study of tyrosinases from different sources: relationship between halide inhibition and the enzyme active site." Comp. Biochem. Physiol., Vol.83B, 633-636 (1986).
- Matheis, G. "Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase." Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., Vol. 11, 5-12 (1987).
- Nelson, R.M., Mason, H.S. "Tyrosinase (mushroom)." In Methods in Enzymology (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.), Academic Press, New York., Vol. 17, 626-632 (1970).
- Nuflez-Delicado, E., Bru, R., Sánchez-Ferrer, A., Garcìa-Carmona, F. "Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase." Journal of chromatography., Vol.B 680, 105-112 (1996).
- Palmer, J.K. "Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties." Plant Physiology., 508-513 (1963).
- Pena, N., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. "Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase-modified reticulated vitreous carbon electrodes." Talanta., Vol.55, 179-187 (2001).
- Rodakiewicz-Nowak, J., Monkiewicz, M., Haber, J. "Enzymatic activity of the *A. bisporus* tyrosinase in AOT/isooctane water-in-oil microemulsions." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect., Vol.208, 347-356 (2002).
- Sanjust, E., Cecchini, G., Sollai, F., Curreli, N. "3-Hydroxykynurenine as a substrate/activator for mushroom tyrosinase." Archives of Biochemistry and Biophysics., Vol.412, 272-278 (2003).
- Sharma, N.M., Kumar, S., Sawhney, S.K. "A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability." Biotechnol. Appl. Biochem., Vol.38, 137-141 (2003).
- Shi, C., Liu, Q., Dai, Y., Xie, Y., Xu, X. "The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco." Acta Biochimica Polonica., Vol.49, 1029-1035 (2002).
- Smith, J.L., Krueger, R.C. "Separation and Purification of the Phenolases of the Common Mushroom." The Journal of Biological Chemistry., Vol.237, 1121-1128 (1962).
- Sun, W.Q., Payne, G.F., Moas, W.S.G.L., Chu J.H., Wallace K.K. "Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater." Biotechnol. Prog., Vol.8, 179-186 (1992).
- Onal, M.U. "Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*)." Food Chemistry., Vol.100, 909-913 (2007).
- Várnos-Vigyázó, L. "Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables." CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Vol. 15, 49-127 (1981).
- Xu, J., Meng, T., Meguro, S., Kawachi, S. "Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Catanea henryi*)." J Wood Sci., Vol.50, 260-265 (2004).
- Ylostalo, J., Srivastava, K., Flurkey, W.H. "Characterization of a tyrosinase isoform from the cap skin of portabella mushrooms." Journal of Food Biochemistry., Vol. 25, 493-507 (2001).

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

Zhang, X., Flurkey, W.H. "Phenoloxidases in Portabella Mushrooms." Journal Of Food Science., Vol.62, 97-100 (1997).

Ziyan, E., Pekyardimci, 5. "Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*)." Turk J Chem., Vol.27, 217-225 (2003).

Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus*

GOUZI Hicham^a, WILLIAM H. Flurkeyb, and BENMANSOUR Abdelhafida

^aDepartment of Biology, Faculty of Science, ABOU BEKR BELKAID University, Tlemcen 13000,
Algeria ^bDepartment of Chemistry, Indiana State University, Terre Haute, Indiana 47809

gouzi_h@yahoo.fr

Abstract

In this study the polyphenol oxidase (PPO) of mushroom (*Agaricus bisporus*), was partially purified and characterized. The enzyme exhibits both activities catecholase and cresolase. The catecholase activity was 189,3 EU/ml and 3,35 EU/ml for the cresolase activity (30°C, pH 7 phosphate buffer 0,1 M).

The PPO is relatively stable at -15°C. The enzyme showed maximal activity at pH 7 and 35°C and can catalyse the mono-, di- and triphenols with a preference of the substrate. The kinetic parameters of the PPO where found at pH 7 and 25°C are: $V_{max} = 78,6$ EU/min.ml, $K_m = 1,40$ mM and $K_s = 249,82$ MM for pyrogallol and $V_{max} = 168,72$ EU/min.ml, $K_m = 0,40$ mM and $K_s = 269,83$ mM for the pyrocatechol. The activation energy (E_a) was calculated to be 22 kJ/mol for the enzymatic oxidation of the pyrogallol.

Of the inhibitors tested, benzoic acid and L-cysteine were the most effective.

Key-words: Mushroom - *Agaricus bisporus* - polyphenol oxidase - purification - characterization.

1. Introduction

Enzymatic browning in fruits and vegetables is often an undesirable reaction which is responsible for unpleasant sensory qualities and also lowers the nutritional and market value (Unal, 2007). The main enzyme involved in this reaction is tyrosinase, better termed polyphenol oxidase (PPO) (EC 1. 14. 18. 1) is a copper protein widely distributed in nature, which shows similar structural and functional characteristics when purified from different biological sources (Casañola-Martin et al., 2006).

In the presence of molecular oxygen, PPO catalyzes both the o-hydroxylation of monophenols (cresolase activity) and the oxidation of the o-diphenols (catecholase activity) into o-quinones which polymerize to form brown or black pigment (Kolcuoglu et al., 2006). PPO found in mushroom (*Agaricus bisporus*) has been used in this study since it is readily obtainable in relatively large quantities. We used the most current method for the extraction of plant enzymes; the acetone powders (Anderson, 1968).

This study was aimed at isolating and characterizing the PPO mushroom and determining some of its enzymatic properties. The characterization of the PPO could help in the development of more effective methods of controlling browning in mushroom.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The source of the enzyme was the common commercially cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*), bought on the free market. The mushrooms must be white, fresh and as small and young as possible. The carpophores were cleaned, to remove only earthy residues, and stored at 4°C until use.

Pyrogallol, pyrocatechol were obtained from Fluka. All other chemicals and reagents employed were of analytical grade.

2.2 Methods

2.2.1 Enzyme extraction and purification

PPO was extracted according to the method of purification described by Dawson and Magee (1955). For determining specific activity, PPO activity and quantitative proteins measurements were carried out.

Protein concentration of the enzyme preparation at different stages of purification was determined according to the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as the internal standard.

2.2.2 Enzyme assays

The mono- and diphenolase activities of the PPO were determined by measuring the formation of o-quinones directly by means of a spectrophotometer (Jenway 6405 UV/Vis) in the presence of air/oxygen at 30°C (Espfn et al., 1995). The monophenolase and diphenolase activities were monitored at 475 and 420 nm using L-tyrosine and pyrogallol as the substrate respectively. The standard reaction mixture for monophenolase activity contained 0,1 ml of enzyme solution and 2 ml of 2,5 mM L-tyrosine in 0,1 M sodium phosphate buffer (pH 7,0). The standard reaction medium for diphenolase activity contained 0,1 ml of enzyme solution and 2 ml of pyrogallol at 20 mM. Stock solution of pyrogallol was prepared in 5 mM of ortho-phosphoric acid. The substrate and the enzyme fraction were mixed after a pre-incubation period of 5 min at 30°C. The initial rate was calculated from the linear zone of the absorbance-time curve (Unal, 2007). The spectrophotometer was zeroed using the same mixture without enzyme. In our study, one unit of enzyme activity was defined as a change in one absorbance unit/min/ml (Fan and Flurkey, 2004). Specific activity was expressed as units/mg protein.

All experiments were performed in triplicate and the corresponding mean values plotted.

2.2.3 Data analysis

Kinetic data analysis was carried out using linear and nonlinear regression fittings, applying the Table Curve 2D™ v2.03 and Enzyme Kinetics Pro™ Version 2.36 programs.

2.2.4 Stability of the PPO activity during its storage at -15°C

The crude extract and partially purified enzyme are frozen at -15°C in refrigerator. Their catecholase activity is determined every two days during 45 days of storage. The conditions of measurement are: 25°C, pH 7 (0,1 M sodium phosphate buffer), 20 mM pyrogallol and 5 µl of enzyme extract.

2.2.5 Effect of the pH on PPO activity

Determination of the pH optimum was carried out in 0,1 M citrate buffer ranging in a pH range from 3,15 to 5,3 and in 0,1 M phosphate buffer ranging in a pH range from 6 to 8. PPO activity was monitored using 20 mM pyrogallol as substrate. Enzyme was added directly into glass cuvette containing buffer and substrate at each specific pH before monitoring absorbance versus time curves. As mentioned, each assay mixture was repeated in triplicate using the same stock of crude or partially purified enzyme extract.

Negligible autoxidation of the pyrogallol was occurred in the standard assay at pH 7 or below. The values of enzymatic activities with pH higher than 7 were corrected for the autoxidation of pyrogallol in purpurogalline which takes place in basic medium in the presence of molecular oxygen (Abrash et al., 1989).

2.2.6 Enzymes kinetics and substrate specificity

For determining of Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_m) values of the enzyme, PPO activities were measured with pyrogallol (420 nm) and pyrocatechol (410 nm) at varying concentrations of substrate ranging from 0,1 and 50 mM. K_m , K_m and V_m values of PPO, for each substrate, were calculated from a plot of y against x .

Six different commercial grade substrates (L-tyrosine (475 nm), phenol (390 nm), pyrocatechol (410 nm), pyrogallol (420 nm), phloroglucinol (390 nm)) were used for investigation of the mono-, di- and triphenol oxidase activities of enzyme as described earlier (Ylostalo et al., 2001). The rate of the reaction was measured in terms of the increase in absorbance of the corresponding quinone products for each substrate. Substrate specificity or catalytic power (V_m/K_m) was calculated from the Michaelis-Menten graphical representation.

2.2.7 Effect of protein concentration on PPO activity

The effect of enzyme concentration on PPO activity was assayed under standard condition using various volumes of the enzyme extract ranged from 0,5 to 6,5 µl / 2 ml reaction mixture for 20 mM pyrogallol as substrate. The activities were plotted against enzyme concentration.

2.2.8 Effect of temperature on PPO activity and thermal stability

PPO activity was assayed at various temperatures over the range 25-50 °C in a water bath. The reaction mixtures containing all the reagents (0,1 M sodium phosphate buffer, 20 mM pyrogallol) except crude enzyme was incubated for 5 min at various temperatures as indicated above. The enzyme extract was added to the mixtures and the activity PPO was determined spectrophotometrically at 420 nm as rapidly as possible. The temperature stability of mushroom PPO was determined by placing 3.0 ml of the enzyme solution in a test tube, in a water bath, at the appropriate temperatures ranging from 25 to 70 °C with 5 °C increments for 30 min and the residual activity was determined at pH 7,0; 25°C and 20 mM pyrocatechol. An aliquot was taken out and assayed for its remaining activity at 25°C. All assays were performed in triplicate.

2.2.9 Effect of inhibitors

Benzoic acid, sodium azide, L-cysteine and sodium fluoride were used as PPO inhibitors and their effects on PPO activity were determined by using pyrogallol as substrate. Each inhibitor was prepared in 0,1 M phosphate buffer pH 7,0. Inhibition of PPO activity was tested in a reaction mixture (2 ml) consisting of pyrogallol at different concentrations and 5 U enzyme solution in the same buffer. Later using different concentrations of the substrates, PPO activities were measured at two constant inhibitor concentrations with the inhibitors indicate above. The reaction was initiated by addition of enzyme to the solution of substrate and inhibitor. The reaction cell and all solutions were thermostatted at either 25 °C or 30°C. Inhibition patterns were determined from double reciprocal plots of velocity vs initial substrate concentration.

3. Results and Discussions

3.1 Isolation and fractionation of PPO from the mushroom *Agaricus bisporus*

The mushroom PPO was partially purified by precipitation by acetone followed by fractionation with ammonium sulfate (0-60%) as summarized in Table 1. A good result has been obtained in terms of enzyme yield and purification. However, a 2 fold increase in purity was obtained for the PPO from the mushroom with 0-60% ammonium sulfate fractionation. The ammonium sulfate precipitation was used to remove high molecular weight proteins and sugars and to concentrate the sample (Xu et al., 2004). After ammonium sulfate fractionation 30% of activity remained, while 86,3% of protein was removed for catecholase and cresolase activity. The enzymatic catecholase activity was 189,3 EU/ml and 3,35 EU/ml for the cresolase activity (30°C, pH 7 phosphate buffer 0,1 M). The enzyme obtained from mushroom is a true tyrosinase because it showed both diphenolase and monophenolase activities (Figure. 1 (a)-(b)), when a phenolic pair L-tyrosinopyrogallol was used. Smith and Krueger (1962) have demonstrated that both types of activities occur in the mushroom.

The total enzymatic activity of the crude extract is higher than these reported in the literature (Ylostalo et al., 2001; Fan and Flurkey, 2004). In addition, the catecholase activity remained stable, even at several weeks at -15°C but the cresolase activity is less stable.

Table 1. Partial purification of *A. bisporus* polyphenol oxidase (the starting material was 745.5 g of mushroom).

Purification steps	Total volume (ml)	Activity (EU/ml)		Protein Total protein (mg)	Specific activity (EU/mg protein)		Yield (%)			Purification Factor (n-fold)		Cat/Cre ratio
		Cre	Cat		Cre	Cat	Protein	Enzyme		Cre	Cat	
								Cm	Cat			
1. HzO extract	800	1,40	93,39	3560	0,31	20,98	100	100	100	1	1	66
2. After acetone fractionation	224	2,04	129,74	703,36	0,65	41,31	19,75	40,8	38,90	2,10	1,97	63
3. 60% (NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	103	3,35	189,30	487,19	0,70	40,02	13,68	30,80	26,10	2,25	1,90	56

*One unit of enzyme was defined as a change of one absorbance unit per min and per ml of enzyme extract.
 Protein content was determined using the Lowry method.

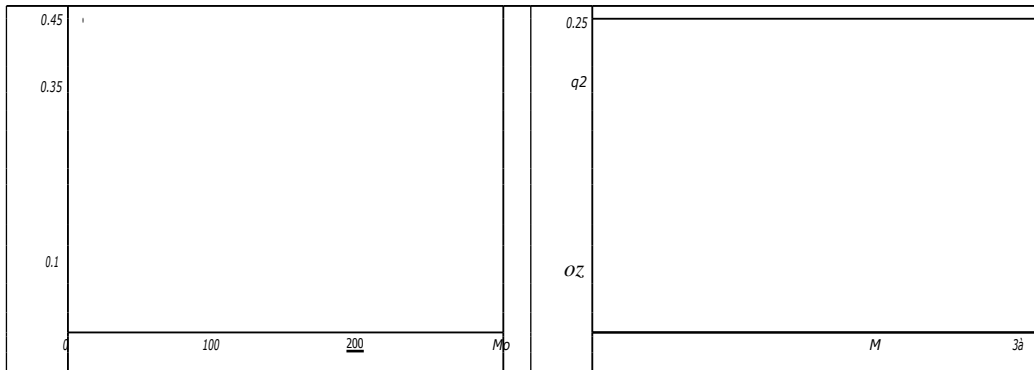


Figure 1. Enzymatic activities of mushroom polyphenol oxidase.
 (Curie a) Diphenolase activity.
 (Curie b) Monophenolase activity (30°C at pH 7,0 - 0,1 M sodium phosphate buffer).

3.2 Effect of pH

pH is a determinant factor for the expression of enzymatic activity. The pH activity profile for the oxidation of pyrogallol by mushroom PPO is shown in Figure 2. Two pH optima were observed for PPO activity at 25°C: one at pH 5,3 and the other at pH 7. The presence of two pH optima, suggests that the enzyme extract contains more than one enzyme (Harel et al., 1964). A second optimum was found in some cases to be due to insufficient purification (Vimos-Vigyzo, 1981). The pH optimum for PPO is found to be dependent on the degree of purity of enzyme and the substrate used (data not shown). The pH optima which have been reported for PPO are usually around pH 4,5; pH 7 or both (Ben-Shalom et al., 1977).

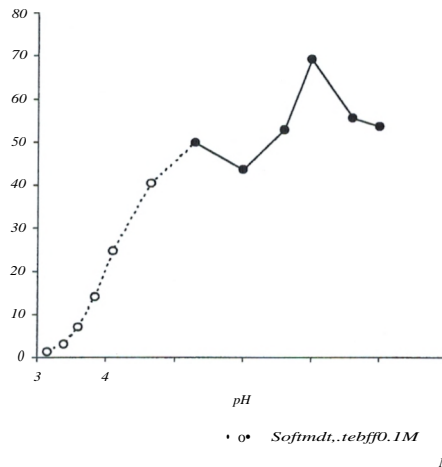


Figure 2. Effect of pH on mushroom PPO activity in 0,1 M sodium citrate buffer (pH 3,15-5,3) and 0,1 M sodium phosphate buffer (pH 6-8). The reaction medium at 25°C contained 20 mM pyrogallol and 5 µl PPO.

3.3 Enzymes kinetics and substrate specificity

When the pyrogallol and pyrocatechol concentration were increased from 0 to 50 mM (Figure 3 (a) (b)), an increase in diphenolase activities were observed up to 10 mM and 20 mM for pyrogallol and pyrocatechol respectively, while higher concentrations led to substrate inhibition (Zawistowski et al., 1991). The apparent V_m , K_m and K_s for pyrogallol as substrate were $v_{max} = 78,6$ EU/min.ml, $K_m = 1,40$ mM and $K_s = 249,82$ mM, and those for pyrocatechol were $v_m = 168,72$ EU/min.ml, $K_m = 0,40$ mM and $K_s = 269,83$ mM. In terms of physiological efficiency (v_{m}/K_m), pyrocatechol appeared to be the best substrate.

These K_m values were similar to others reported for PPO using spectrophotometric assays.

Garcia-Molina et al. (2005), were found that the K_m of die *Agaricus bisporus* PPO for pyrogallol and pyrocatechol were 2,16 and 0,30 mM respectively. Rodakiewicz-Nowak et al (2002) for their part that die K_m of die *Agaricus bisporus* for pyrocatechol was 0,39 mM.

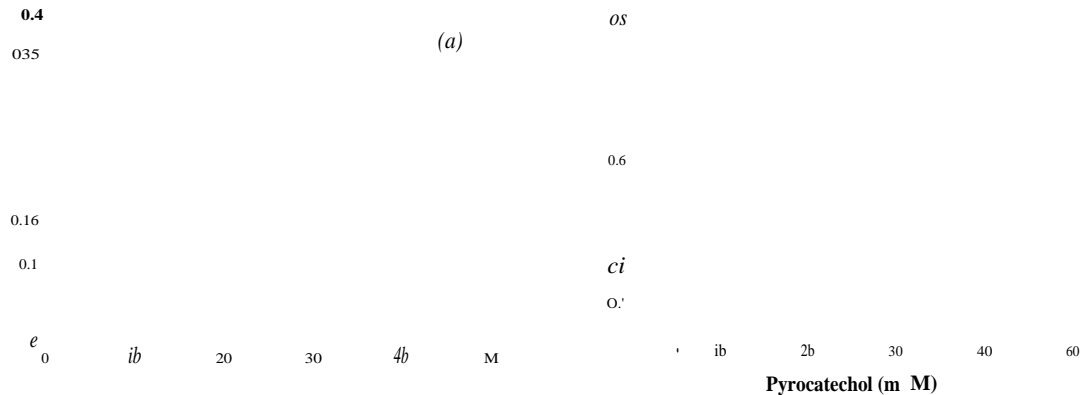


Figure 3. (a). Effet o!pyrogallol concentration on mushroom PPO activity.

(s). Effet of pyrocatechol concentration on mushroom PPQ activity.

The reaction medium at 25°C contained 5p1 PPO and substrate concentration ranging from 0 to 50 mM

The PPO in crude extracts was able to use mono-, di-, and trihydroxy phenolic compounds as substrates.

The enzyme showed low activity using mono- and triphenols as substrates but showed much greater activity with the diphenolic substrate Table 2. The number of hydroxyl groups and their position in die benzene ring of the substrate affected oxidase activity (Ziyan and Pekyardimci, 2003). Tyrosine is a good monophenol for die enzyme from die champignon mushroom *Agaricus bisporus* (Sanjust et al., 2003). The enzymatic oxidation of L-tyrosine and other monophenols is accompanied by a typical lag or induction phase before a constant reaction velocity is reached (data not shown). Because of its dual substrate and catalytic activities, die enzyme could be classified as a tyrosinase. These results are in accordance with those reported by Fan and Flurkey (2004) and Ylostalo et al (2001).

Table 2. Monophenolase, di- and triphenol oxidase activity of crude polyphenol oxidase.

Substrate	Wavelength (nm)	% Activity Relative to Pyrocatechol
Monophenols		
L-tyrosine (2 mM)	475	0,7027
Phenol (10 mM)	395	0,5376
Diphenol		
Pyrocatechol (10 mM)	410	100 (154,281 EU/mJ)
Triphenols		
Pyrogallol (10 mM)	420	43,492
Phloroglucinol (10 mM)	395	0,2903

3.4 Effect of protein concentration on PPO activity

The enzyme activities were found to be protein concentration-dependent (Kolcuoglu et al., 2006) (Figure. 4). The plot of final protein concentration in die assay mixture vs. activity exhibited hyperbolic curves. If a higher concentration of die enzyme was used, die activation of the enzyme might be decreased because of die inhibiting effect of ortho-quinones (Ziyan and Pekyardimci, 2003).

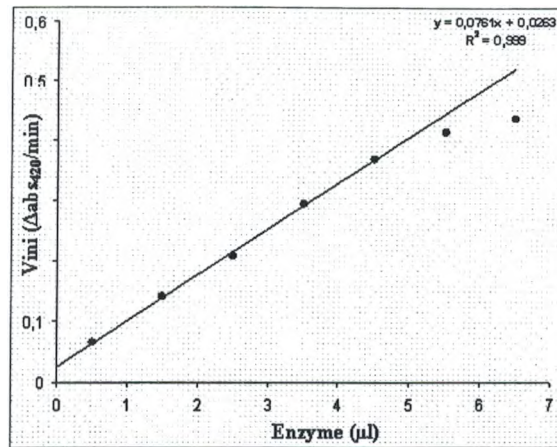


Figure 4. Initial rate against enzyme concentration. Substrate, pyrogallol; buffer, 100 mM sodium phosphate, pH 7; temperature 25°C.

3.5 Effect of temperature on PPO activity and thermal stability

With regard to enzyme stability and temperature, the result obtained was depicted in Figure 5. Temperature optimum of mushroom PPO is 35°C. The enzyme was stable between 25 and 35°C. From 35 to 45°C, the residual activity decreased slightly (17%), but rapid inactivation occurred from 45 to 55°C, when only 15% of activity remained. At 70°C, the residual activity was 0%. Similar results in the study of the thermal stability of the PPO of various sources were reported in the literature (Kolcuoglu et al., 2006; Onal, 2007). PPO is generally considered to be an enzyme of low thermostability (Onal, 2007). The activation energy (E_a) of pyrogallol oxidation by mushroom PPO, was calculated from the Arrhenius plot to be 22 kJ/mol (Figure. 6).

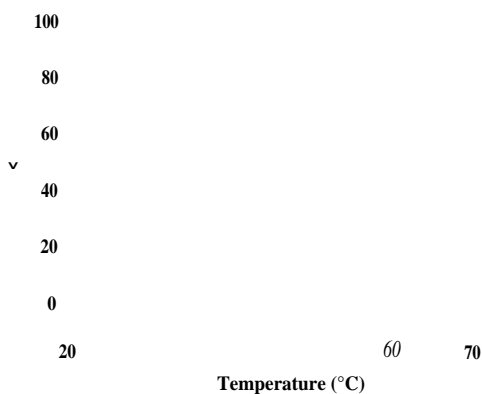


Figure 5. Thermal stability of the enzyme after heating for 30 min. at temperatures between 25 and 70 °C, as determined by activity assay at 25°C. The reaction medium contained 20 mM pyrocatechol in 100 mM sodium phosphate buffer at pH 7

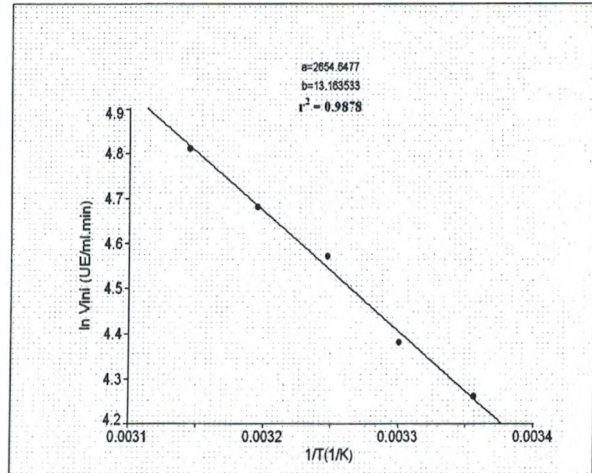


Figure 6. Arrhenius plot for thermal activation of crude extract polyphenol oxidase (pH 7, 100 mM sodium phosphate buffer, pyrogallol 20 mM and enzyme SpI).

3.6 Inhibition studies

All inhibitors used in this study inhibited PPO activity, the extent of the inhibition being dependent on the concentration of the compound used. Figures 7 and 8 demonstrate the effect of benzoic acid and sodium azide as an inhibitor using pyrogallol as substrate. The Lineweaver-Burk double reciprocal plot showed that these inhibitors changed the K_m value but not the V_m value.

These indicate that benzoic acid and sodium azide showed competitive inhibition to the enzyme. The competitive inhibition by benzoic acid and sodium azide is also in accord with that reported for other PPO (Ben-Shalom et al., 1977; Dogan et al., 2005).

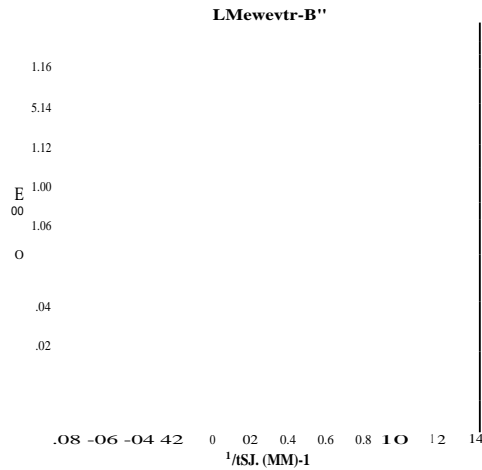


Figure. 7 Competitive inhibition of polyphenol oxidase from *Agaricus bisporus* by benzoic acid (at 0,13-0,25 mM using pyrogallol as substrate)

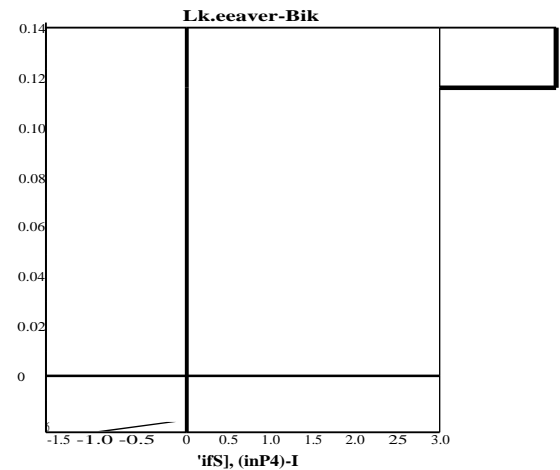


Figure. 8 Competitive inhibition of polyphenol oxidase from *Agaricus bisporus* by sodium azide (at 3,75-7,5 mM using pyrogallol as substrate)

The effect of L-cysteine and sodium fluoride as inhibitor using pyrogallol as substrate is illustrated in Figure 9 and 10, which shows the change of both K_m and V . This implies the inhibition type of L-cysteine and sodium fluoride was mixed. Inhibition by thiol compounds is attributed to either the stable colourless products formed by addition reaction with o-quinones or binding to the active site of PPO (Arsian et al., 2004). It seems very likely that the anions F react with the copper at the active site (Martinez et al., 1986).

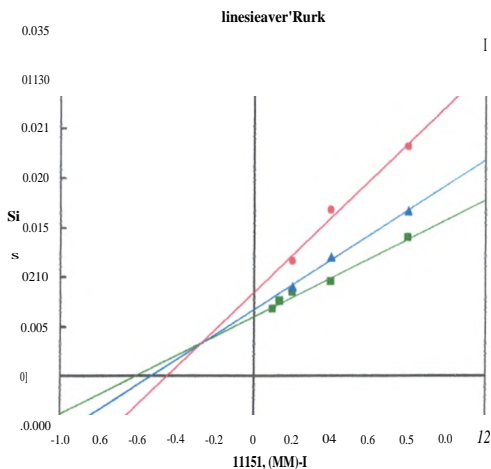


Figure. 9 Mixed inhibition of polyphenol oxidase from *Agaricus bisporus* by L-cysteine (at 0,94-1,25 mM using pyrogallol as substrate)

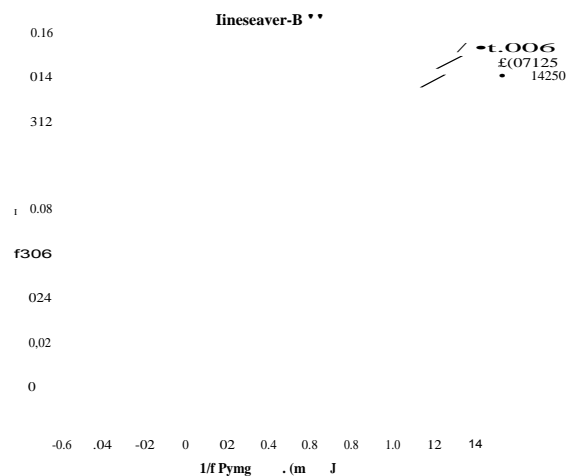


Figure. 10 Mixed Competitive inhibition of polyphenol oxidase from *Agaricus bisporus* by sodium fluoride (at 71,25-142,5 mM using pyrogallol as substrate)

4. Conclusion

In conclusion, the results reported in this study indicated that the PPO extracted and partially purified from *Agaricus bisporus* have both activities catecholase and cresolase. The enzyme was relatively stable during its storage at -15°C . The PPO has maximal activity at pH 7 with pyrogallol as substrate. The temperature optimum was 35°C when pyrocatechol was used as the substrate. The K_m value for pyrogallol and pyrocatechol were 0,40 and 1,40 mM, respectively. Mushroom PPO has greatest substrate specificity. Enzymatic browning in mushroom could be controlled by inhibiting PPO activity.

References

- Abrash, H.I.; Shih, D.; Elias, W.; and Malekmehr, F. 1989. A Kinetic Study of the Air Oxidation of Pyrogallol and Purpurogallin. *International Journal of Chemical Kinetics* Vol. 21, pp. 465-476.
- Anderson, J.W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, Vol. 7, pp. 1973-1988.
- Arsian, O.; Erzengin, M.; Sinan, S. and Ozensoy, O. 2004. Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, Vol. 88, Issue 3, pp. 479-484.
- Ben-Shalom, N.; Kahn, V.; Harel, E. and Mayer, A. 1977. Catechol oxidase from green olives: properties and partial purification. *Phytochemistry*, Vol. 16, pp. 1153-1158.
- Casafiola-Martin, G.M.; Khan, M.T.H.; Marrero-Ponce, Y.; Ather, A.; Sultankhodzhaev, M.N. and Torrens, F. 2006. New tyrosinase Inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 16, pp. 324-330.
- Dawson, C.R. and Magee, R.J. 1955. Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*, Vol. 2, pp. 817-827.
- Dogan, S.; Turan, Y.; Ertirk, H.; and Arslan, O. 2005. Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 53, No. 3, pp. 776-785.
- Espin, J.C.; Morales, M.; Varón, R. 1995. A continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple Polyphenol Oxidase. *Analytical Biochemistry* 231, pp. 237-246.
- Fan, Y. and Flurkey, W.H. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gili tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry* 65, pp. 671-678.
- Garcia-Molina, F.; Pefialver, M.J.; Fenoil, L.G.; Rodriguez-López, J.N.; Varón, R.; Garcia-Cánovas, F. and Tudela, J. 2005. Kinetic study of monophenol and o-diphenol binding to oxytyrosinase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 32, Issues 5-6, pp. 185-192.
- Harel, E.; Mayer, A.M. and Shain, Y. 1964. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiologica Plantarum*, Vol. 17, pp. 921-930.
- Kolcuoglu, Y.; Colak, A.; Sesli, E.; Yildirim, M. and Saglam, N. 2006. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*, Vol. 101, Issue 2, pp. 778-785.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Vol. 93, pp. 265-271.
- Mai-tinez, J.H.; Solano, F.; Pefiafiel, R.; Galindo, J.D.; Iborra, I.L. and Lozano, J.A. 1986. Comparative study of tyrosinases from different sources: relationship between halide inhibition and the enzyme active site. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 83B, No. 3, pp. 633-636.
- Rodakiewicz-Nowak, J.; Monklewicz, M.; Haber, J. 2002. Enzymatic activity of the *A. bisporus* tyrosinase in AOT/isooctane water-in-oil microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect*. Vol. 208, pp. 347-356.
- Sanjust, E.; Cecchini, G.; Sollai, F.; Curreli, N. 2003. 3-Hydroxykynurenine as a substrate/activator for mushroom tyrosinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 412, pp. 272-278.
- Smith, J.L. and Krueger, R.C. 1962. Separation and Purification of the Phenolases of the Common Mushroom. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 237, No. 4, pp. 1121-1128.
- Ünal, M.U. 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, Vol. 100, Issue 3, pp. 909-913.
- Vámos-Vigyáz, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase In fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Vol. 15, pp. 49-127.
- Xu, J.; Zheng, T.; Meguro, S.; Kawachi, S. 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Catanea henryi*). *J. Wood Sci.*, Vol. 50, pp. 260-265.
- Ylostalo, J.; Srivastava, K. and Flurkey, W.H. 2001. Characterization of a tyrosinase isoform from the cap skin of portabella mushrooms. *Journal of Food Biochemistry*, Vol. 25, pp. 493-507.
- Zawilstowski, J.; Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson, N.A.M Eskin, eds. (London, UK: Elsevier Applied Science), pp. 217-273.
- Ziym, E. and Pekyardimci, Ş. 2003. Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem* 27, pp. 217-225.

Acknowledgments

Particular thanks to Pr. William H. Flurkey and Pr. Loïc J. Blum for valuable suggestions and comments and helpful support during the realization of this work.

expression. Knock-down of EJC components therefore should be expected to have a systemic impact on gene expression, resulting in major disturbance of plant growth and development. Indeed, RNAi lines of several EJC genes have demonstrated strong pleiotropic phenotypes. Proteomic DIGE analysis indicated large groups of proteins with altered levels of expression in RNAi lines. A systematic analytical and modelling approach is being developed to unify localisation, protein-protein interaction and function of EJC proteins,

doi:10.1016/j.cbpa.2008.04.026

CSS19

Modelling aspects of solid cancer growth

R Maini (Mathematical Institute, Oxford University)

The modelling of cancer provides an enormous mathematical challenge because of its inherent multiscale nature. For example, in vascular tumours, nutrient is transported by the vascular system, which operates on a tissue level. However, it affects processes occurring on a molecular level. Molecular and intra-cellular events in turn affect the vascular network and therefore the nutrient dynamics. Our modelling approach is to use a multi-scale model, using partial differential equations, processes on the tissue level and couple these to the intracellular events (modelled by ordinary differential equations) via cells modelled as automaton units. In this framework we have modelled structural adaptation at the vessel level and the effects of growth factor production in response to hypoxia. We have also investigated the effects of acid production, mutation and phenotypic evolution driven by tissue environment. These results will be presented.

doi:10.1016/j.cbpa.2008.04.027

ES20

Spatial and temporal information encoding by the NF- κ B system

M. White (Liverpool University); C. Horton (Liverpool University); D. Nelson (Liverpool University); P. Paszek (Liverpool University); L. Ashall (Liverpool University); K. Sillitoe (Liverpool University); V. See (Liverpool University); D. Spiller (Liverpool University); D. Keil (Manchester University); D. Broomhead (Manchester University); D. Rand (Warwick University); M.R.H. White (Liverpool University)

Signalling through NF- κ B involves its release from an inhibitor in the cytosol, followed by translocation into the nucleus. NF- κ B regulation of I κ B transcription represents a delayed negative feedback loop that drives oscillations in NF- κ B translocation. Single cell time-lapse imaging and computational modeling of NF- κ B (RelA) localization showed asynchronous oscillations following cell stimulation that decreased in frequency with increased I κ B transcription. Transcription of target genes depended on oscillation persistence, involving cycles of RelA phosphorylation and dephosphorylation. We used timed stimulation of cells with pulses of Tumour Necrosis Factor alpha (TNF α) at differing doses to investigate the response of the NF- κ B system. These studies suggested that the system has a reset time after which a full amplitude pulse of NF- κ B nuclear occupation is observed when a 5 min pulse of TNF α is applied. Repetitive pulses at regular intervals leads to synchronous oscillations in the cell population assisting biochemical analysis for example by Western blotting ChIP and analysis of differential target gene expression. These studies confirmed that cyclical phosphorylation occurs at RelA Ser536.

Refitting of computational models to these data has made predictions about the role of the A20 feedback loop in regulating NF- κ B signalling. Previously, we have studied the key canonical pathway proteins RelA and I κ B. However, NF- κ B signalling involves a further set of negative and positive feedback loops, including through hI κ B and RelB. We have used a stochastic 3 feedback computational model to suggest that noise in RelA expression may have a role in increasing cell to cell oscillation synchrony.

doi:10.1016/j.cbpa.2008.04.028

To be confirmed

M. Levine (UC Berkeley MCB)

To Be Confirmed

doi:10.1016/j.cbpa.2008.04.029

ES22

Partial purification and characterization of tyrosinase extracted from mushroom (*Agaricus bisporus*)

H. Gouzi, O. Gaouar, A. Benmansour (Department of Biology, University Of Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, Algeria)

Tyrosinase from mushrooms (*Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach) was partially purified and characterized. The enzyme exhibited both monophenolase and diphenolase activities that were measured spectrophotometrically using L-tyrosine and pyrogallol as substrates. A two-fold purification in both activities was achieved by ammonium sulfate fractionation. The monophenolase activity was 3.35 EU/ml, and the diphenolase activity was 189.3 EU/ml. Tyrosinase was relatively stable at -15 °C for 44 days. The enzyme was not very heat stable, and its activity decreased when incubated at the temperatures higher than 35 °C. Tyrosinase activity showed two pH optima, at 5.3 and 7.0 at 25 °C when pyrogallol was used as the substrate. Mono-, di- and triphenols were substrates for tyrosinase. Using V_{max}/K_m as a specificity constant, pyrocatechol was the best substrate followed by pyrogallol. The kinetic parameters of the enzyme were: V_{max} 78 EU/min/ml, K_m = 1.4 mM and K_S = 250 mM for pyrogallol and V_{max} 168 EU/min/ml, K_m = 0.40 mM and K_S = 270 mM for the pyrocatechol. Of the inhibitors tested, competitive inhibition was observed with benzoic acid and sodium azide. A mixed-type inhibition was observed with L-cysteine and sodium fluoride.

doi:10.1016/j.cbpa.2008.04.030

Anoxia resistance in vertebrates: Metabolomics of brains and heart that never stop

I. Lardon, G. De Boeck, R. Dommissie (University of Antwerp)

The capacity to tolerate extended anoxia is restricted to only a few vertebrates. These include some North American freshwater turtles and two cyprinid fishes, the crucian carp (*Carassius auratus* L.) and

Inhibition Kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach Polyphenol Oxidase

Hicham Gouzi^{1,*}, Thibaud Coradin¹, Estrella Núñez Delicado², M. Omit Onal³ and Abdelhafid Benmansour⁴

¹UPMC-P6; CNRS, Chimie de la Matière Condensée de Paris, Collège de France, 11, place Marcelin-Berthelot, 75231 Paris cedex 05, France

²Department of Food Science and Technology, San Antonio Catholic University of Murcia, Avda. De Los Jerónimos s/n, 30107 Guadalupe, Murcia, Spain

³Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture, University of Culwrova, 01330 Adana, Turkey

⁴Department of Biology, Faculty of Science, Abou Bekr Belkaid University, Laboratory for Natural Products Research, Tlemcen 13000, Algeria

Abstract: This paper reports the inhibition kinetics of mushroom (*Agaricus bisporus*; J.E. Lange) polyphenol oxidase (PPO) with benzoic acid, sodium azide and sodium fluoride as inhibitors, and pyrocatechol as substrate. Mushroom PPO was significantly inhibited by all of the tested inhibitors.

Diphenolase activity of mushroom PPO exhibited the competitive-type inhibition with benzoic acid as an inhibitor; the inhibition constant K_I was found to be 0.046 mM. The inhibition by sodium azide was of the mixed-I type, with a K_I of 1.39 mM and K_{I5} of 3.12 mM. A partial mixed-type inhibition pattern was obtained with sodium fluoride, with a K_I of 148.97 mM and a K_{I5} of 49.19 mM. The IC_{50} values were estimated to be 0.147, 3.20, and 123.94 mM for benzoic acid, sodium azide, and sodium fluoride, respectively. Furthermore, benzoic acid was the most effective inhibitor because of its low K_I value. The results showed that the type of inhibition was dependent upon both the origin of the PPO and on the substrate.

Keywords: *Agaricus bisporus*, polyphenol oxidase, diphenolase, pyrocatechol, inhibition, kinetics.

INTRODUCTION

Mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach is the most widely cultivated and consumed edible fungus worldwide. Mushrooms have a short shelf life compared with most fruits and vegetables. Intact mushrooms lose their commercial value within a few days due to senescence, water loss, microbial attack and browning [1].

Browning usually degrades the sensory properties of products because of the associated changes in colour, flavour and hardness. These changes shorten the products' shelf lives and decrease their nutritional and market values [2]. Enzymatic browning is caused mainly by the activity of polyphenol oxidase (EC 1.14.18.1; PPO) in the presence of oxygen [2]. Because of its involvement in this adverse browning effect, PPO has received considerable attention from researchers in the fields of plant physiology and food science [3].

PPO is widely distributed in nature and has been detected in most fruits and vegetables [4]. PPO is a copper-containing enzyme that is responsible for melanization in animals and browning in plants. The enzyme catalyzes two distinct reactions: the *o*-hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols

(*o*-diphenolase activity) (E.C. 1.14.18.1) and the oxidation of *o*-diphenols to *o*-quinones (catecholase activity) (E.C. 1.10.3.2), which polymerize to form a brown, red or black pigment [5].

Mushroom PPO can also oxidize some triphenols when used as a substrate [6]. For example, oxidation of pyrogallol by PPO yields purpurogallin (*o*-hydroxyquinone) as well as additional undefined dark product(s); there is also a subsequent nonenzymatic conversion of purpurogallin to pigmented dimers, tetramers or polymers [7].

The control of PPO activity is of importance in preventing the synthesis of melanin in the browning of mushrooms and other vegetables and fruits [1-8]. In addition, PPO inhibitors have been used as depigmenting agents for the treatment or prevention of pigmentation disorders. Hence, PPO inhibitors are supposed to have broad applications in the medical and cosmetic industries [9]. In the food industry, PPO inhibitors could be used as preservatives for foods and beverages of plant origin. Furthermore, PPO is one of the most important key enzymes in the insect molting process, and thus the discovery of inhibitors of this enzyme may be important in the development of new alternatives for insect control [10].

The inhibition of PPO and prevention of enzymatic browning are often treated as one and the same subject. However, browning may be prevented not only by inactivating the enzyme but also by eliminating one of the two required substrates (O_2 and the phenolic substrate), or by reacting with the enzymatic products to prevent formation of the

Address correspondence to this author at the Université Pierre et Marie Curie-Paris 6; CNRS, Chimie de la Matière Condensée de Paris, Collège de France, 11, place Marcelin-Berthelot, 75231 Paris cedex 05, France; Tel: +33-144-27-15-28; Fax: +33 144 27 1443; E-mail: hicham.gouzi@upmc.fr

colored compounds, which are produced in secondary, non-enzymatic reaction steps [4].

PPO inhibitors fall into three groups: (j) small molecules or ions that bind to the copper centre in the active site, (ii) aromatic inhibitors that compete with phenolic substrates for binding to the active site, and (iii) compounds that reduce or oxidize copper ions [11].

PPO can be inhibited by chelating agents such as cyanide, carbon monoxide, sodium diethyl-dithiocarbamate (DIECA), tropolone, L-mimosine, 2-mercaptothiothiazole, azide, potassium methyl xanthate, L-Ascorbic acid, 4-hexylresorcinol and EDTA [1, 4, 12]. Inorganic ions such as Cu , Ca^{2+} , Zn^{2+} , CO^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} and Sn^{2+} , including halides, are also known to inhibit PPOs from many sources [13-15].

Potential PPO inhibitors from mushrooms, cherries, apples, pears, apricots and potatoes are primarily found in the form of aromatic acids, aromatic aldehydes, carboxylic acids, phloridzin dihydrate and some substituted cinnamic acids [8]. In addition, compounds that do not resemble the substrate structure but are slowly oxidised, such as 4-nitrocatechol, p-nitrophenol and 4-chlorophenol, have been identified as competitive inhibitors of PPO [16]. Inhibition of PPO is also caused by reducing agents, among which sulphites, SO_2 , ascorbic acid, erythorbic acid and thiol-containing compounds are the most frequently studied [5]. Thiol compounds, including L-cysteine, glutathione, dithiothreitol, mercaptoethanol and thiourea, are effective inhibitors of many PPO systems including those found in apple, pear, Jerusalem artichoke tubers, cherimoya, banana, avocado and mushroom [11, 17, 18]. More recently, other plants have been found as a potential source of PPO inhibitors [19]. Among these isolated compounds, cuminaldehyde, oxyresveratrol, kaempferol, quercetin, morin, luteolin, anisaldehyde, kurarinone and gallic acid derivatives are the most potent PPO inhibitors [12]. Several published reports have characterized and evaluated the control of enzymatic browning in *Agaricus bisporus*. However, no published studies have evaluated inhibition of the diphenolase activity of mushroom PPO using pyrocatechol as a substrate.

The present study aimed to carry out a kinetic study of inhibition of the diphenolase activity of partially purified *Agaricus bisporus* PPO by benzoic acid, sodium azide, and sodium fluoride. The main goal of this work was to evaluate the kinetic parameters and inhibition constants for these reactions in order to characterize the system and investigate the mechanism of inhibition. The results of these studies are also compared to data obtained from other sources.

Finally, in an attempt to control browning of the mushroom, the inhibitory potency and 10_{50} values for various inhibitors of PPO activity were determined.

MATERIALS AND METHODS

Materials

PPO enzyme was obtained from the common commercially cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) bought fresh on the free market. Mushrooms were chosen to be white, fresh and as young as possible. The carpophores were

cleaned and stored at 4°C until they were used as the source for enzyme extraction.

Pyrocatechol was obtained from Fluka. All other chemicals and reagents were of analytical grade.

Extraction and Purification of Mushroom PPO

The extraction and partial purification of *Agaricus bisporus* (LE. Lange) Imbach polyphenol oxidase have been given in our previous study [6].

Measurement of PPO Activity

PPO activity was determined by measuring the initial rate of quinone formation, as indicated by an increase in absorbance at 410 nm using pyrocatechol as substrate [20]. A Jenway spectrophotometer was employed throughout the investigation. Stock solution of pyrocatechol was prepared in 0.5 mM ortho-phosphoric acid [20]. One unit of enzyme was defined as a change of one absorbance unit per min [20]. PPO activity was assayed in triplicate measurements and the corresponding mean values were plotted.

The sample cuvette contained 1.99 mL of substrate solution in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) and 0.01 mL of the enzyme solution. The blank sample contained only 2 mL of substrate solution.

The reaction was initiated by the addition of enzymatic extract to the assay medium. The substrates, inhibitors and enzyme fraction were mixed after a pre-incubation period of 5 min at 25 °C. The initial rate was calculated from the slope of the absorbance-time curve [6]. Unless otherwise indicated, PPO was the last component added to the reaction mixture.

Effects of Inhibitors

To determine the effect of inhibitors (benzoic acid, sodium azide and sodium fluoride), PPO activity was measured in the standard reaction medium in the presence or absence of the stated concentration of inhibitor at varying concentrations of substrate ranging from 0.125-1 mM. PPO activities were measured at two constant inhibitor concentrations. Inhibition patterns were determined from double reciprocal plots of velocity versus initial substrate concentration for each inhibitor [5]. The inhibition constants were obtained from the second plots of the kinetic parameters against the inhibitor concentration, as previously described [21]. The inhibition constant K_i is a quantitative measure of inhibitor potency for reversible inhibitors. The effectiveness of inhibitors in our study is therefore expressed by K_i , which is the reciprocal of the enzyme-inhibitor affinity. To determine the inhibitor concentration that reduced the enzyme activity by 50% (10_{50}), regression analysis graphs were drawn by using percent inhibition values by a statistical package programme on a computer. 10_{50} values were determined from a plot of residual activity against inhibitor concentration [22].

Data Analysis

Kinetic data analysis was carried out using linear regression fitting by application of the programs Table Curve 2D™ v2.03, Enzyme Kinetics Pro™ Version 2.36 and SigmaPlot 2004 for Windows Version 9.01. A linear regression method was used to determine whether the experimental data fit the

inhibition equations. The linear regression coefficients are given in Table 1. The regression coefficient values, which were in the range 0.998-1.00, indicate that the experimental data fit the related inhibition equations.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, inhibition of mushroom PPO by benzoic acid, sodium azide, and sodium fluoride was investigated, while pyrocatechol was used as substrate. The prevention of enzymatic browning by a single inhibitor may involve a single mechanism of action or it may result from the interplay of two or more mechanisms of inhibitory action [5].

Competitive Inhibition of Mushroom PPO Diphenol Oxidase Activity by Benzoic Acid

Under the conditions used in the present investigation, oxidation of pyrocatechol by mushroom PPO followed Michaelis-Menten kinetics. Kinetic studies of the enzyme in

the presence of benzoic acid are presented by the Lineweaver-Burk plot shown in Fig. (1). The inhibition behaviour of benzoic acid was shown to act competitively. The inhibitory character of benzoic acid is due to the presence of a benzene ring in its structure [23].

The plot of $1/v$ versus $1/[S]$ consisted of a family of straight lines with varying slopes that intersected one another along the Y-axis. The values of V remained the same and the values of K_m increased with the concentration of the inhibitor, which indicates that benzoic acid acted as a competitive inhibitor of the mushroom PPO. Competitive inhibitors bind free enzyme and not the enzyme-substrate complex. The equilibrium constant for inhibitor binding with free enzyme, K_i , was obtained from a plot of the apparent Michaelis-Menten constant ($K_{m,i}$) versus the concentration of the inhibitor. As seen from Table 1, the inhibitor constants (K_i) for benzoic acid using pyrocatechol as a substrate, was 0.046 mM. Our results agree with those reported previously by Duckworth and Coleman [24]. Gouzi and Benmansour [6]

Table 1. Inhibition type, K_i , K_{i5} , and 10_{50} of *Agaricus bisporus* PPO with Pyrocatechol as Substrate

Inhibitor	()	()	(mM)	(-M	(ETJ/mL)	Inhibition Type	R ²	IC ₅₀ (mM)
Benzoic acid	0			0.44 ± 0.03	24.83 ± 0.80	Competitive	0.999	0.147:k 0.001
	0.05	0.046:k 0.002		0.87:k 0.06	23.46 ± 0.89		1.000	
	0.1			1.12±0.08	22.09±0.95		1.000	
Sodium azide	0			0.44 ± 0.03	24.83 ± 0.81	Mixed type I	0.999	3.20±0.13
	1	1.39*0.23	3.12*0.36	0.58*0.06	19.89± 1.08		0.999	
	2.5			0.65 ± 0.07	12.49 * 0.78		0.998	
Sodium fluoride	0			0.51*0.02	25.07±0.57	Mixed type fl	1.000	123.94* 1.85
	40	148.97±55.71	49.19* 1.21	0.34*0.02	14.17±0.37		0.999	
	100			0.28±0.01	7.79±0.16		1.000	

Each value represents the mean of three replicates ±SD.

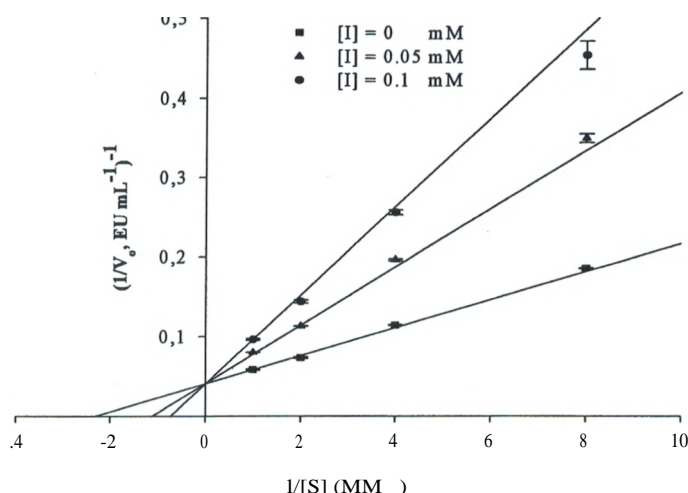


Fig. (1). Lineweaver-Burk plots for inhibition of PPO-mediated oxidation of pyrocatechol by benzoic acid. The concentrations of benzoic acid were 0 (a), 0.05 (A), and 0.1 mM (.). Each value is expressed as the mean±SE of three trials.

observed a competitive-type inhibition by benzoic acid for the triphenol oxidase activity of mushroom PPO using pyrogallol as substrate, with K_i value of 0.043 mM.

Mixed-Type I Inhibition of Mushroom PPO Diphenol Oxidase Activity by Sodium Azide

Under the experimental conditions used in this study, the oxidation of pyrocatechol by mushroom PPO followed Michaelis-Menten kinetics. In the obtained Lineweaver-Burk plot, the lines for the uninhibited enzyme and for the two different concentrations of sodium azide intersected to the left of the $1/v_0$ axis and above the $1/[S]$ axis, with a decrease in V_{max} and, conversely, an increase in K_m , indicating that sodium azide exhibited mixed-type I inhibition for the oxidation of pyrocatechol by mushroom PPO.

The inhibitory kinetics of mushroom PPO by sodium azide are illustrated in Fig. (2). Mixed-type I inhibition implies that sodium azide affected the affinity of the enzyme for pyrocatechol but did not bind at the active site of the enzyme. As seen in Table 1, a K_{15}/K_1 ratio higher than 1 was obtained for sodium azide, indicating that the affinity of the inhibitor for free enzyme is stronger than that for the enzyme-substrate complex [25]. This behaviour suggests that this compound can bind both to free enzyme and to the enzyme-substrate complex, and that the equilibrium constants for these two interactions are different. In this case, mixed inhibition signifies that the inhibitor affects the affinity of the enzyme for its substrate, yet it does not bind at the active site for that substrate [26].

Gouzi and Benmansour [6] observed a competitive-type inhibition by sodium azide for triphenol oxidase activity of mushroom PPO, using pyrogallol as a substrate, with K_i value of 3.2 mM. Dogan, Turan, Dogan, Alkan and Arsian [27] observed non-competitive-type inhibition of *Ocimum basilicum* L. PPO by sodium azide when using pyrocatechol as a substrate.

Arslan and Dogan [5] found that sodium azide was a non-competitive inhibitor of artichoke and *Ocimum basilicum*

L. PPO when using pyrocatechol as a substrate. Furthermore, Aydemir, Kavrayan and Çinar [13] found that sodium azide acted as a competitive inhibitor of PPO extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) when using pyrocatechol as substrate.

To date, azide has consistently been reported to act as an inhibitor of PPO. This behavior of azide is related to its ability to form complexes with many copper enzymes. Sodium azide's toxicity towards metal-containing enzymes, especially copper enzymes, is mainly due to its propensity to strongly coordinate the metal in the active site, which provokes changes in the coordination number and conformation of the active site [28, 29]. The interaction between azide and copper ions in the active site may result in loss of the copper ions from the protein [15]. By preventing the ligation of the precursor tyrosine to the copper, azide inhibits the activity of the enzyme or competes for its active site with another reactive molecule, especially molecular oxygen [28].

As described above, the type of inhibition and the K_i value depend on the structures of both the substrate and the inhibitor [4]. The type of inhibition also depends on the origin of the studied PPO [30]. Hence, no general rule can easily be established with regard to the type of observed inhibition. The K_i and K_{15} values depicted in Table 1 suggest that the most effective inhibitor of diphenol oxidase activity of mushroom PPO was benzoic acid, due to its K_i value. The fact that it is structurally analogous to substrates of PPO may explain its high inhibitory potency.

Benzoic acid and sodium azide are currently used in food technology, and may be useful in the prevention of enzymatic browning of mushroom products. In addition, the hazardous nature of sodium azide was also reported. Consequently, its use must be strictly controlled [31].

Mixed-Type II Inhibition of Mushroom PPO Diphenol Oxidase Activity by Sodium Fluoride

The mechanism whereby sodium fluoride inhibits the diphenol oxidase activity of mushroom PPO was investigated.

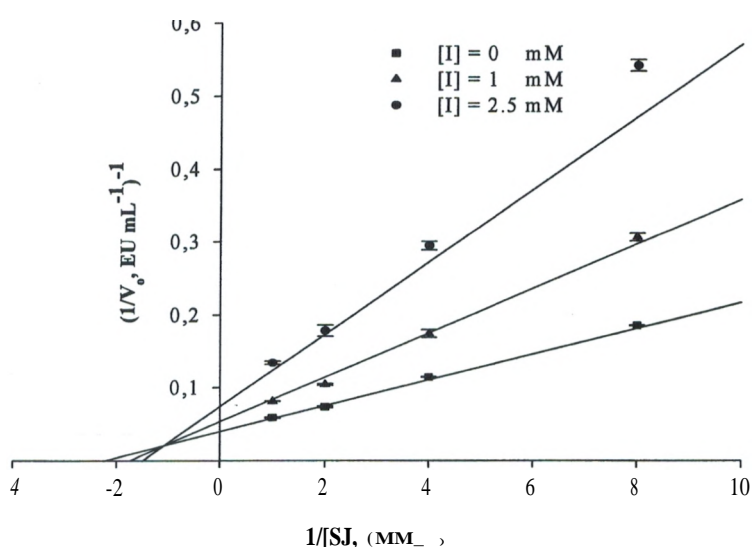


Fig. (2). Lineweaver-Burk plots for inhibition of PPO-mediated oxidation of pyrocatechol by sodium azide. The concentrations of sodium azide were 0 (□), 1 (△), and 2.5 mM (●). Each value is expressed as the mean ± SE of three trials.

The equilibrium constants for the inhibitor binding to free enzyme (E), K_i , and to the enzyme-substrate (ES) complex, K_{i5} , are obtained from the second plots of the apparent K_m/V_{max} and $1/V_{max}$, respectively, versus concentration of (I). The inhibitory kinetics of mushroom PPO by sodium fluoride are illustrated in Fig. (3). Under the experimental conditions employed in this study, the oxidation reaction of pyrocatechol by mushroom PPO followed Michaelis-Menten kinetics.

Double-reciprocal plots yielded a family of straight lines intersecting in the 3' quadrant. Both K_m and V_i decreased with increasing sodium fluoride concentration, which indicates that the inhibition was of the mixed-II type. The non-competitive effect was stronger than the competitive effect, indicating that sodium fluoride inhibits the free enzyme more weakly than it inhibits the enzyme-substrate complex.

The K_i and K_{i5} inhibitory constants of sodium fluoride were 148.97 and 49.19 μM , respectively. These results are summarized in Table 1. The value of K_i was greater than that of K_{i5} , indicating that the affinity of the inhibitor for the enzyme-substrate complex was stronger than that for the free enzyme [19]. In terms of the inhibitory mechanism, the data suggest that sodium fluoride possibly binds not only to the free enzyme but also to the enzyme-substrate complex [32].

From these results, it can be hypothesized that the substrate binding site of the enzyme may be occupied by either the substrate or the inhibitor; however, we cannot exclude the possibility that there is a specific inhibitor binding site on PPO [33].

Gouzi and Benmansour [6] observed mixed-type I inhibition of mushroom PPO by sodium fluoride when using pyrogallol as a substrate.

Effect of Benzoic Acid, Sodium Azide and Sodium Fluoride on Mushroom PPO Diphenolase Activity

The effect of different concentrations of benzoic acid, sodium azide, and sodium fluoride on the oxidation of pyrocatechol by mushroom PPO was studied. Each of these in-

hibitors showed a concentration-dependent inhibitory effect on PPO enzymatic activity.

Figs. (4-6) shows the percent inhibition of PPO by benzoic acid, sodium azide, and sodium fluoride, using pyrocatechol as a substrate. The enzymatic activity markedly decreased as the concentration of inhibitor increased.

In order to compare the inhibitory potencies of these various inhibitors, their 10_{50} values (defined as the concentration leading to 50% loss of activity) were determined under similar conditions. The obtained 10_{50} values are summarized in Table 1 for the purpose of comparison.

Of the three inhibitors tested, benzoic acid was the most potent with an 10_{50} of 0.147 mM. The second was sodium azide with an 10_{50} of 3.20 mM, and sodium fluoride was the weakest with an 10_{50} of 123.94 mM.

CONCLUSION

Inhibition of the diphenolase activity of *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) PPO by various inhibitors is reported here for the first time. The results presented in this study indicate that the partially purified PPO obtained from *Agaricus bisporus* was effectively inhibited by various classical PPO inhibitors using pyrocatechol as substrate. The type of inhibition achieved by each inhibitor was dependent upon both the origin of the PPO and on the substrate.

Based on our results, the most potent inhibitor of mushroom PPO was benzoic acid, followed by sodium azide and then sodium fluoride. Benzoic acid was shown to compete with the substrate for binding to the active site of the enzyme. The K_{i5}/K_i ratio obtained in this study was greater than that for sodium fluoride, indicating that the affinity of the inhibitor for the free enzyme was stronger than that for the enzyme-substrate complex.

Use of benzoic acid and sodium azide may effectively prevent the enzymatic browning of *Agaricus bisporus* during storage, since both compounds inhibit mushroom PPO activity at very low concentrations.

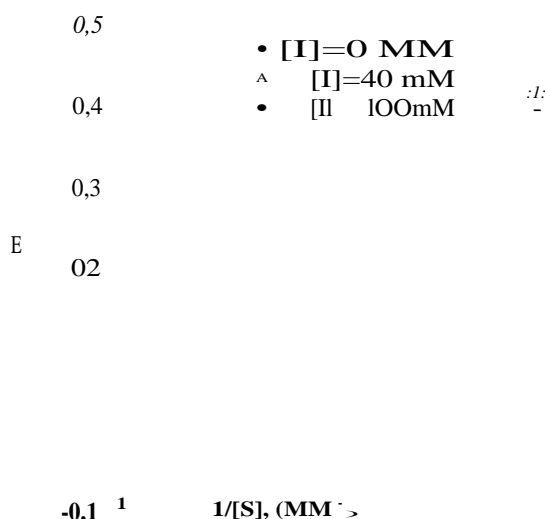


Fig. (3). Lineweaver-Burk plots for the inhibition of PPO-mediated oxidation of pyrocatechol by sodium fluoride. The concentrations of sodium fluoride were 0 (a), 40 (A), and 100 mM (s). Each value is expressed as the mean±SE of three trials.

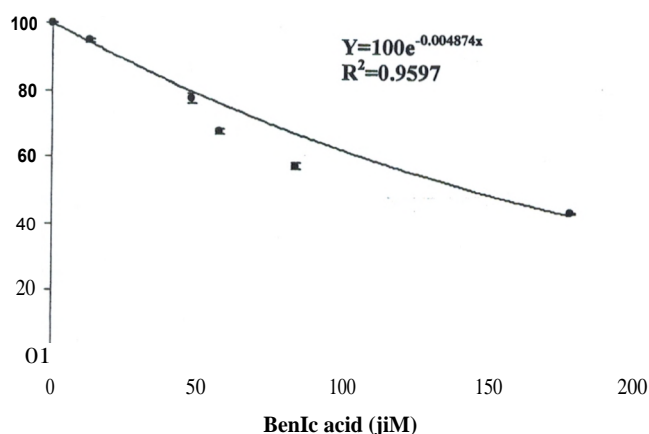


Fig. (4). Benzoic acid-mediated inhibition of mushroom PPO diphenolase activity as reflected by the oxidation of pyrocatechol at 25°C. Assay conditions: 2.0 ml reactions systems contained 0.1 M K_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer (pH 7.0), 0.4 mM pyrocatechol, and 10 µl of mushroom PPO. Each value is expressed as the mean \pm SE of three trials.

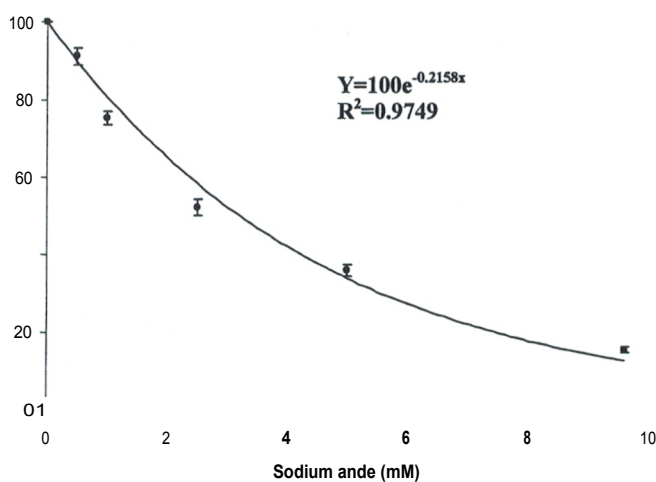


Fig. (5). Sodium azide-mediated inhibition of mushroom PPO diphenolase activity as reflected by the oxidation of pyrocatechol at 25°C. Assay conditions: 2.0 ml reactions systems contained 0.1 M K_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer (pH 7.0), 0.4 mM pyrocatechol, and 10 µl of mushroom PPO. Each value is expressed as the mean \pm SE of three trials.

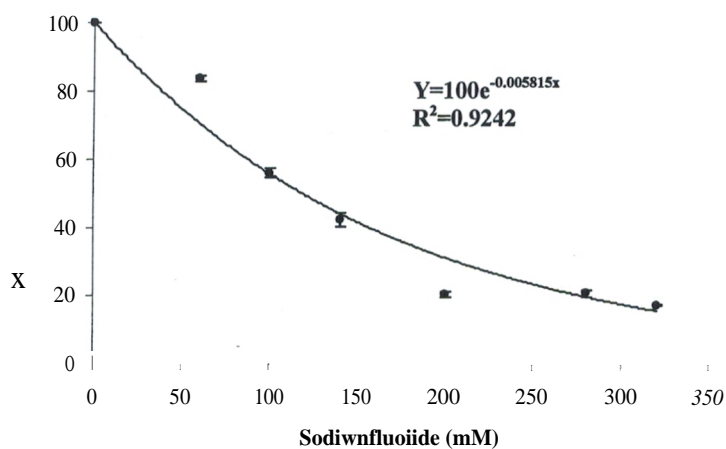


Fig. (6). Sodium fluoride-mediated inhibition of mushroom PPO diphenolase activity as reflected by the oxidation of pyrocatechol at 25°C. Assay conditions: 2.0 ml reactions systems contained 0.1 M K_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer (pH 7.0), 0.4 mM pyrocatechol, and 10 µl of mushroom PPO. Each value is expressed as the mean \pm SE of three trials.

ACKNOWLEDGEMENTS

We warmly thank Professors Armando Gómez Puyou (Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D. F., México), William H. Flurkey (Indiana State University, Terre Haute, Indiana 47809) and Amine AZIZ (University of Hassan II-Mohammedia, 20650 Mohammadia, Morocco) for their contribution to the work presented here. We also thank the reviewers for their constructive comments.

REFERENCES

- [1] Jolivet S, Arpin N, Wichers HJ, Pellon G. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol Res* 1998; 102: 1459-83.
- [2] Martinez MV, Whitaker JR. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci Technol* 1995; 6: 195-200.
- [3] Sé.nchez-Ferrer A, Rodríguez-Lpez JN, Garcia-Canovas F, Garcla-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Bio Phys Acta* 1995; 1247: 1-11.
- [4] Vi.mos-Vigyé.zà L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1981; 15: 49-127.
- [5] Arsian O, Doan S. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *J Sci Food* 2005; 85: 1499-504.
- [6] Gouzi H, Benmansour A. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (JE. Lange) Imbach. *Int J Chem React Eng* 2007; 5: 1-11.
- [7] Kahn V, Ben-Shalom N, Zakin V. Effect of benzenesulfonic acid on the oxidation of o-dihydroxy- and trihydroxyphenols by mushroom tyrosinase. *J Food Biochem* 1999; 23: 263-81.
- [8] Qiu L, Chen QH, Zhuang JX, et al. Inhibitory effects of a-cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chem* 2009; 112: 609-13.
- [9] Han P, Chen CQ, Zhang CL, Song KK, Zhou HT, Chen QX. Inhibitory effects of 4-chlorosalicylic acid on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities. *Food Chem* 2008; 107: 797-803.
- [10] Likhitwitayawuid K. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Curr Sci* 2008; 94:44-52.
- [11] Burton SG. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catal Today* 1994; 22: 459-87.
- [12] Parvez S, Kang M, Chung HS, Bac H. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother Res* 2007; 21: 805-16.
- [13] Aydemir T, Kavrayan D, Çınar S. Isolation and characterisation of polyphenoloxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) Sayi 2003; 21: 115-25.
- [14] Kouakou TH, Kouadio YJ, Kouamé P, Waffo-Téguo P, Décendit A, Mérillon J-M. Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidases from embryogenic and nonembryogenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cells. *Appl Biochem Biotechnol* 2009; 158: 285-301.
- [15] Gao ZJ, Han XII, Xiao XG. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cola*) leaves. *Food Chem* 2009; 117:342-8.
- [16] Mayer AM, Harel E. Review: polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 1979; 18: 193-215.
- [17] Zawistowski J, Biliaderis CG, Michael NA. Polyphenol oxidase. In: Robinson DS, Eskin NAM, Eds.; *Oxidative Enzyme in Foods*; London, UK, Publisher Elsevier Applied Science Ltd 1991; pp. 217-73.
- [18] Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E. Tyrosinase inhibition: General and applied aspects. *J Enzyme Inhibit Mcd Chem* 2002; 17: 207-18.
- [19] Baurin N, Arnout E, Scior T, Do QT, Bernard P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopharmacol* 2002; 82: 155-8.
- [20] Fan Y, Flurkey WH. Purification and characterization of tyrosinase from gu! tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry* 2004; 65: 671-8.
- [21] Chen QX, Lu HY, Zhu CM, Lin liN, Zhou 11M. The effect of N-thiophosphoryl amino acids on the activity of green ciub (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem Mol Biol lut* 1991; 45: 465-73.
- [22] Dogan S, Turan Y, Ertörk H, Arslan O. Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem* 2005; 53: 776-85.
- [23] Pifferi PG, Baldassari L, Cultrera R. Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J Soi Food Agric* 1974; 25: 263-70.
- [24] Duckworth 11W, Coleman JE. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J Biol Chem* 1970; 245: 1613-25.
- [25] Bar M. Kinetics and physico-chemical properties of white-rot fungal laccases. *Magister scientiae. diss., Department of Microbiology and Biochemistry In lise Faculty of Natural and Agricultural Science, University of the Free State: Bloemfontein* 2001.
- [26] Macrae AR, Duggleby RG. Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase. *Phytochemistry* 1968; 7:855-61.
- [27] Dogan S, Turan P, Dogan M, Alkan M, Arsian O. Inhibition Kinetic of *Ocimum basilicum* L. Polyphenol Oxidase. *Jnt J Chem ReactEng* 2007; 5: 1-12.
- [28] Shi C, Liu Q, Dai Y, Xie Y, Xu X. The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase H from tobacco. *Acta Biochim Polon* 2002; 49: 1029-35.
- [29] Gundogmaz G, Dogan S, Arslan O. Some kinetic properties of polyphenol oxidase obtained from various salvia species (*Salvia viridis* L., *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia tomentosa* Miller). *Food Sci Technol Int* 2003; 9: 308-15.
- [30] Robert C, Rouch C, Cadet F. Inhibition of palmito (*Acanthopoe-nix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem* 1997; 59: 355-60.
- [31] Yagar H, Sagiroglu A. Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turkish J Chem* 2002; 26: 97-104.
- [32] Song KK, Lin JF, Chen QX. Inhibitory effects of 4-isopropylsalicylaldehyde on mushroom tyrosinase. *Food (1cm* 2005; doi: 10.1016/j.foodchem. 2005.08.021.
- [33] Walker JRL, Wilson EL. Studies on the enzymatic browning of apples. Inhibition of apple o-diphenol oxidase by phenolic acids. *J Sci Fond Agric* 1975; 26: 1825-31.

Received: August 11, 2009

Revised: November 20, 2009

Accepted: November 20, 2009

© Gouzi et al.; Licensee Bentham Open.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.