



UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES
(I.N.A.T.A.A.)



N° d'ordre : 33/DS/2020

N° de série : 02/INA/2020

Thèse de Doctorat en Sciences

Spécialité : Sciences Alimentaires

Présentée par :

Ala eddine DERARDJA

Purification, caractérisation et essais d'inhibition de la polyphénol-oxydase de l'abricot par des combinaisons : préparations de protéases végétales- acide ascorbique

Soutenue le : 28 / 06 / 2020

Devant le jury composé de :

Présidente :	Pr. KHARROUB Karima	Université Frères Mentouri Constantine1
Rapporteur :	Pr. BARKAT Malika	Université Frères Mentouri Constantine1
Co-encadrant :	Pr. ROMPEL Annette	Université de Vienne-Autriche
Examineurs :	Dr. BENABDALLAH Amina	Université Chadli Bendjedid-El-Tarf
	Dr. BOUMENDJEL Mahieddine	Université Badji Mokhtar-Annaba
	Dr. CHAALAL Makhlof	Université Frères Mentouri Constantine1

Remerciement § Acknowledgment § شكر

بسم الله والحمد والشكر أولاً وأخيراً لله على نعمته وتوفيقه وفضله سبحانه لا علم لنا إلا ما علمت إنك أنت العليم الحكيم".

■ Cette thèse devient réalité grâce à l'aimable soutien et à l'aide de nombreuses personnes. Je tiens à les remercier tous sincèrement :

► Avant tout, je voudrais exprimer ma sincère gratitude à mon promoteur, le professeur **Barkat Malika**, exemple de simplicité, de gentillesse et de générosité, pour toute son aide, sa disponibilité, sa patience et son soutien continu durant toute la période de mes études et recherches de doctorat. Ce travail n'aurait pas vu le jour sans ses conseils précieux, ses encouragements et la confiance qu'elle m'a accordée. Je serais bien ingrate si je ne vous disais pas ma profonde reconnaissance.

► My sincere acknowledgments to my co-director of thesis professor **Annette Rompel** for hosting me and giving me the opportunity to do research in her laboratory. And mostly for her encouragement, support and her precious advices that allowed me to carry out this work. It was a great privilege and honor to work under her guidance. I am extremely grateful for what she has offered me.

► Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail. J'adresse mes plus sincères remerciements au professeur **Kharroub Karima** d'avoir bien voulu présider le jury de soutenance de cette thèse. Je remercie également docteur **Benabdallah Amina**, docteur **Boumendjel Mahieddine** et docteur **Chaalal Makhoulouf** d'avoir accepté d'examiner ce travail et de nous honorer par leur présence. Je vous remercie très sincèrement.

► Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour tous les enseignants et tout le personnel de l'INATAA qui ont contribué de près ou de loin à ma formation. Je remercie chaleureusement toute notre équipe du laboratoire pour leur aide ainsi que tous mes collègues de l'INATAA, en particulier mes amis et collègues de la promotion d'ingénieur et de magister (Hocin, Bilel et tous les autres).

► My sincere acknowledgement goes to my dear colleagues at the institute of biophysical chemistry, University of Vienna, where I had the chance to work with great researchers. More specifically, I would like to express my gratitude and thanks to **Matthias Pretzler** and **Ioannis Kampatsikas** for their continuous support and for imparting their knowledge and expertise in this study.

► Je ne remercierai jamais assez mes chers parents qui m'ont toujours encouragé dans la poursuite de mes études, ainsi que pour leur compréhension et leur soutien. Mes plus sincères remerciements vont aussi à mon frère Maamoune et à mes sœurs : Imene, Noor et Rahma et à toute la famille pour leur soutien.

► Finalement, je tiens à remercier tous ceux, inintentionnellement oubliés ici, qui ont contribué à leur façon à l'avancement de ce travail, même si avec la fameuse question « Quand tu vas soutenir ? ».

—

“Some people were born to sit by a river... Some have an ear for music... Some are artists... Some are scientists... Some swim... Some know Shakespeare... And some people are mothers and fathers”

— *Adapted from : F. Scott Fitzgerald*

—

A ma mère et à mon père

Table des matières

Liste des publications et communications	i
Liste des abréviations	ii
Liste des figures	iv
Liste des tableaux.....	v

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

Partie I. Revue bibliographique

1. Abricot	5
1.1. Origine et propagation.....	5
1.2. Taxonomie.....	5
1.3. Production mondiale	6
1.4. Production nationale	6
1.5. Morphologie et structure	7
1.6. Composition biochimique	8
1.7. Maturation et détérioration post récolte	10
1.8. Conservation et transformation de l'abricot	11
2. Brunissement enzymatique	12
2.1. Généralités	12
2.2. Déclenchement du brunissement enzymatique	12
2.3. Facteurs du brunissement enzymatique	13
2.4. Conséquences du brunissement enzymatique	14
3. Polyphénol-oxydase	12
3.1. Généralités	16
3.2. Rôles physiologiques	16
3.3. Synthèse et localisation	17
3.4. Nomenclature et mécanisme réactionnel	18
3.5. Structure	20
3.6. Latence et activation	21
3.7. Propriétés physico-chimiques	23
3.7.1. Température	23
3.7.2. pH	23
3.7.3. Spécificité de substrat	24
3.8. Produits de la réaction	25
4. Contrôle du brunissement enzymatique	26
4.1. Généralités	26
4.2. Méthodes physiques	26
4.2.1. Traitement thermique	26
4.2.2. Congélation	27
4.2.3. Exclusion d'oxygène	27
4.2.4. Dioxyde de carbone supercritique	28
4.2.5. Traitement à haute pression	28

4.2.6. Irradiation gamma	28
4.2.7. Champ électrique pulsé	28
4.2.8. Ultrason	29
4.2.9. Autres techniques	29
4.3. Méthodes chimiques	29
4.3.1. Agents réducteurs	30
4.3.2. Acidifiants	31
4.3.3. Agents chélateurs	31
4.3.4. Agents complexants	32
4.3.5. Inhibiteurs de l'enzyme	32
4.3.6. Traitements enzymatiques	32
5. Protéases végétales	33
5.1. Généralités.....	33
5.2. Classification	33
5.2.1. Protéases à sérine.....	34
5.2.2. Protéases à cystéine	34
5.2.3. Protéases à acide aspartique	34
5.2.4. Métallo-protéases	35
5.3. Papaïne	35
5.4. Bromélaïne	35
5.5. Ficine	36
5.6. Calotropaine	36
5.7. Utilisation en agroalimentaire	37

Partie II. Matériel et méthodes

1. Démarche expérimentale	38
2. Collaboration scientifique	40
3. Matière première	40
3.1. Abricots	40
3.2. Matière première des préparations de protéases végétales.....	41
4. Analyses physico-chimiques des abricots frais	41
4.1. Détermination de la teneur en eau	41
4.2. Détermination du pH	42
4.3. Détermination du Brix	42
5. Quantification des composés phénoliques	42
5.1. Extraction	42
5.2. Dosage des polyphénols totaux	42
5.3. Dosage des flavonoïdes	43
6. Extraction des enzymes	43
6.1. Extraction de la PaPPO	43
6.2. Extraction des protéases végétales	45
7. Dosage des protéines	45
8. Mesure de l'activité PaPPO	45
9. Purification de la PaPPO	47
10. Électrophorèse sur gel	49

11. Zymographie	49
12. Caractérisation de la <i>PaPPO</i>	50
12.1. Effet du pH	50
12.2. Effet de la température	50
12.3. Inactivation thermique	51
12.4. Spécificité de substrat et cinétique enzymatique	51
12.5. Effet du SDS, des inhibiteurs et des ions métalliques	51
12.6. Stabilité au cours du stockage	52
12.7. Détermination de la masse moléculaire	52
12.8. Identification de la séquence par cartographie des digestats peptidiques	52
13. Protéolyse de la <i>PaPPO</i>	53
14. Inhibition de la <i>PaPPO</i> par l'acide ascorbique	54
15. Effet des préparations de protéases sur la <i>PaPPO</i>	54
16. Inhibition de la <i>PaPPO</i> par combinaison « acide ascorbique/préparations de protéases ».....	54
17. Application des combinaisons « acide ascorbique/préparations de protéases » sur la purée d'abricot et colorimétrie	55
18. Analyses statistiques et traitement des résultats	57

Partie III. Résultats et discussion

1. Caractérisation des abricots frais	58
2. Extraction et purification de la <i>PaPPO</i>	59
3. Caractérisation de la <i>PaPPO</i>	62
3.1. Poids moléculaire	62
3.2. Effet du pH	63
3.3. Effet de la température	64
3.4. Inactivation thermique	66
3.5. Spécificité de substrat et cinétique enzymatique	67
3.6. Effet du SDS, des inhibiteurs et des ions métalliques	70
3.7. Stabilité et auto-activation au cours du stockage	74
3.8. Masse moléculaire de la forme active	77
3.9. Identification de la séquence par cartographie des digestats peptidiques	78
4. Électrophorèse sur gel et zymographie des préparations de protéases	80
5. Protéolyse de la <i>PaPPO</i>	82
6. Inhibition de la <i>PaPPO</i> par les préparations de protéases	84
7. Inhibition de la <i>PaPPO</i> par l'acide ascorbique	87
8. Inhibition de la <i>PaPPO</i> par combinaison « acide ascorbique/préparations de protéases ».....	88
9. Effet des combinaisons « acide ascorbique/préparations de protéases »sur le brunissement de la purée d'abricot	90
Conclusion générale et perspectives	95
Références bibliographiques	97

Annexes

Résumés

Liste des publications et communications

A. Publications scientifiques

1. **Derardja, A. E.**, Pretzler, M., Kampatsikas, I., Barkat, M., & Rompel, A. (2017). Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(37), 8203–8212. **IF of the journal: 3.571.**
2. **Derardja, A. E.**, Pretzler, M., Kampatsikas, I., Barkat, M., & Rompel, A. (2019). Inhibition of apricot polyphenol oxidase by combinations of plant proteases and ascorbic acid. *Food Chemistry: X* 4, 100053. **IF of the main journal: 5.399.**

B. Communication orale

3. **Derardja A. E.**, Barkat M., Pretzler M., Kampatsikas I., & Rompel A. (2018). Extraction, purification et identification de la polyphénol-oxydase (PPO) d'abricot. In : 2^{ème} Colloque International en Bioscience, École Supérieure en Sciences Biologiques (ESSB), 28-29 octobre. Oran, Algérie. CPPM 06, Pp 21.

C. Communications par poster

4. **Derardja A E.**, Barkat M., Pretzler M., Kampatsikas I., & Rompel A. (2018). Auto activation of the purified latent apricot polyphénol-oxydase (*PaPPO*) during storage. In: *Séminaire International des Sciences Alimentaires*, SISA. 15-16 Octobre, INATAA, UFMC1, Constantine, Algérie, B.CA49. Pp.256.
5. **Derardja A E.**, Barkat M., Pretzler M., Kampatsikas I., & Rompel A. (2018). Purification et caractérisation biochimique de la polyphénol-oxydase (PPO) d'abricot. In: *Séminaire International des Sciences Alimentaires*, SISA. 15-16 Octobre, INATAA, UFMC1, Constantine, Algérie, B.CA50. Pp.257.

Liste des abréviations

1-MCP: 1-MéthylCycloPropène

AA: Acide Ascorbique

ANOVA: *ANalysis Of VAriance* « Analyse de la Variance »

A-PaPPO: forme Active (*Prunus armeniaca*) de la PolyPhénol-Oxydase d'abricot

APS: *Ammonium PerSulfate* « Persulfate d'Ammonium »

BSA: *Bovin Serum Albumin* « Albumine de Sérum Bovin »

BMFWF: *BundesMinisterium für Wissenschaft Forschung und Wirtschaft*

CIELAB: Commission Internationale de l'Eclairage *L*a*b**

EAG: Equivalent Acide Gallique

EC: Enzyme Classification

EDTA: *EthyleneDiamineTetraAcetic acid* « Acide Ethylènediaminetétraacétique »

ESI: *ElectroSpray Ionization* « Ionisation par Electronébuliseur »

EQ: Equivalent Quercétine

FAO: *Food and Agriculture Organisation* « Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture »

FF: *Fast Flow*

FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography* « Chromatographie en Phase Liquide à Protéine Rapide »

FT: Flavonoïdes Totaux

HR: *High Resolution*

IC: Inhibition Complète

kDa: KiloDaltons

kGy: KiloGray

LC: *Liquid Chromatography* « Chromatographie en Phase Liquide »

L-PaPPO : forme Latente (*Prunus armeniaca*) de la PolyPhénol-Oxydase d'abricot

LTQ : *Linear Trap Quadrupole* « Piège à Ions Quadripolaire »

MF: Matière Fraîche

MPa : MegaPascal

MS: Matière Sèche

MS/MS: Spectrométrie de Masse en tandem

P : Préparations de protéases

PaPPO: (*Prunus armeniaca*) PolyPhénol-Oxydase d'abricot

PEG: PolyEthylèneGlycol

PM: Poids Moléculaire

PMF: *Peptide Mass Fingerprinting* « Empreinte Peptidique Massique »

PMSF: *PhenylMethylSulfonyl Fluoride* « Fluorure de Phénylméthylsulfonyle »

ppm : Partie Par Million

PPO: PolyPhénol-Oxydase

PT: Polyphénol Totaux

PVC: *PolyVinylChloride* « Polychlorure de vinyle »

PVP: *PolyVinylPyrrolidone*

PVPP: *PolyVinylPolyPyrrolidone*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate* « Dodécylsulfate de Sodium »

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
« Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en présence de Dodécylsulfate de Sodium »

TEMED: TEtraMéthylEthyleneDiamine

Tris : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane

UHPLC: *Ultra High Pressure Liquid Chromatography* « Chromatographie en Phase Liquide Ultra Haute Performance »

Liste des figures

Figure 01. Évolution de la production d'abricot en Algérie entre 1997 et 2017	07
Figure 02. Schéma simplifié d'une coupe longitudinale d'abricot	08
Figure 03. Processus général du brunissement enzymatique	13
Figure 04. Séquence du précurseur peptidique de la PPO d'abricot (Pro-PPO)	18
Figure 05. Schéma typique des réactions catalysées par la PPO	19
Figure 06. Mécanisme catalytique de la PPO	20
Figure 07. Structure de la PPO.	21
Figure 08. Schéma descriptif de la démarche expérimentale optée	39
Figure 09. Abricots (variété Bulida).....	41
Figure 10. Récapitulatif des étapes d'extraction de la <i>PaPPO</i>	44
Figure 11. Courbe d'activité enzymatique (absorbance par rapport au temps).....	46
Figure 12. Récapitulatif des étapes de purification de la <i>PaPPO</i>	48
Figure 13. Colorimétrie par un système de vision par ordinateur	56
Figure 14. Purification de la <i>PaPPO</i> par chromatographie FPLC.	60
Figure 15. SDS-PAGE des étapes de purification de la <i>PaPPO</i>	61
Figure 16. Effet du pH sur l'activité <i>PaPPO</i>	63
Figure 17. Effet de la température sur l'activité <i>PaPPO</i>	65
Figure 18. Inactivation thermique de la <i>PaPPO</i>	66
Figure 19. Cuvettes de l'activité monophénolase de l' <i>A-PaPPO</i> avec la tyramine	69
Figure 20. Diagrammes de Michaelis-Menten des substrats testés.....	69
Figure 21. Effet du SDS sur l'activité <i>PaPPO</i>	71
Figure 22. Effet du stockage à 4 °C sur la <i>PaPPO</i>	75
Figure 23. Spectres de masses (ESI LTQ Orbitrap Velos MS) de l' <i>A-PaPPO</i>	77
Figure 24. Séquence de la <i>PaPPO</i> (UniProt O81103).....	79
Figure 25. Electrophorèse des préparations de protéases.....	81
Figure 26. SDS-PAGE de la protéolyse de la <i>PaPPO</i> par les préparations de protéases..	83
Figure 27. Effet de différentes concentrations de préparations de protéases (P) et du temps d'incubation sur l'activité <i>PaPPO</i> à pH 4,5	84
Figure 28. Effet de la concentration (100 µg) de préparations de protéases et du temps d'incubation sur l'activité <i>PaPPO</i> à pH 4,5 et 7,0	86
Figure 29. Effet de différentes concentrations d'acide ascorbique sur l'activité <i>PaPPO</i> et le temps d'inhibition complète (IC)	87
Figure 30. Effet de différentes combinaisons Acide ascorbique/préparation de protéases (AA/P) sur l'activité <i>PaPPO</i> et la durée d'inhibition complète (IC)	89
Figure 31. Évolution des chromaticités (a^* , b^* et L^*) des purées d'abricots traitées et non traitées (contrôle) pendant 10 jours de stockage à 4 °C	91
Figure 32. Évolution de la différence de couleur totale (ΔE) des purées d'abricots traitées pendant 10 jours de stockage à 4 °C	92

Liste des tableaux

Tableau 01. Classification botanique de l'abricot	05
Tableau 02. Principaux pays producteurs de l'abricot	06
Tableau 03. Composition biochimique d'une portion de 100g d'abricot	09
Tableau 04. Substrats des PPOs de quelques fruits	24
Tableau 05. Combinaisons AA/P testées	55
Tableau 06. Paramètres physicochimiques et teneur en composés phénoliques de l'abricot	58
Tableau 07. Bilan global de la purification de la <i>PaPPO</i>	62
Tableau 08. Spécificité de substrat de la <i>PaPPO</i>	67
Tableau 09. Paramètres de la cinétique enzymatique de la <i>PaPPO</i>	70
Tableau 10. Effet de différents inhibiteurs sur l'activité <i>PaPPO</i>	72
Tableau 11. Effet des ions métalliques sur l'activité <i>PaPPO</i>	73
Tableau 12. Liste des séquences peptidiques identifiées de la L- <i>PaPPO</i> (Asp ¹⁰² →Ser ⁵⁹⁷)	78
Tableau 13. Liste des séquences peptidiques identifiées de l'A- <i>PaPPO</i> (Asp ¹⁰² →Arg ⁴³⁰)	79
Tableau 14. Paramètres de couleur (<i>a*</i> , <i>b*</i> , <i>L*</i> et ΔE) des échantillons de purée d'abricots traités et non traités après 10 jours de stockage.....	93

Introduction
générale

La grande partie de notre alimentation est composée de produits agricoles, principalement des fruits et légumes (Rojas-Graü *et al.*, 2010). Ces derniers sont généralement saisonniers et s'abiment rapidement après leur récolte. Les fruits et légumes sont des milieux vivants, sièges de plusieurs changements physiologique et biochimique. Ces changements, dans la plupart des cas, sont indésirables dans la mesure où ils aboutissent à la détérioration des qualités organoleptiques, nutritionnelles et sanitaires des fruits et légumes (Baldwin et Bai, 2011).

Le brunissement enzymatique est la détérioration biochimique la plus répandue chez les fruits et légumes (Vomas-Vigyazo, 1981; Lee, 1992; Whitaker et Lee, 1995; Marshall *et al.*, 2000; Mesquita et Queiroz, 2013). Les réactions se produisent, suite à un endommagement mécanique, lors des manipulations et des traitements post-récolte, elles peuvent également se manifester naturellement durant la croissance, la sur-maturation et la sénescence des fruits (Whitaker et Lee, 1995; Yoruk et Marshall, 2003; Mayer, 2006). Bien que ce phénomène soit parfois recherché pour certains produits agricoles tels que le café, le thé et les fruits secs, il est considéré comme l'un des plus gros problèmes rencontrés lors de la conservation et la transformation de la plupart des fruits (Eskin, 1990; Marshall *et al.*, 2000; Mesquita et Queiroz, 2013; Singh *et al.*, 2018). En fait, le brunissement enzymatique est responsable de plus de 50% des pertes de l'industrie des fruits (Whitaker et Lee, 1995). Il affecte l'apparence, la saveur et la valeur nutritive et commerciale des fruits, ce qui influe considérablement sur leur qualité et la durée de leur conservation (Eskin, 1990; Mesquita et Queiroz, 2013; Singh *et al.*, 2018). Les réactions de brunissement enzymatique sont principalement initiées après l'oxydation enzymatique de composés phénoliques par les polyphénol-oxydases (PPOs). Cette oxydation produit des quinones, des composés incolores hautement réactifs qui peuvent se polymériser spontanément pour former des pigments bruns (mélanines), responsables du brunissement (Vomas-Vigyazo, 1981; Whitaker et Lee, 1995).

L'abricot (*Prunus armeniaca* L.) est l'un des fruits les plus délicieux et les plus importants de la région méditerranéenne, principalement en Algérie, qui est le premier producteur en Afrique (F.A.O, 2019). Ce fruit climactérique est très apprécié par les consommateurs en raison de sa richesse en nutriments et de ses qualités sensorielles (Akin *et al.*, 2008; García-Martínez *et al.*, 2013; Adkison *et al.*, 2018). Cependant, la détérioration post-récolte rapide de l'abricot limite considérablement sa disponibilité (Siddiq, 2006).

L'abricot est fortement affecté par le phénomène de brunissement enzymatique qui est le problème majeur rencontré au cours de son stockage, sa conservation et sa transformation. Les PPOs sont les enzymes principales responsables de son brunissement (Radi *et al.*, 1997; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003; Ünal et Şener, 2016).

Les PPOs sont des oxydoréductases qui catalysent l'hydroxylation et / ou l'oxydation des composés phénoliques en présence d'oxygène moléculaire (Whitaker et Lee, 1995). Elles sont largement répandues dans la nature et se retrouvent chez la majorité des plantes et des micro-organismes (Mayer, 2006). En raison de leur lien direct avec les réactions de brunissement enzymatique, les PPOs de plantes ont fait l'objet de plusieurs recherches approfondies au cours des dernières décennies, principalement en sciences alimentaires (Marshall, 2003; Yoruk et Jukanti, 2017b; Singh *et al.*, 2018). Ces recherches ont visé, principalement à inhiber les PPOs (McEvily *et al.*, 1992). L'inhibition d'une réaction enzymatique exige une bonne caractérisation de l'enzyme impliquée. La caractérisation de la PPO de différentes sources a montré que les propriétés moléculaires, réactionnelles et biochimiques des PPOs de plantes sont très distinctes et varient considérablement selon l'espèce (Mayer, 2006; Jukanti, 2017b). Cependant, malgré le nombre de travaux de recherche consacrés à ce sujet, les données disponibles ne sont pas suffisantes pour bien comprendre certains mécanismes réactionnels et elles sont parfois contradictoires (Singh *et al.*, 2018). Ainsi, il est nécessaire de mener plus de recherches afin de bien caractériser les PPOs, de comprendre leurs mécanismes réactionnels et de clarifier ces contradictions.

Par ailleurs, plusieurs méthodes physiques (blanchiment, exclusion d'oxygène, radiation, etc.) et des centaines de composés chimiques (agents réducteurs, agents chélateurs, etc.) ont été testées en tant qu'inhibiteurs de la PPO. Cependant, aucune méthode pratique, et sans effets secondaires, n'a été développée pour inhiber complètement le brunissement enzymatique (McEvily *et al.*, 1992; Mesquita et Queiroz, 2013). Jusqu'à présent, le blanchiment et l'emploi de composés réducteurs tels que l'acide ascorbique (AA) et les sulfites sont les méthodes les plus efficaces appliquées en industrie alimentaire (Singh *et al.*, 2018; Hadidi *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019; Feumba Dibanda *et al.*, 2020). Toutefois, les traitements thermiques affectent de manière significative les qualités nutritionnelles et sensorielles des fruits, en réduisant le contenu et la biodisponibilité de certains composés bioactifs (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines, etc.) et en induisant plusieurs modifications chimiques et physiques qui altèrent le goût et la texture du fruit (Rawson *et al.*, 2011). De même, les

composés réducteurs tels que l'acide ascorbique et les sulfites ne fournissent qu'une protection temporaire contre le brunissement, du fait qu'ils sont consommés au cours du processus d'inhibition (Vomas-Vigyazo, 1981). En outre, les sulfites et leurs dérivés tels que le sulfite de sodium et de potassium, le métabisulfite, les bisulfites et le dioxyde de soufre (SO₂) sont de plus en plus restreints en raison de leurs effets sur la santé des consommateurs (Whitaker et Lee, 1995; FDA, 2003; Zhang *et al.*, 2014; Irwin *et al.*, 2017).

En théorie, les PPOs peuvent également être inactivées par digestion si elles sont soumises à l'action des enzymes protéolytiques. L'hydrolyse de la PPO par les protéases provoque la dégradation de la structure primaire de l'enzyme ce qui induit son inactivation (McEvily *et al.*, 1992). Cette approche a reçu peu d'intention par rapport aux autres méthodes d'inhibitions chimiques et seulement quelques travaux ont testé les protéases comme inhibiteurs de brunissement enzymatique en utilisant des préparations végétales (ficine, papaïne, bromélaïne et actinidine) (Labuza *et al.*, 1992; McEvily *et al.*, 1992; Lozano-de-Gonzalez *et al.*, 1993). Les résultats étaient peu prometteurs, où dans la plupart des travaux seulement une inhibition partielle a été enregistrée. De même, la majorité de ces études ont appliqué des préparations de protéase directement sur les fruits. Ainsi, il n'était pas clair si l'inhibition était attribuée à l'inactivation de la PPO par digestion enzymatique ou à une autre substance par un autre mécanisme d'inhibition. Nous avons également constaté la négligence du facteur temps d'incubation lors de l'application des protéases. L'inactivation par les protéases est un processus de digestion enzymatique, ce qui signifie que les protéases ne peuvent pas agir efficacement, directement après leur application et qu'elles ont besoin d'un temps relatif pour digérer leur substrat (PPO).

Les protéases végétales sont parmi les enzymes les plus importantes sur le plan commercial en raison de leurs multiples applications dans les industries : alimentaire (fromagerie, boisson, viande, etc.), pharmaceutique et des détergents. Ces enzymes protéolytiques sont très attractives car elles peuvent être actives sur une large plage de température et de pH (Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011). Les protéases végétales les plus largement utilisées sont la papaïne, la bromélaïne et la ficine, extraites de *Carica papaya*, d'*Ananas comosus* et de *Ficus carica*, respectivement (Grzonka *et al.*, 2007; Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011). Récemment, la calotropaïne, une protéase de cystéine extraite de *Calotropis procera*, a également gagné de l'intention en raison de son activité protéolytique élevée (Anusha *et al.*, 2014).

Dans cette optique, cette thèse de doctorat vise à fournir des éléments pour la compréhension et le contrôle du brunissement enzymatique dans les fruits, en l'occurrence l'abricot. De ce fait, les principaux objectifs de ce travail peuvent être résumés comme suit:

- Comprendre les réactions de brunissement enzymatique engendrées dans l'abricot à travers la purification et la caractérisation de la PPO d'abricot.
- Evaluer le potentiel de certaines préparations de protéases végétales (ficine, papaïne, bromélaïne et calotropaine) en tant qu'inhibiteurs du brunissement enzymatique, en étudiant leur capacité à inactiver la PPO d'abricot.
- Etudier la possibilité de combiner les préparations de protéases végétales et l'acide ascorbique comme nouvelle approche d'inhibition du brunissement enzymatique.

Ce manuscrit de thèse comprend trois parties :

- Partie "Revue bibliographique", c'est une synthèse des travaux en relation avec la thèse. Elle englobe cinq chapitres : le premier chapitre concerne l'abricot, le deuxième explique le brunissement enzymatique, le troisième traite la polyphénol-oxydase, le quatrième expose les différentes méthodes d'inhibition du brunissement enzymatique et le dernier chapitre met l'accent sur les protéases végétales.
- Partie "Matériel et méthodes", dans laquelle nous présentons la démarche adoptée et l'ensemble des méthodes utilisées pour extraire les différentes enzymes, purifier et caractériser la PPO, inhiber *in vitro* et *in situ* la PPO, etc.
- Partie "Résultats et discussion" dans laquelle nous évoquons les principaux résultats obtenus et leurs discussions.

A la fin de ce travail, nous clôturons par une conclusion générale à travers laquelle nous essayons de faire le point sur les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives que ce travail a permis d'entrevoir.

*Partie I. Revue
bibliographique*

1. Abricot

1.1. Origine et propagation

L'abricot (*Prunus armeniaca* L.) est considéré par beaucoup comme l'un des plus délicieux fruits des arbres tempérés. C'est un fruit climactérique à noyau, originaire de Mandchourie en Chine, où il est cultivé depuis 5000 ans (Faust *et al.*, 1998). Les chinois l'appelaient « *sing* », les grecs « *mailonarmeniakon* », les romains « *arborpraecoquum* », les arabes « *albarkouk* », d'où sont dérivés les noms espagnols « *albaricoquero* », italien « *albicocco* », français « abricot » et anglais « *apricot* » (Lichou, 2012). L'abricotier pousse dans des zones géographiquement diversifiées, allant de l'hiver froid de la Sibérie au climat subtropical de l'Afrique du Nord et des déserts d'Asie Centrale, ainsi que les zones humides du Japon et de la Chine orientale. Ce seront les déplacements lors des guerres perso-romaines et/ou les échanges commerciaux avec l'Asie (*via* la célèbre route de la soie) qui semblent expliquer l'introduction des abricotiers en proche Orient (dont l'Arménie qui lui vaut son nom), puis en Europe et en Afrique du Nord (Faust *et al.*, 1998).

2.2. Taxonomie

L'abricotier appartient à la famille des *Rosaceae*, la section *Armeniaca* (Lam.) et le genre *Prunus* (Tableau 01). Ce dernier regroupe environ 200 espèces comprenant toutes les espèces de fruit à noyau tels que le cerisier (*Prunus avium* et *Prunus cerasus*), le pêcher (*Prunus persica*) et le prunier (*Prunus domestica* et *Prunus salicina*). Il existe en fonction des classifications, entre 3 et 10 espèces d'abricotier, toutes diploïdes ($2n = 16$ chromosomes). Elles sont regroupées dans la section *Armeniaca*, dont *Prunus armeniaca* L. (l'abricotier commun) (Rehder, 1949). Les espèces proches sont *P. brigantiaca*, *P. ansu*, *P. mume* « abricot japonais », *P. sibirica*, *P. mandshurica* et *P. dasycarpa* « abricot noir » (Faust *et al.*, 1998).

Tableau 01. Classification botanique de l'abricot (Rehder, 1949).

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Rosales</i>
Famille	<i>Rosaceae</i>
Sous-famille	<i>Prunoideae</i>
Genre	<i>Prunus</i>
Sous-genre	<i>Prunophora Focke</i>
Espèce	<i>Prunus armeniaca</i> L

1.3. Production mondiale

L'abricotier est caractérisé par une forte adaptation aux différentes conditions environnementales en raison d'une abondance notable des géotypes locaux (Audergon *et al.*, 1989). Sa culture s'est développée autour du bassin méditerranéen et en Asie centrale. Aujourd'hui encore, c'est dans ce périmètre que se situent les principaux producteurs. On trouve ailleurs quelques bassins secondaires, dont les plus significatifs sont ceux des Etats Unis et d'Afrique du Sud. L'abricot est le troisième fruit à noyau le plus produit, après la pêche et la prune (F.A.O, 2019). La production mondiale de l'abricot est passée de 1,31 millions de tonnes en 1961 à un peu plus de 4,80 millions de tonnes en 2017, dont 2/4 en provenance d'Asie et 1/4 en provenance d'Europe. Les principaux pays producteurs de l'abricot sont : la Turquie, l'Ouzbékistan, l'Italie et l'Algérie (Tableau 02) (F.A.O, 2019).

Tableau 02. Principaux pays producteurs de l'abricot (F.A.O, 2019).

Pays	Production en tonnes (année 2017)
Turquie	985 000
Ouzbékistan	532 565
Italie	266 372
Algérie	256 890
Iran	239 712
Pakistan	178 957
Espagne	162 872
France	148 500
Maroc	112 538

1.4. Production nationale

Avec plus de 44 307 ha de vergers et un potentiel de production de 256 890 tonnes, l'Algérie occupe actuellement la première place dans le continent Africain et la quatrième du monde. Elle contribue à plus de 6 % de la production mondiale et à 50 % de la production de l'Afrique (F.A.O, 2019). Durant les 20 années, entre 1997 et 2017, la culture d'abricotier a connu une extension remarquable, où la superficie a évolué de 320 %. De même, la production de l'abricot a évolué remarquablement, elle est multipliée par 6 par rapport à l'année 1997. Cependant, après avoir progressé les surfaces semblent s'être stabilisées (Figure 01).

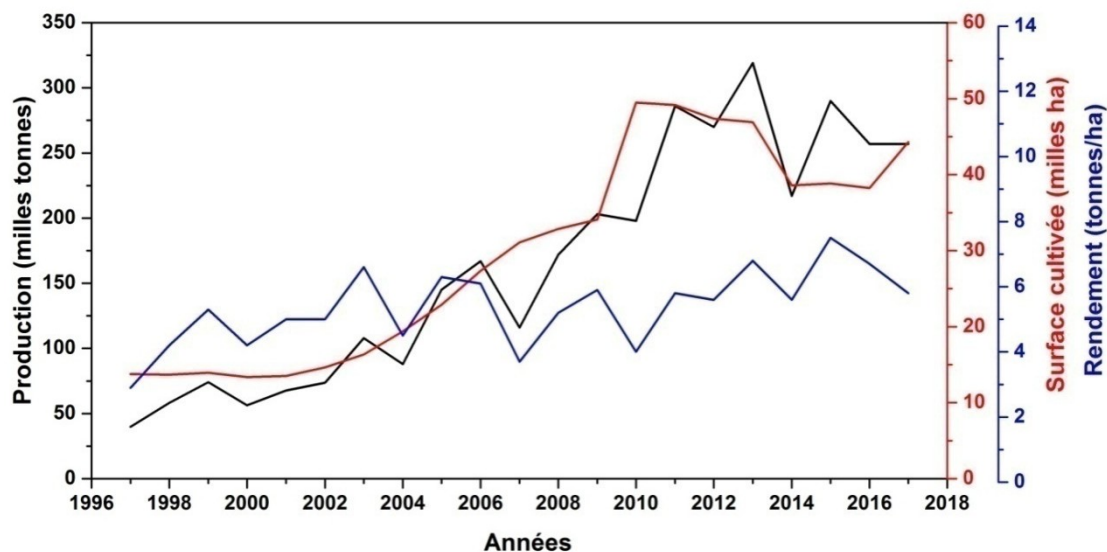


Figure 01. Évolution de la production d'abricot en Algérie entre 1997 et 2017 (F.A.O., 2019).

Malgré cette situation qui paraît favorable, la production algérienne d'abricot demeure faible par rapport à la surface cultivée. Ainsi, le rendement de production (tonnes/ha) est le plus faible dans la région méditerranéenne : Algérie (5,8 tonnes/ha) < Espagne (7,7 tonnes/ha) < Turquie (7,8 tonnes/ha) < Maroc (9,9 tonnes/ha) < France (11,6 tonnes/ha) < Italie (14 tonnes/ha). Les zones les plus productives d'abricot en Algérie sont la région des Aurès et la région de l'Hodna (F.A.O., 2019).

1.5. Morphologie et structure

L'abricot est un fruit charnu à noyau ou drupe, résultant du développement, après fécondation d'un ovaire simple à une seule loge (Lichou, 2012). Le fruit provient donc d'un seul carpelle, dans lequel une seule graine (parfois deux) se développe(nt). Assez symétrique, l'abricot est constitué de deux oreillons séparés par une suture radiale plus ou moins profonde. Cette dernière s'étend sur la moitié du fruit entre l'attache pédonculaire et l'apex. La surface est régulière et parfois légèrement bosselée (Lichou, 1998). Au début de développement du fruit, la paroi de l'ovaire se différencie en trois tissus (Figure 02) (Lurol, 2012):

- L'épicarpe (peau ou épiderme), plus ou moins épais recouvert ou non de poils et d'un enduit cireux (cuticule) ;
- Le mésocarpe (chaire ou pulpe), tissu épais fortement vascularisé, qui représente la plus grande partie du fruit ; il est constitué d'un parenchyme mou à maturité, avec des interstices (ou méats) entre les cellules ;

- L'endocarpe lignifié (noyau dur), qui contient une ou deux graines (amandes) ; il peut être libre ou adhérent à la chair, en fonction des variétés et du stade de maturité ; il est assez lisse pour l'abricot.

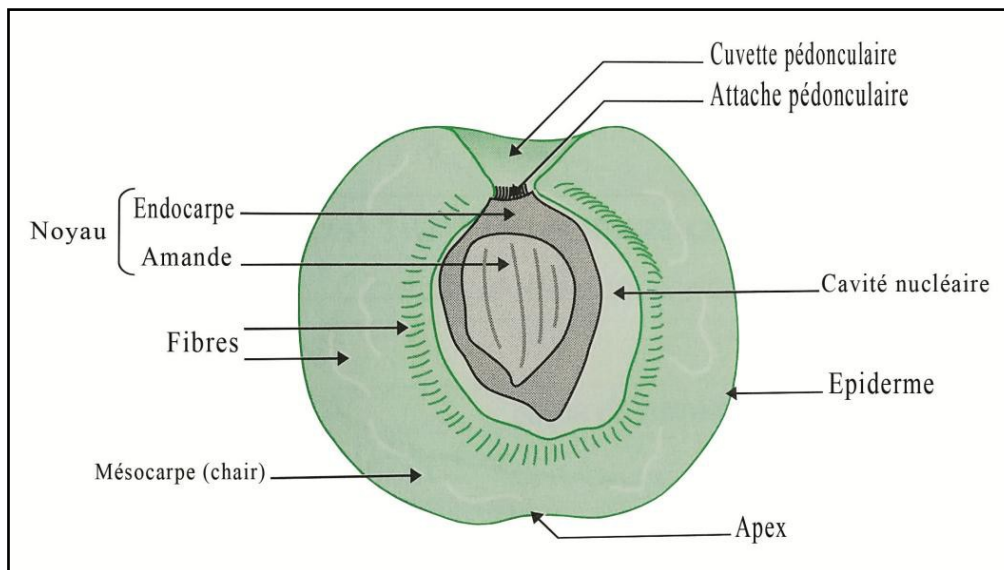


Figure 02. Schéma simplifié d'une coupe longitudinale d'abricot (Lichou, 1998).

Le fruit mûr est de couleur jaune. La partie externe du péricarpe (mésocarpe et épicarpe) est charnue et comestible. Le mésocarpe et l'endocarpe sont séparés par une cavité nucléaire. Le noyau, dans la majorité des variétés est libre ou faiblement adhérent, d'où la classification en drupe de ce fruit (Lichou, 1998; Lurol, 2012).

1.6. Composition biochimique

L'abricot est considéré comme l'un des fruits tempérés les plus délicieux, il est apprécié par les consommateurs pour son goût et son arôme. La saveur caractéristique du fruit est un complexe de sucres, d'acides organiques, de composés phénoliques et de substances volatiles. A maturité, l'abricot est un fruit dont la chair contient 84 à 88% d'eau (Lichou, 1998). Le reste constitue la matière sèche composée essentiellement de glucides, d'acides organiques et de minéraux (Tableau 03). Leur répartition est fortement liée à la variété et à l'état de maturité du fruit (Witherspoon et Jackson, 1996; Gurrieri *et al.*, 2001).

Les glucides sont présents dans le fruit sous la forme de sucres solubles (saccharose, glucose, fructose, maltose, sorbitol et raffinose) et de polymères complexes de structure (cellulose, hémicellulose et pectine). Les sucres solubles constituent la plus grande part de la matière sèche du fruit (Witherspoon et Jackson, 1996).

Tableau 03. Composition biochimique d'une portion de 100g d'abricot (ANSES-CIQUAL, 2020).

Constituant	Unité	Teneur moyenne
Energie	kcal	42,6
Eau	g	86,1
Protéines	g	1,01
Lipides	g	0,35
Glucides	g	7,14
Fibres	g	1,8
Polyphénols totaux	g	0,57
Acides organiques	g	1,4
Sodium	mg	< 1,1
Magnésium	mg	9,94
Phosphore	mg	22,5
Potassium	mg	229
Calcium	mg	15,6
Manganèse	mg	0,16
Fer	mg	0,19
Cuivre	mg	0,08
Zinc	mg	0,14
Beta-Carotène	mg	1,1
Vitamine E	mg	0,89
Vitamine C	mg	10
Vitamine B1 ou Thiamine	mg	0,03
Vitamine B2 ou Riboflavine	mg	0,04
Vitamine B3 ou PP ou Niacine	mg	0,6
Vitamine B6	mg	0,05
Vitamine B9 ou Folates totaux	µg	9

De même, l'abricot est une source importante de fibres, de vitamines et d'acides organiques, tels que l'acide malique et l'acide citrique (Gurrieri *et al.*, 2001). L'arôme fruité est composé principalement de substances volatiles telles que l'acétate d'éthyle, l'acétate d'hexyle et le limonène (Roussos *et al.*, 2011). L'abricot est riche en antioxydants, particulièrement les caroténoïdes et les composés phénoliques (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2007; Roussos *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2013).

La couleur jaune à orange de l'abricot est due à sa richesse en caroténoïdes, notamment : le β -carotène, qui représente plus de 50% des caroténoïdes totaux (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2007; Hussain *et al.*, 2013), le β -cryptoxanthine, le lycopène, le α -carotène et la lutéine (Sass-Kiss *et al.*, 2005; Dragovic-Uzelac *et al.*, 2007).

Les composés phénoliques sont les antioxydants majoritaires de l'abricot. La teneur en polyphénols totaux de l'abricot varie entre 0,22 et 1,58 mg/g de MF (Leccese *et al.*, 2012). Les principaux composés phénoliques de l'abricot sont l'acide chlorogénique, l'acide neochlorogénique, la catéchine, l'épicatéchine, la rutine (quercétine-3-rutinoside) et les procyanidines (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2007; Akin *et al.*, 2008; Sochor *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2013). La concentration des différents composés phénoliques varie selon, la variété, les facteurs environnementaux et le stade de maturation ; généralement la teneur en polyphénols totaux diminue avec le mûrissement des fruits (Garcia-Viguera *et al.*, 1994; Dragovic-Uzelac *et al.*, 2007). De même, leur répartition dans le fruit varie selon la classe de composés considérés. La peau contient généralement plus de flavonoïdes tels que la catéchine et la rutine que la chair (Garcia-Viguera *et al.*, 1994; Campbell et Padilla-Zakour, 2013). Toutefois les dérivés d'acide hydroxycinnamique tels que l'acide chlorogénique sont souvent plus présentes dans la chair (Garcia-Viguera *et al.*, 1994).

1.7. Maturation et détérioration post récolte

L'abricot est un fruit climactérique, c'est-à dire sa maturation s'accompagne d'une production auto-catalytique d'éthylène même si le fruit est détaché de l'arbre. L'éthylène exerce un effet régulateur important sur plusieurs mécanismes physiologiques durant la croissance et le développement de la plante (Baldwin et Bai, 2011). Cependant la production auto-catalytique (post-récolte) de l'éthylène accélère le processus de mûrissement. Les phénomènes les plus évidents liés à ce murissement post-récolte sont les changements de couleur, de fermeté (ramollissement), de saveur, de production d'enzymes et de métabolites (Kader, 1985; Watada, 1986). Certains changements sont désirables tels que la production des sucres, le développement de couleur orange et de saveur. Cependant, une grande partie de ces changements affectent directement la durée de vie des fruits. La maturation post-récolte est généralement accompagnée par la production d'enzymes de dégradation (polyphénol-oxydase, peroxydase, chlorophyllase, cellulase, pectinase, etc.), de métabolites secondaires et plus d'éthylène (Baldwin et Bai, 2011).

Les abricots trop matures sont très mous et fragiles, ainsi, le moindre stress physique provoque la détérioration des cellules de la chair. Ce qui rend les fruits siège de multiples réactions biochimiques. Ces changements biochimiques provoquent la détérioration qualitative (qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique) et quantitative (perte de poids, apparence, texture et valeur nutritionnelle) de l'abricot (De Ancos *et al.*, 2011). Par

ailleurs, le ramollissement des fruits accélère le processus de dégradation et provoque la décomposition des cellules, ce qui incite les réactions d'oxydation, de brunissement et de dégradation par les enzymes endogènes. La détérioration biochimique la plus fréquente de l'abricot est le brunissement enzymatique. Ce phénomène peut réduire de façon significative la qualité des fruits après la récolte (Yoruk et Marshall, 2003).

1.8. Conservation et transformation de l'abricot

Les abricots frais peuvent être bien conservés pour 1 à 2 semaines (ou même 3 à 4 semaines pour certains cultivars) à une température de $-0,5$ à 0 °C et une humidité relative entre 90 et 95 %. Les conditions d'entreposage en atmosphère contrôlée de 2 à 3% d'O₂ et 2 à 3 % de CO₂ sont suggérées pour conserver la fermeté et la couleur du fruit (Siddiq, 2006). De même, des composés chimiques régulateurs sont parfois utilisés pour retarder la maturation et prolonger la durée de conservation des abricots tels que le 1-méthylcyclopropène (1-MCP) (inhibe l'action de l'éthylène) et la putrescine (réduit les l'émission d'éthylène et le taux de respiration) (Botondi *et al.*, 2003). Toutefois, et par comparaison à d'autres fruits (pommes, raisins, etc.) la durée de conservation des abricots frais reste relativement courte. Ainsi, une grande partie de la production mondiale d'abricots doit être préservée autrement, ce qui a fait de l'abricot un fruit de transformation par excellence. Seulement 15 à 20% de la production mondiale d'abricots est consommée frais, le reste est transformé en abricots secs, purée, jus, confiture, surgelé, compote, etc. (Siddiq, 2006; Coşkun *et al.*, 2013). Différents modes de transformation permettent de prolonger la durée de conservation des abricots pour des mois, voir des années. En effet, les traitements appliqués éliminent la majorité des facteurs de détérioration. Cependant, certains facteurs restent difficiles à gérer ou à éliminer. Les réactions biochimiques, telles que le brunissement enzymatique et non enzymatique, qui se manifestent durant ou après la transformation causent de véritables problèmes pour les industriels (Ayala-Zavala et González-Aguilar, 2011).

2. Brunissement enzymatique

2.1. Généralités

Le brunissement enzymatique est une bioconversion naturelle largement répandue, particulièrement dans le monde végétal. C'est un phénomène qui se produit dans de nombreux fruits tels que la pomme (Barrett *et al.*, 1991; Yemenicioğlu *et al.*, 1997), la banane (Gooding *et al.*, 2001), le raisin (Rathjen et Robinson, 1992), l'ananas (Das *et al.*, 1997), la mangue (Robinson *et al.*, 1993), la pêche et l'abricot (Fraignier *et al.*, 1995) et des légumes tels que les aubergines (Perez-Gilabert et García Carmona, 2000), le chou (Fujita *et al.*, 1997) et la pomme de terre (Cho et Ahn, 1999). La réaction transforme les composés phénoliques en présence d'oxygène, en polymères colorés, le plus souvent bruns ou noirs. Les pigments sombres formés sont désignés par le terme général «mélanines» (McEvily *et al.*, 1992; Yoruk et Marshall, 2003). Le brunissement est catalysé par deux enzymes : la polyphénol-oxydase (PPO) et la peroxydase (POD) (Vomas-Vigyazo, 1981). La réaction se produit dans les tissus végétaux, non chauffés, endommagés, notamment par des facteurs mécaniques (découpage), technologiques (congélation-décongélation), ou encore naturels (infection fongique) (Whitaker et Lee, 1995). Ce phénomène doit être distingué du brunissement non enzymatique (réaction de Maillard) qui se produit lorsque des mélanges d'acides aminés et de glucides sont chauffés ensemble (Walker et Ferrar, 1998; Eskin *et al.*, 2013).

2.2. Déclenchement du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique peut avoir lieu naturellement lors de la croissance de certains fruits (Vela *et al.*, 2003; Lee, 2007), mais le plus souvent cette réaction ne se produit qu'après un endommagement mécanique, lors des manipulations et des traitements post récolte (Whitaker et Lee, 1995; Yoruk et Marshall, 2003). Dans les fruits sains, les enzymes et les substrats ne sont pas en contact. En effet, les substances phénoliques sont localisées dans les vacuoles, cependant, les enzymes sont situées dans les organites cellulaires (plastides). Les différents stress physiques tels que, le triage, le découpage et le broyage endommagent les fruits et entraînent la rupture des parois cellulaires et la mise en contact des systèmes enzymatiques et leurs substrats phénoliques (Soliva-Fortuny *et al.*, 2001; Degl'Innocenti *et al.*, 2005) (Figure 03). En conséquence, le brunissement enzymatique est engendré par la conversion (sous l'action de la PPO) des monophénols et /ou des *o*-diphénols en *o*-quinones (composés instables et réactifs). Ces derniers se polymérisent spontanément, et provoquent l'apparition de pigments bruns ou noirs (mélanines), en passant par des intermédiaires qui vont du rouge au bleu (Whitaker et Lee, 1995; Yoruk et Marshall, 2003; Mayer, 2006).

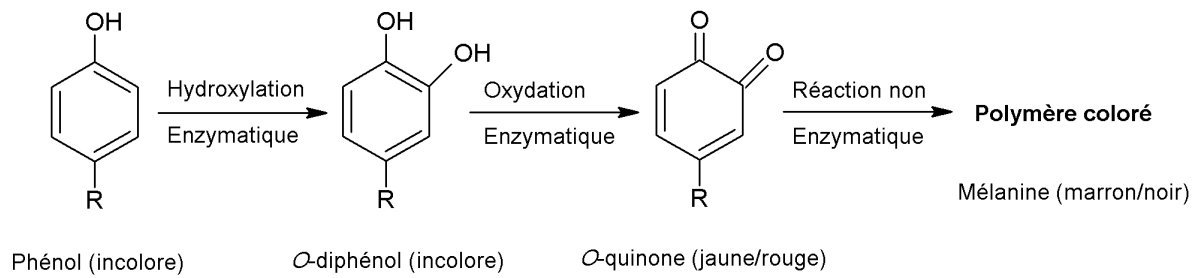


Figure 03. Processus général du brunissement enzymatique (Nicolas *et al.*, 1994).

2.3. Facteurs du brunissement enzymatique

La vitesse et l'intensité du brunissement enzymatique dans les produits végétaux dépendent de la nature et la teneur en polyphénols, de la disponibilité d'oxygène et de l'activité des enzymes, qui elle-même dépend des conditions physico-chimiques du milieu (température, pH et a_w), ainsi que de la présence ou l'absence d'inhibiteurs naturels (Lee, 1992; Yoruk et Marshall, 2003; Jukanti, 2017b).

La formation des pigments bruns au sein des fruits (brunissement enzymatique) est commandée par la teneur et la nature des substrats phénoliques. Il existe une corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le taux du brunissement enzymatique. Toutefois, cette corrélation n'est souvent pas linéaire. En fait, le taux d'oxydation enzymatique des polyphénols dépend des composés individuels présents. En général, les catéchines monomères (catéchine et épicatechine) et les procyanidines dimères (B2, B3) s'oxydent plus rapidement et brunissent plus intensément que les autres composés phénoliques. Les flavan-3-ols monomères et les proanthocyanidines dimères sont aussi des substrats puissants du brunissement enzymatique. Cependant, la catéchine-gallate et la catéchine-catéchine-gallate, les glycosides de quercétine, les flavonols et leurs dérivés sont faiblement oxydés par la PPO (Cheynier *et al.*, 1989; Lee, 1992). Par conséquent, la contribution d'un composé phénolique donné au brunissement ne dépend pas seulement de sa concentration, mais également de sa nature (Lee, 1992).

La concentration, le type d'activité et la forme des enzymes jouent aussi un rôle très important. Les niveaux de la PPO dans un fruit varient selon la variété et le stade de maturation, et leur activité *in vivo* est en fonction de type de réaction qu'elle catalyse (monophénolase ou diphénolase) (Coseteng et Lee, 1987; Murata *et al.*, 1995). En outre, la forme de la PPO (active ou latente) présente dans le fruit affecte l'intensité du brunissement enzymatique. En fait, la forme latente (liée, insoluble) de la PPO est beaucoup moins active

que la forme active (soluble) (Laveda *et al.*, 2001; Sellés-Marchart *et al.*, 2006; Winters *et al.*, 2008). Par ailleurs, le rôle possible de la PPO en tant que promoteur de l'activité POD est suggéré du fait que le peroxyde d'hydrogène est généré au cours de la réaction d'oxydation des composés phénoliques par la PPO (Vomas-Vigyazo, 1981).

Les conditions physico-chimiques affectent considérablement la réaction du brunissement enzymatique. Ainsi, la variation des paramètres physico-chimiques hors des conditions optimales, qui sont généralement un pH neutre et une température entre 30 et 40°C, peut diminuer ou même stopper les réactions de brunissement (Whitaker et Lee, 1995; Yoruk et Marshall, 2003). De plus, la présence des inhibiteurs naturels endogènes tels que l'acide ascorbique et l'acide citrique dans le fruits peut contribuer au ralentissement des réactions de brunissement enzymatique (Vomas-Vigyazo, 1981).

2.4. Conséquences du brunissement enzymatique

Pour certains fruits le brunissement enzymatique est une réaction inévitable qui se produit durant la croissance et la maturation (dates, cacao, etc.). De même, le brunissement enzymatique peut parfois être recherché dans l'industrie agro-alimentaire au cours de quelques procédés de fabrication, où il est responsable du goût et de la couleur caractéristique de certains produits (fruits secs, café, thé, chocolat, etc.) (Whitaker et Lee, 1995; Munoz-Munoz *et al.*, 2008; Corzo-Martinez *et al.*, 2012). Cependant, dans la plus part des cas, le brunissement enzymatique est fortement indésirable (Vomas-Vigyazo, 1981; Nicolas *et al.*, 1994; Whitaker et Lee, 1995; Mesquita et Queiroz, 2013). Il est considéré comme une réaction très néfaste, mal contrôlée, elle est responsable de plus de la moitié des pertes économiques dans le marché des fruits et légumes (Walker, 1995; Whitaker et Lee, 1995). En effet, ce phénomène, pose un problème majeur depuis la récolte, en passant par le stockage, la distribution jusqu'à la transformation au niveau des unités de production alimentaire (Corzo-Martinez *et al.*, 2012).

Les composés phénoliques sont omniprésents dans les fruits et légumes, par conséquent, une quantité importante est contenue dans notre alimentation quotidienne. Ils sont étroitement associés à la qualité sensorielle et nutritionnelle des fruits frais et transformés (Manach *et al.*, 2004; Crozier *et al.*, 2009; El Gharras, 2009). Ils sont responsables de la couleur, l'astringence, l'amertume et l'arôme de plusieurs fruits et légumes. Ils ont également de nombreux bienfaits sur la santé humaine, grâce à leurs activités biologiques et antioxydantes (Huang *et al.*, 1992; Manach *et al.*, 2004; Crozier *et al.*, 2009).

Cependant, les réactions de brunissement enzymatique réduisent significativement la teneur en polyphénols. L'oxydation ou la consommation des composés phénoliques au cours du brunissement altère directement les qualités organoleptique et nutritionnelles des fruits et des produits qui en dérivent (Vomas-Vigyazo, 1981; Zawistowski *et al.*, 1991). L'apparition des composés bruns, entraîne des modifications importantes des produits transformés et diminue fortement leurs attractivités organoleptiques et leurs richesses en composés d'intérêts nutritionnels (Walker, 1995; Yoruk et Marshall, 2003; Mesquita et Queiroz, 2013; Oliveira *et al.*, 2016). Les produits de la réaction d'oxydation peuvent interagir avec les protéines alimentaires conduisant à des condensations covalentes (Mason et Peterson, 1965; Loomis et Battaile, 1966; Nicolas *et al.*, 1994; Bittner, 2006) et à des réactions de réticulation qui entraînent des modifications structurelles, fonctionnelles et nutritionnelles des protéines alimentaires (Matheis et Whitaker, 1984). Ces changements sont dus aux interactions des quinones avec les chaînes latérales des acides aminés des protéines végétales (Matheis et Whitaker, 1984; Felton *et al.*, 1989, 1992; Bittner, 2006). Ainsi, l'oxydation enzymatique des polyphénols s'accompagne par une diminution de la teneur en lysine (acide aminé essentiel) des protéines (Matheis et Whitaker, 1984; Felton *et al.*, 1989). En outre, les quinones formées au cours des réactions d'oxydation peuvent subir un recyclage redox, ce qui génère des radicaux libres, capables d'endommager l'ADN, les protéines, les acides aminés et les lipides (Felton *et al.*, 1992; Hill, 1992; Bittner, 2006).

3. Polyphénol-oxydase

3.1. Généralités

Le brunissement enzymatique est, principalement catalysé par la polyphénol-oxydase (PPO). La PPO (benzène-1,2-diol: oxygène oxydoréductase; EC 1.10.3.1) est une métallo-enzyme à cuivre appartenant au groupe des oxydoréductases. Elle est également connue sous les noms : tyrosinase, monophénol monoxygénase, polyphénolase, phénolase, catéchol oxydase, crésolase et catécholase. Cette enzyme est largement répandue dans la nature, elle a été identifiée et caractérisée dans les plantes, les animaux, les champignons et les bactéries (Whitaker et Lee, 1995; Yoruk et Marshall, 2003; Mayer, 2006). Elle catalyse l'oxydation des composés phénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène moléculaire. Cette oxydation est suivie par une éventuelle polymérisation (non enzymatique) des *o*-quinones en mélanines (Mathew et Parpia, 1971; Macheix *et al.*, 1990; Sapers, 1993). Les PPOs sont différenciées en monophénolases (EC 1.14.18.1) et en diphénolases (EC 1.10.3.1), selon la nature du premier substrat phénolique oxydé (Mayer, 2006). En raison de son implication dans le brunissement enzymatique, la PPO a retenu l'intention des chercheurs du domaine des sciences alimentaires. L'action de la PPO a un impact considérable sur la qualité de plusieurs fruits et légumes. Elle est responsable des altérations de la couleur, de la saveur, de la texture et de la valeur nutritionnelle des fruits et légumes (Vomas-Vigyazo, 1981; Mesquita et Queiroz, 2013).

3.2. Rôles physiologiques

Chez les animaux et les humains, il est clair que la PPO (tyrosinase) est impliquée dans la pigmentation de la peau, des cheveux et de l'œil par la synthèse de mélanine. Ainsi, certain nombre de maladies telles que l'albinisme, le vitiligo et le mélanome sont dues à une suppression ou à un dysfonctionnement de l'activité tyrosinase (Chian et Wilgram, 1967; Iozumi *et al.*, 1993; Song *et al.*, 1994; Byrne et Turk, 2011). Cependant, les fonctions physiologiques et biochimiques de la PPO chez les plantes restent ambiguës. Bien que la PPO soit clairement impliquée dans la réaction de brunissement, son rôle dans les processus physiologique continu d'être un élément central des discussions sur sa fonction. Certaines études ont démontré le rôle possible de la PPO dans des cas spécifiques, notamment la biosynthèse de la bétalaïne (Steiner *et al.*, 1999; Gandía-Herrero et García-Carmona, 2013), le métabolisme de la tyrosine (Araji *et al.*, 2014), la biosynthèse de la lignine (Cho *et al.*, 2003), et la biosynthèse de l'aurone (Sato *et al.*, 2001; Molitor *et al.*, 2016). De même, des anciennes recherches ont suggéré que la PPO peut participer à la production de l'acide caféique à partir de l'acide *p*-coumarique (Vaughan et Butt, 1969).

Toutefois, et malgré ces hypothèses, le rôle que jouent ces enzymes dans le métabolisme des plantes reste encore indéterminé. Par ailleurs, plusieurs recherches ont rapporté à la PPO un rôle dans le mécanisme de défense. Ce rôle est souvent suggéré pour les PPOs des plantes en raison de leur induction lors d'une blessure, d'une attaque par des agents pathogènes ou d'une infestation par des insectes (Constabel *et al.*, 1995; Thipyapong et Steffens, 1997; Maki et Morohashi, 2006). Il a été rapporté que la résistance aux herbivores et aux agents pathogènes implique l'intervention de la PPO (Mayer, 2004).

3.3. Synthèse et localisation

La PPO est présente dans les différents organes et tissus végétaux (racine, graine, feuille, tige, fleur, fruit, etc.) (Vomas-Vigyazo, 1981; Zawistowski *et al.*, 1991; Fraignier *et al.*, 1995; Haruta *et al.*, 1999; Mayer, 2006). La distribution de la PPO dans les différentes parties de la plante dépend de l'espèce, du tissu, de l'âge, et du stade de maturation (Vaughn et Duke, 1981; Sherman *et al.*, 1991; Singh et Ravindranath, 1994; Yang *et al.*, 2002).

Les PPOs sont des enzymes cytoplasmiques de synthèse et plastidiales de localisation. Elles se trouvent souvent associées aux membranes internes des thylakoïdes des chloroplastes et dans les vésicules pour les autres plastes (Vaughn *et al.*, 1988; Sherman *et al.*, 1991; Nicolas *et al.*, 1994; Yoruk et Marshall, 2003). La synthèse et le transport des PPOs vers les chloroplastes, sont des processus complexes (Mayer, 2006). La PPO est d'abord synthétisée sur les ribosomes cytoplasmiques sous forme d'un précurseur protéique (pro-enzyme ; Pro-PPO) inactif (latent) de haut poids moléculaire (environ 65 à 68 kDa). Le précurseur de la PPO chez les plantes est généralement constitué de trois domaines: un peptide de transit N-terminal (~ 4-9 kDa), un domaine catalytiquement actif (~ 40 kDa) et un domaine C-terminal (~19 kDa). Ce précurseur est transporté au chloroplaste, où le peptide de transit à l'extrémité N-terminale sera éliminé de la Pro-PPO par des peptidases stromales (Koussevitzky *et al.*, 1998). Ainsi, au cours de ce processus d'incorporation, la forme Pro-PPO inactive est transformée en une protéine mature latente (domaine catalytique + C-terminal) avec une masse moléculaire inférieure à 60 kDa (Sommer *et al.*, 1994). Ce mécanisme a été rapporté chez plusieurs espèces, notamment la pomme (Boss *et al.*, 1995), l'abricot (Chevalier *et al.*, 1999), le raisin (Dry et Robinson, 1994) et la pomme de terre (Hunt *et al.*, 1993). Le précurseur de la PPO d'abricot est un polypeptide de 597 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 67,1 kDa et la protéine mature (forme latente) résultante est formée de 496 acides aminés (Asp102 → Ser597) avec une masse moléculaire calculée de 56,2 kDa (Figure 04) (Chevalier *et al.*, 1999).

MATAPSPPTMGTYSSLISTNSFSTFLPNKSQLSLSGKSKHYVARRSSISCKATNNNNNSNN 60
 QNEQQEESRLLGKLDRRNILIGLGGLYGATTLDRKPFADPIAPPDLTTCCKPAEITPG 120
 GSETVPCPPVTTKIKTFKPDLSIPLRTSPAHHQVTDEYLAKFKKAQAAMRALPDDPRS 180
 MVQQAQVHCAYCNGAYPQVGFDTNDIQVHFSWLFPPFHRMYLYFYERILGKLIDDPTFAL 240
 PYWNWDSVPGFPIPIDIYTDTSPLYDQYRNADHQPPVLVDLSYGGKDDVDVEQTRIDENL 300
 AIMYRQMVSGAKTPDLFFGHAYRAGNLNTGKYPGTIENMPHNNIHIWVGDPSTHQEDMG 360
 NFYSAGRDPLFYAHHANVDRMWNIWKTLLGGKRKIDITDLDWLDAEFLFYDENAEELVVRVKVR 420
 DSLEPEKQLRYNYEPVSLPWLFTKPTARKTKNKTAKVAATQLTSKFPATLVEVTTVEVA 480
 RPKPRKRSKKEKVDEEELLIKDIEFEGTEAVKFDVFINDDAESLSRRDKSEFAGSFVHV 540
 PQGKTTKAKTKTNLKLGITDLELDLGAEDDSSVLVTLVPRVSNSPITIGGFKIEYSS 597

AA : Peptide de transit N-terminal

AA : Forme mature latente de la PPO d'abricot

Figure 04. Séquence du précurseur peptidique de la PPO d'abricot (Pro-PPO) (Chevalier *et al.*, 1999).

3.4. Nomenclature et mécanisme réactionnel

La nomination polyphénol-oxydase (PPO) est un nom générique pour un groupe d'enzymes capables de catalyser des réactions d'hydroxylation et principalement d'oxydation de plusieurs composés phénoliques afin de produire des *o*-quinones (Mathew et Parpia, 1971; Whitaker, 1994). La PPO accomplit l'*o*-hydroxylation des monophénols (activité monophénolase) et l'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones (activité diphénolase) en utilisant l'oxygène comme oxydant primaire (Vomas-Vigyazo, 1981; Zawistowski *et al.*, 1991). L'activité monophénolase, également appelée crésolase, est toujours couplée à l'activité diphénolase (cas des tyrosinases). Autrement, la tyrosinase est dotée toujours d'une activité diphénolase. Cependant, l'activité diphénolase n'est pas toujours précédée par l'activité hydroxylase (cas de la catéchol-oxydase) (Whitaker, 1994). L'oxygène en tant qu'oxydant primaire et le cuivre en tant que groupe prosthétique sont essentiels à l'activité PPO (Yoruk et Marshall, 2003). L'élimination du cuivre de l'enzyme par des réactifs chélateurs du cuivre donne une enzyme relativement inactive (Kowalski *et al.*, 1992). Le schéma typique des réactions catalysées par la PPO et la condensation oxydative non-enzymatique des *o*-quinones sont illustrés dans la figure 05. La réaction globale d'hydroxylation implique l'introduction d'un atome d'oxygène sur le monophénol et la réduction de l'autre en eau (Mason, 1957). L'origine de l'oxygène apparue dans le monophénol est l'oxygène moléculaire (Mason, 1956). L'activité monophénolase nécessite la présence d'un donneur d'hydrogène (BH₂). Le BH₂ n'est pas requis dans l'activité diphénolase (Figure 05) car les *o*-diphénols doivent compléter la réaction (Whitaker et Lee, 1995) et produire les *o*-quinones correspondantes. Ainsi, les deux atomes d'oxygène sont réduits en eau (Mason, 1957).

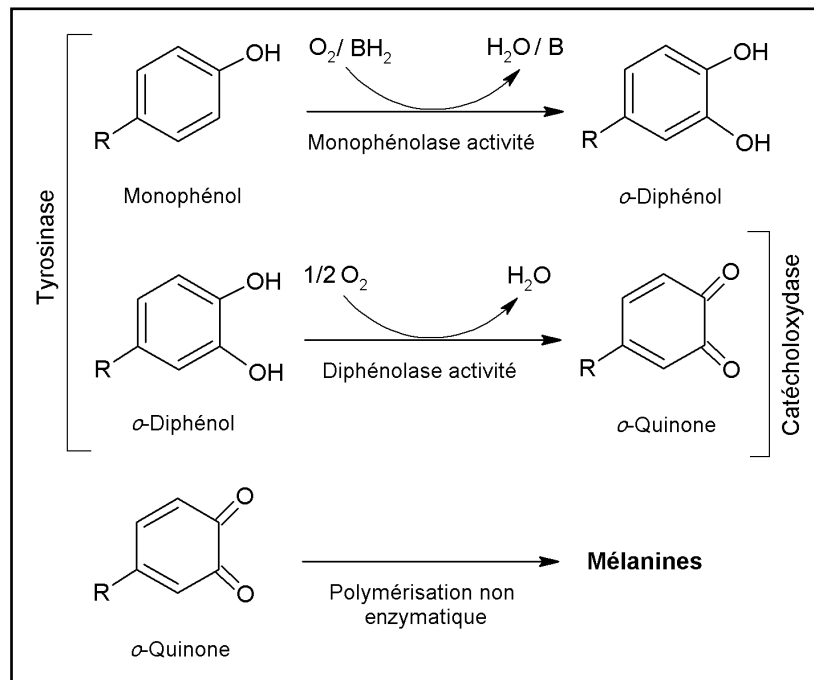


Figure 05. Schéma typique des réactions catalysées par la PPO (Yoruk et Marshall, 2003).

La PPO existe sous trois formes ; *met*-PPO, *désoxy*-PPO et *oxy*-PPO, en fonction de l'absence/présence d'oxygène et de l'état d'oxydation des ions cuivre (Cu^{2+} , Cu^{1+}). La forme de l'enzyme au repos est *met*-PPO, dans laquelle un ion hydroxyle est coordonné par deux ions Cu^{2+} (Himmelwright *et al.*, 1980; Solomon *et al.*, 1992), en présence d'oxygène, elle est réduite en *désoxy*-PPO (Cu^{1+}), via l'oxydation d'une molécule d'*o*-diphénol en *o*-quinone. La formation d'*o*-quinone est suivie de sa libération de l'enzyme. La PPO se combine ensuite avec l'oxygène (O_2) pour donner un intermédiaire *oxy*-PPO. La forme *oxy*-PPO est la forme oxydante principale de l'enzyme, elle peut assurer l'hydroxylation d'un monophénol et l'oxydation d'un *o*-diphénol. Les substrats monophénoliques (Figure 06.B) ne peuvent réagir qu'avec la forme *oxy*-PPO (Lerch, 1995). Cependant, les substrats diphénoliques (Figure 06.A) peuvent réagir avec les deux formes *met* et *oxy*-PPO (Whitaker et Lee, 1995). La forme diphénolase (catechol-oxydase) a été considérée pendant des années comme la forme majoritaire de la PPO chez les plantes supérieures. Cependant, aujourd'hui plusieurs chercheurs attribuent l'absence d'activité monophénolase à la latence, où il a été démontré que l'activité monophénolase peut être détectée après l'activation de la forme latente (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1990; Jiménez et García-Carmona, 1996; Laveda *et al.*, 2001). L'activité monophénolase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente par rapport à la réaction d'oxydation (activité catechol-oxidase) (Yoruk et Marshall, 2003).

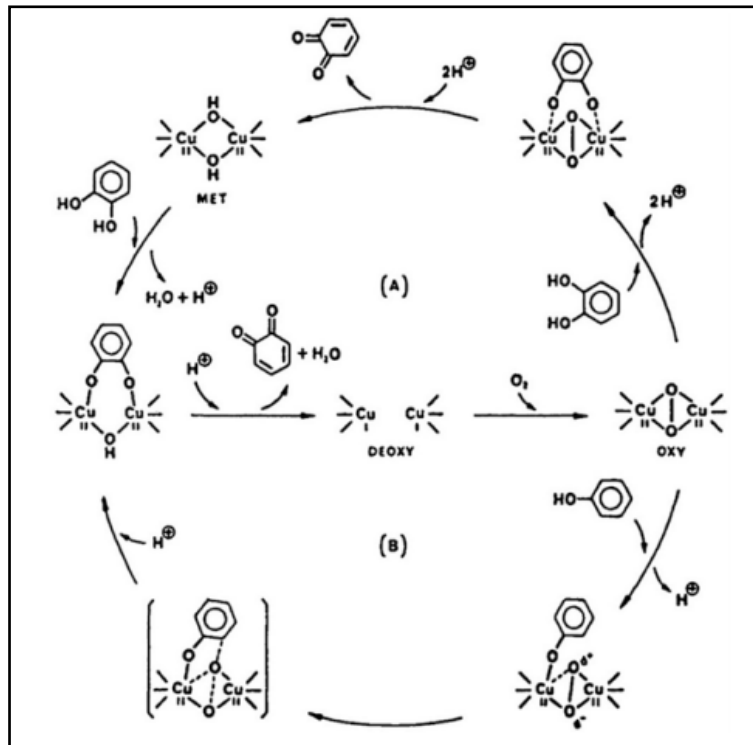


Figure 06. Mécanisme catalytique de la PPO (Whitaker et Lee, 1995).

3.5. Structure

Les PPOs sont présentes généralement chez les plantes sous forme latente de poids moléculaire entre de 55 à 60 kDa. Cette forme inactive est composée d'un domaine catalytique d'environ 40 kDa (active) lié à un domaine C-terminal de 15 à 20 kDa (Van Gelder *et al.*, 1997). La partie peptidique qui lie les deux domaines est appelée peptide lieur, un fragment de 50 à 80 résidus exposés à la surface de l'enzyme (Dry et Robinson, 1994) (Figure 07.A). La forme latente est généralement inactive ou faiblement active, où le domaine C-terminal bloque complètement ou partiellement le site actif de l'enzyme. L'élimination de la partie C-terminale (activation) donne naissance à la forme active de la PPO (Molitor *et al.*, 2016, 2015). La forme active de la PPO (Figure 07.B) est une sphère hydrophile, monomère, d'une masse moléculaire voisine de 40 kDa avec une structure secondaire faite principalement par 4 hélices α , qui entourent le centre catalytique à deux atomes de cuivre Cu-A et Cu-B (centre di-nucléaire de cuivre), qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Chacun des ions de cuivre est coordonné par trois résidus d'histidine (Gerdemann *et al.*, 2002). La structure du site actif de l'enzyme, dans laquelle le centre di-nucléaire de cuivre est lié par six ou sept résidus histidine et un résidu cystéine unique est hautement conservée (Figure 07.C). La configuration du site actif est maintenue par des interactions ioniques (Mayer, 2006).

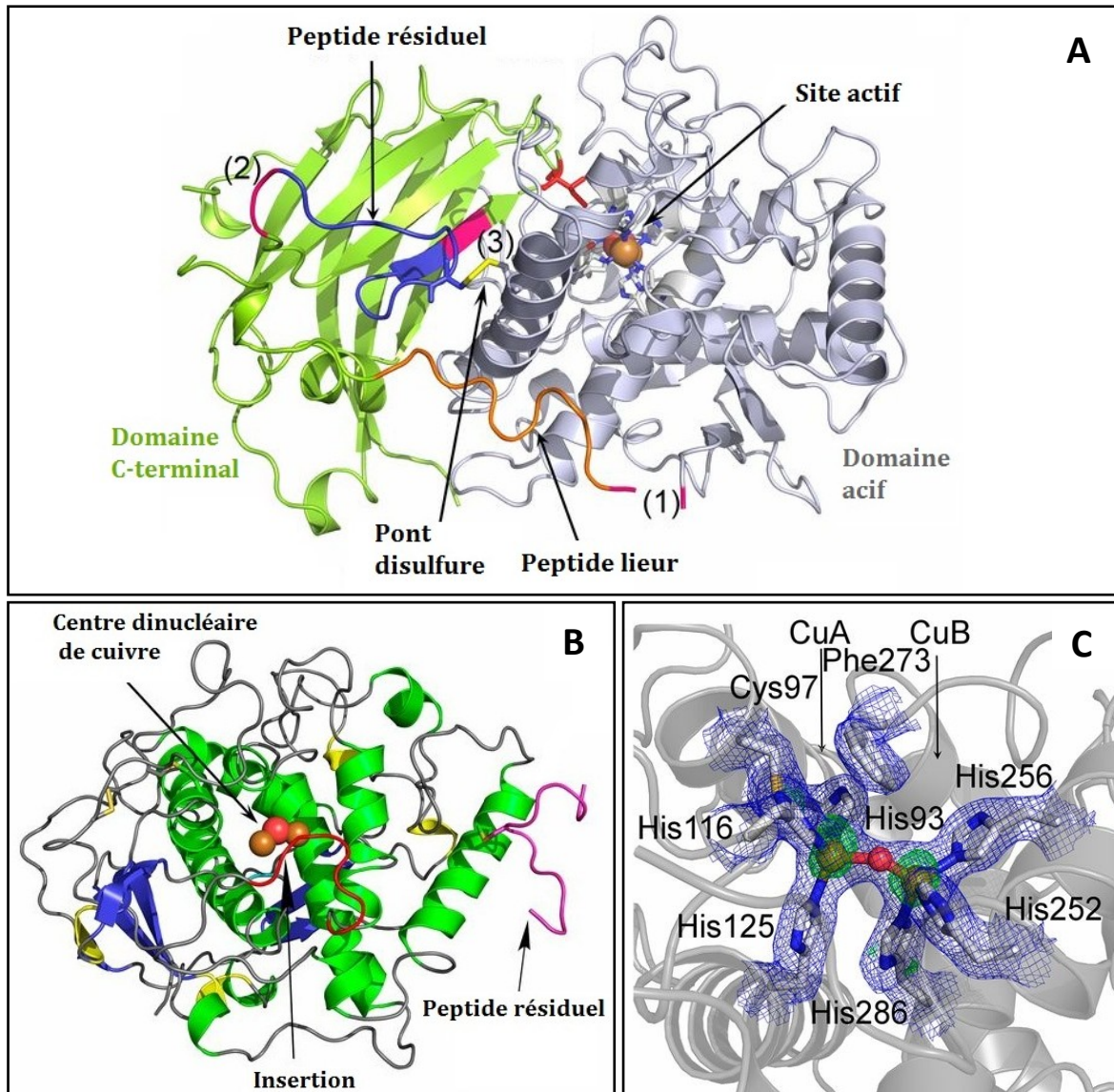


Figure 07. Structure de la PPO. (A) forme mature latente de la PPO. (B) forme active de la PPO. (C) Site actif de la PPO (Molitor *et al.*, 2016).

3.6. Latence et activation

La forme latente de la PPO est une enzyme inactive, faiblement soluble est généralement liée aux membranes thylacoïdiennes (Yoruk et Marshall, 2003). Elle n'intervient pas dans l'oxydation des substrats phénoliques, que suite à une activation provoquée par une blessure, un stress ou pendant la sénescence (Yoruk et Marshall, 2003). Soler-Rivas *et al.*, (1997), ont rapporté qu'une attaque par des agents pathogènes peut activer la PPO, indiquant la présence d'un mécanisme d'activation (*in vivo*) en réponse à une infection. Ce mécanisme d'activation n'est pas tout à fait clair, mais il a été démontré que cette activation est corrélée avec l'élimination d'un fragment peptidique C-terminal (Gerdemann *et al.*, 2002). L'activation de l'enzyme est réalisée par des protéases endogènes qui hydrolysent l'enzyme latente au niveau

d'un fragment peptidique spécifique (peptide lieur) (Rathjen et Robinson, 1992; Robinson et Dry, 1992; Laveda *et al.*, 2001). Par conséquent, les inhibiteurs de protéases sont généralement utilisés au cours des procédures d'isolement afin d'éviter toute activation ultérieure de la PPO par les protéases endogènes (Mayer, 2006).

Par ailleurs, plusieurs travaux ont étudié l'activation des PPOs latentes *in vitro*. Divers traitements ou agents ont été trouvés capables d'activer l'enzyme. L'activation de la PPO peut être induite par les acides gras (Golbeck et Cammarata, 1981; Onsa *et al.*, 2000), les alcools (Espín et Wichers, 1999; Onsa *et al.*, 2000), les détergents (Angleton et Flurkey, 1984; Moore et Flurkey, 1990; Robinson et Dry, 1992; Jiménez et García-Carmona, 1996; Laveda *et al.*, 2001), les acides et les bases (Kenten, 1957), les protéases (Tolbert, 1973; Saluja et Sachar, 1982; King et Flurkey, 1987; Robinson et Dry, 1992; Laveda *et al.*, 2001), la sonication (Van Leeuwen et Wichers, 1999) et les traitements thermiques doux (Sheptovitsky et Brudvig, 1996). L'activation protéolytique de la PPO *in vitro* avec des protéases exogènes est semblable à son activation *in vivo* (Rathjen et Robinson, 1992; Robinson et Dry, 1992; Dry et Robinson, 1994). Les protéases, telles que la trypsine, activent la PPO en libérant la partie C-terminale de la forme latente (Golbeck et Cammarata, 1981; Harel *et al.*, 1973). Le clivage protéolytique de la forme latente de 60 kDa donne une forme active de 42 kDa et des peptides inactifs de 15 à 18 kDa. L'activation par les protéases a été attribuée à une protéolyse partielle au niveau d'un fragment peptidique spécifique exposé à la surface avant l'extrémité C-terminale (Robinson et Dry, 1992).

Des détergents tels que le dodécyl sulfate de sodium (SDS) ont été largement utilisés pour activer les PPOs latentes de plusieurs sources végétales (Yoruk et Marshall, 2003). En général, le SDS désactive la majorité des enzymes en altérant la structure tertiaire et quaternaire des protéines. Cependant, la présence des ponts disulfures dans la PPO renforce sa structure, ce qui lui a confié une certaine résistance à cette altération (Fraignier *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 1995; Mari *et al.*, 1998). L'activation de la PPO est généralement réalisée à de faibles concentrations de SDS (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1993). Le mode d'activation de la PPO par le SDS a été attribué aux changements de conformation limités causés par la liaison de petites quantités de SDS à la PPO. L'activation de la PPO par les autres agents tels que les acides gras et les alcools peut également être due à des changements de conformation provoqués dans la structure de la PPO par ces agents (Yoruk et Marshall, 2003).

3.7. Propriétés physico-chimiques

La révision des différents travaux qui ont isolé et caractérisé les PPOs a montré que les caractéristiques physico-chimiques et réactionnelles des PPOs telles que la spécificité de substrat, la température et le pH optimum, se différencient d'une espèce à une autre. Les différences ont été signalées même entre les PPOs isolées de la même espèce (l'existence de multiples formes et iso-formes) (Wong *et al.*, 1971; Harel *et al.*, 1973; Ôba *et al.*, 1992; Van Leeuwen et Wichers, 1999; Ünal et Şener, 2016). En outre, il existe des rapports contradictoires concernant le nombre de formes de PPO dans certaines espèces / tissus (Harel *et al.*, 1973; Sanchez-Ferrer *et al.*, 1989). Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de ces différences tels que le stade de maturation, la localisation subcellulaire ainsi que les conditions d'extraction et de purification (Yoruk et Marshall, 2003; Jukanti, 2017).

3.7.1. Température

La température est un facteur important qui influence de manière significative l'activité catalytique de la PPO. Il est bien connu qu'une diminution de l'énergie cinétique des molécules à des basses températures correspond à une réaction plus lente (Lehninger *et al.*, 2005). Ainsi, comme toute enzyme, l'activité PPO est favorisée par une augmentation relative de la température. La PPO est une enzyme mésophile, avec des températures optimales qui se situent généralement entre 20 et 45 °C, selon la source végétale. Cependant, l'augmentation de la température peut affecter considérablement l'intégrité de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Les traitements thermiques à des températures entre 50 et 70 °C pendant 30-60 minutes ou à des températures élevées (> 90 °C) pendant 1-5 minutes provoquent la dénaturation de la PPO (Whitaker, 1994; Yemencioğlu et Cemeroglu, 2003). En outre, les variations de température peuvent diminuer la solubilité de l'oxygène, qui est optimalement soluble à des températures voisines de 20 °C (Whitaker, 1994).

3.7.2. pH

Le pH optimal des PPOs est une propriété physicochimique importante qui varie de manière significative en fonction de différents facteurs, y compris la source végétale, la température, le substrat utilisé, les méthodes d'extraction et le tampon utilisé pour la détermination du pH (Whitaker, 1994). Le pH optimal est également soumis à des changements en présence d'agents activateurs tels que le SDS (Marques *et al.*, 1995). L'état de protonation des groupes fonctionnels d'acides aminés et des cofacteurs impliqués dans la réaction enzymatique affecte la structure tridimensionnelle et le comportement de l'enzyme. L'inversement de l'état de

protonation de l'enzyme peut endommager irréversiblement sa structure (Bisswanger, 2014). De plus, la protonation est capable d'empêcher la liaison des substrats au site actif (Purich, 1983; Whitaker, 1994). Ces changements induits par le pH modifient l'activité enzymatique de la PPO, et ils peuvent dans certaines conditions extrêmes dénaturer l'enzyme et supprimer son activité (Janovitz-Klapp *et al.*, 1989; Valero et García-Carmona, 1998). Le pH optimal de la PPO varie beaucoup selon la source végétale mais il se situe généralement dans la plage allant de 4,0 à 8,0 (Yoruk et Marshall, 2003; Jukanti, 2017).

3.7.3. Spécificité de substrat

La PPO diphénolase est généralement la forme la plus répandue chez les plantes supérieures. Cependant, dans certains cas, l'absence d'activité monophénolase est attribuée à la latence, et elle peut être détectée après activation par SDS (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1990; Jiménez et García-Carmona, 1996) ou par digestion protéolytique limitée (Laveda *et al.*, 2001). La caractérisation biochimique de la PPO de différents fruits a révélé des affinités différentes pour les substrats phénoliques, en fonction de la source de l'enzyme. La plupart des PPOs présentent une grande affinité pour les *o*-diphénols simples tels que le catéchol, et le 4-méthylcatéchol. Cependant, certaines PPOs présentent plus d'affinité pour les triphénols et les polyphénols tels que le pyrogallol et la catéchine (Tableau 04).

Tableau 04. Substrats des PPOs de quelques fruits.

Fruits	Substrats (par ordre d'affinité)	Références
Pêche	Catéchol, Catéchine, Dopamine, 4-Méthylcatéchol, Acide chlorogénique.	(Wong <i>et al.</i> , 1971)
Pomme	4-Méthylcatéchol, Chlorogenic acid, Pyrogallol, Catéchol, L-Dopa, Acide caffeique.	(Marrufo-Hernández <i>et al.</i> , 2017)
Banane	Dopamine, Catéchol, Catéchine, Acide chlorogénique, epicatechin, L-Dopa, pyrogallol, Acide caffeique.	(Yang <i>et al.</i> , 2000)
Raisin	Acide caffeique, 4-Méthylcatéchol, Acide chlorogénique, Catéchine, Catéchol.	(Lee <i>et al.</i> , 1983)
Datte	Catéchol, 4-Méthylcatéchol, Acide chlorogénique, Acide caffeique, Dopamine, L-Dopa.	(Sachde <i>et al.</i> , 1988)
Litchi	Pyrogallol, Catéchol, 4-Méthylcatéchol.	(Yue-Ming <i>et al.</i> , 1997)
Salak	Catéchol, 4-Méthylcatéchol, Epicatechin, L-Dopa, Acide chlorogénique, Acide caffeique.	(Zaini <i>et al.</i> , 2013)
Myrtille	Catéchol, 4-Méthylcatéchol, L-Dopa, Dopamine, Pyrogallol.	(Siddiq et Dolan, 2017)
Mangue	Pyrogallol, Catéchol, 4-Méthylcatéchol.	(Palma-Orozco <i>et al.</i> , 2014)

Par ailleurs, le degré d'assombrissement dépend du type de substrat, les catéchines monomères et les procyanidines dimères provoquent un brunissement plus intense que les autres composés phénoliques (Lee et Jaworski, 1988; Murata *et al.*, 1995).

3.8. Produits de la réaction

Le brunissement enzymatique conduit à la formation d'*o*-quinones, très instables et réactifs, qui peuvent se polymériser spontanément pour former des composés de haut poids moléculaire et des pigments bruns, ou se condenser avec les acides aminés et les protéines cellulaires (McEvily *et al.*, 1992; Mayer, 2006). Les *o*-quinones générées sont elles-mêmes colorées. Mais la décoloration brune typique des produits frais ou transformés est produite par les *o*-quinones lors de leur auto-polymérisation ultérieure ou de leur réaction avec différents groupes fonctionnels (Feillet *et al.*, 2000; Anderson et Morris, 2003). Les *o*-quinones peuvent réagir avec autres composés phénoliques (Singleton, 1987). Cette réaction entraîne la formation d'oligomères avec des couleurs totalement différentes (Singleton, 1987; Cheynier et Moutounet, 1992). Les couleurs varient en fonction des phénols substrats (catéchine, jaune; DOPA, rose; acide chlorogénique, jaune orange), du pH et des facteurs environnementaux (Singleton, 1987; Taylor et Clydesdale, 1987; Rouet-Mayer *et al.*, 1990). Il est intéressant de noter que les *o*-quinones peuvent également réagir avec des composés non phénoliques. De même, la nature et la teneur en phénols non substrats est aussi déterminante dans l'intensité du brunissement. En effet, ces derniers peuvent participer aux réactions secondaires couplées avec les quinones (Richard-Forget et Gaillard, 1997).

4. Contrôle du brunissement enzymatique

4.1. Généralités

Le taux de brunissement enzymatique est, principalement déterminé par l'activité PPO (Vomas-Vigyazo, 1981). Le contrôle de cette réaction constitue l'un des principaux défis de l'industrie agroalimentaire (Marshall *et al.*, 2000; Mesquita et Queiroz, 2013). L'inactivation de la PPO est nécessaire pour minimiser les pertes causées par le brunissement. En théorie, on peut prévenir le brunissement catalysé par la PPO en inactivant l'enzyme, en excluant ou en éliminant l'un des deux substrats (O₂ et phénols), en abaissant le pH à 2 unités ou plus en dessous du pH optimal, en ajoutant des composés qui inhibent la PPO ou empêchent la formation des mélanines (Whitaker et Lee, 1995). Le traitement thermique et l'addition d'agents anti-brunissement sont généralement les techniques les plus appliquées pour inhiber/inactiver la PPO (Queiroz *et al.*, 2008). Les différentes méthodes de contrôle du brunissement enzymatique peuvent affecter l'enzyme, le substrat ou le produit de la réaction, bien que, dans certains cas, deux ou trois cibles puissent être affectées simultanément par la même méthode. De plus, l'inhibition de la PPO peut être réversible ou irréversible. Ce dernier cas est souvent obtenu par traitement physique (chaleur), alors que les produits chimiques peuvent agir d'une manière ou d'une autre (Nicolas *et al.*, 1994). L'utilisation d'inhibiteurs de brunissement dans la transformation des aliments est limitée par des exigences particulières tels que la non-toxicité, la salubrité, l'effet sur le goût, la texture, etc. (Vomas-Vigyazo, 1981). Plusieurs études ont été consacrées à ce sujet, afin de développer des techniques d'inhibitions efficaces et pratiques. Ces techniques peuvent être divisées en méthodes physiques et chimiques.

4.2. Méthodes physiques

4.2.1. Traitement thermique

Les traitements thermiques sont largement utilisés pour stabiliser les aliments en raison de leur capacité à détruire les micro-organismes et à inactiver les enzymes. Le blanchiment est la méthode la plus utilisée pour inactiver les enzymes végétales (Marshall *et al.*, 2000). L'inactivation de la PPO ainsi que d'autres enzymes de détérioration peut être obtenue en soumettant le produit alimentaire à des températures élevées pendant une durée suffisante pour dénaturer les protéines. L'inactivation complète de la PPO lors du blanchiment varie considérablement en fonction du végétal à traiter, mais souvent un blanchiment à 100 °C pendant 3 min ou à 94 °C pendant 5 min apparaît suffisant pour limiter le brunissement

enzymatique des végétaux (Ma *et al.*, 1992). Le blanchiment provoque la dénaturation des enzymes, mais également la destruction des nutriments thermosensibles. Il entraîne des pertes en vitamines, glucides et autres modifications indésirables de saveur, de couleur et de texture (Lado et Yousef, 2002). De même, les grandes quantités d'eau et d'énergie nécessaires, associées aux problèmes d'élimination des déchets, rendent le blanchiment techniquement peu attrayant (Jukanti, 2017). Plusieurs autres méthodes ont été essayées pour inhiber l'activité PPO et éviter le brunissement des fruits (Lamikanra, 2002). Le chauffage par micro-ondes est l'une des méthodes alternatives. Les micro-ondes ont une profondeur de pénétration plus grande et une vitesse de chauffage plus rapide susceptible d'améliorer potentiellement la rétention des constituants thermolabiles dans les aliments (Heddleson et Doores, 1994).

4.2.2. Congélation

La congélation est un moyen efficace pour limiter le brunissement enzymatique. L'abaissement de la température durant la conservation induit une diminution marquée du brunissement enzymatique. Ainsi les changements de couleur sont pratiquement freinés à des températures de stockage -18 °C (Mesquita et Queiroz, 2013). A ces températures toutes les réactions enzymatiques sont bloquées. Les températures inférieures à -18°C sont utilisées pour la conservation de longue durée des aliments. Cependant la congélation nuit à la qualité organoleptique par modification de texture, elle fragilise les structures membranaires des cellules, ce qui favorise le brunissement lors et après la décongélation du produit (Brown, 1977; de Ancos *et al.*, 2000; Sahari *et al.*, 2004; Ceballos *et al.*, 2012).

4.2.3. Exclusion d'oxygène

L'élimination complète de l'oxygène est le moyen le plus satisfaisant pour contrôler l'oxydation phénolique catalysée par la PPO; cette méthode peut être appliquée en créant une barrière physique à la diffusion de l'oxygène, par exemple en trempant les fruits dans du sirop de sucre, en utilisant des emballages imperméables à l'oxygène ou des films comestibles (Baldwin *et al.*, 1995; Limbo et Piergiovanni, 2006), ou en utilisant une atmosphère inerte, comme le vide partiel ou les atmosphères pauvres en oxygène (Nicolas *et al.*, 1994). Les emballages sous atmosphère modifiée ont le potentiel de prolonger la durée de conservation des fruits et légumes, principalement en limitant les processus d'oxydation. L'exclusion d'oxygène est une technique limitée car le fruit ou le légume brunira lors de sa nouvelle exposition à l'air. De plus, l'élimination de l'oxygène des tissus de fruits ou de légumes peut

entraîner une anaérobiose (s'ils sont stockés pendant de longues périodes), ce qui entraîne la formation des métabolites anormaux et la dégradation des tissus (Mesquita et Queiroz, 2013).

4.2.4. Dioxyde de carbone supercritique

L'application du dioxyde de carbone supercritique implique une étape de pressurisation qui garantit la pénétration du gaz (CO₂) dans les cellules, suivie d'une décompression explosive qui provoque une expansion rapide du gaz dans les cellules. Ce qui entraîne la destruction physique de plusieurs macromolécules (Corwin et Shellhammer, 2002). Le dioxyde de carbone supercritique altère les structures secondaire et tertiaire des enzymes et provoque des changements conformationnels qui peuvent causer leur inactivation (Gui *et al.*, 2007). Le traitement avec le dioxyde de carbone diminue significativement l'activité PPO (Corwin et Shellhammer, 2002; Silva *et al.*, 2020). Cependant, l'utilisation de cette méthode ne permet pas une inactivation complète de la PPO (Niu *et al.*, 2010).

4.2.5. Traitement à haute pression

Le traitement à haute pression affecte la conformation des protéines et entraîne leur dénaturation, leur agrégation ou leur gélification (en fonction de l'enzyme, de la pression appliquée, de la température et de la durée du traitement) (Hendrickx *et al.*, 1998). En général, le traitement à haute pression est plus efficace à des pressions supérieures à 600 MPa (Bayındırlı *et al.*, 2006). Le traitement à haute pression est moins préjudiciable sur les composés alimentaires de faible masse moléculaire (caroténoïdes, polyphénols, vitamines, etc.) que les procédés thermiques, car les liaisons covalentes ne sont pas affectées par la pression (Butz *et al.*, 2003). Le traitement à haute pression peut être utilisé dans l'industrie alimentaire pour désactiver la PPO sans trop affecter la qualité nutritionnelle des fruits et légumes (Queiroz *et al.*, 2010).

4.2.6. Irradiation gamma

L'irradiation aux rayons gamma (γ) est un traitement physique impliquant une exposition directe des fruits et légumes à des électrons ou à des rayons électromagnétiques (Lacroix et Ouattara, 2000). Ce traitement est souvent utilisé pour prolonger la durée de conservation des fruits et des légumes. L'irradiation à faible dose (1 ou 2 kGy) est appliquée aux produits à base de fruits et légumes pour inactiver la PPO (Lu *et al.*, 2005; Latorre *et al.*, 2010;). Cependant, cette technique ne donne qu'une inhibition partielle de la PPO, où une activité PPO résiduelle est souvent détectée (Lu *et al.*, 2005).

4.2.7. Champ électrique pulsé

Le champ électrique pulsé est une technologie de conservation des aliments qui est destinée principalement à inactiver les microorganismes. Cette méthode consiste à introduire l'aliment dans une chambre contenant deux électrodes qui appliquent des impulsions haute tension pendant une courte durée (microsecondes). Ce traitement induit des modifications dans la structure secondaire des enzymes. La PPO a été trouvée sensible à ce traitement, et des pertes d'activité significative ont été rapportées (Zhong *et al.*, 2007). Cette technique a l'avantage de conserver les qualités et les propriétés physicochimiques et sensorielles de l'aliment (Martín-Belloso et Elez-Martínez, 2005). Cependant, elle est accompagnée d'une perte irréversible de la fonctionnalité des membranes cellulaires (Zhong *et al.*, 2005; Cserhalmi *et al.*, 2006).

4.2.8. Ultrasons

L'échographie, *via* les vibrations, provoque la lyse cellulaire et l'inactivation des enzymes. L'énergie de vibration produit des bulles de cavitation qui génèrent temporairement (après leur implosion) des points de pression et des température extrêmement élevées (Morris *et al.*, 2007). L'application des ultrasons seuls comme technique d'inhibition de la PPO n'a pas donné des résultats très satisfaisants et leur effet est limité. Cependant, ils sont plus efficaces lorsqu'ils sont combinés à d'autres méthodes d'inhibition, telles que la pression, la chaleur ou l'inhibition avec des méthodes chimiques (Jang *et al.*, 2009; Jang et Moon, 2011).

4.2.9. Autres techniques

D'autres techniques physiques peuvent minimiser ou stopper les réactions de brunissement enzymatiques telles que la lyophilisation (Duan *et al.*, 2016), l'ultrafiltration (Mohammad *et al.*, 2012), la photo inactivation avec des rayonnements ultraviolets (Shama et Alderson, 2005; Gómez *et al.*, 2010; Augusto *et al.*, 2015; Haddouche *et al.*, 2015), le traitement avec des lumières à haute intensité (Zhan *et al.*, 2012), l'application des revêtements organiques (Ojeda *et al.*, 2014), la thermo-sonication (Anaya-Esparza *et al.*, 2017) et le traitement avec des ondes électromagnétiques (Zhang *et al.*, 2018).

4.3. Méthodes chimiques

Les produits chimiques sont couramment utilisés pour lutter contre le brunissement enzymatique. Leur utilisation dans les produits alimentaires transformés est limitée aux composés non toxiques, sains et qui n'altèrent pas le goût et la saveur (McEvily *et al.*, 1992;

Sapers, 1993). Différents composés peuvent contrôler le brunissement enzymatique, ils sont classés en fonction du mécanisme d'inhibition en (McEvily *et al.*, 1992):

- Agents réducteurs (acide ascorbique et analogues, sulfites) ;
- Agents chélateurs (éthylènediaminetétraacétate, diéthylldithiocarbamate de sodium, et azoture de sodium);
- Agents complexants (cyclodextrines, chitosane);
- Acidulants (acide ascorbique, acide citrique, acide malique, acide phosphorique);
- Inhibiteurs d'enzymes (analogues de substrats, halogénures);
- Traitements enzymatiques

Dans de nombreux cas, il n'est pas facile de distinguer les différents mécanismes sous-jacents à l'action d'un inhibiteur de brunissement. De plus, certains inhibiteurs agissent sur la réaction enzymatique simultanément avec deux mécanismes ou plus (Acide ascorbique, sulfites) (Vomas-Vigyazo, 1981). De même, l'efficacité de certains inhibiteurs chimiques varie considérablement selon la source et le type de la PPO (Ferrar et Walker, 1996).

4.3.1. Agents réducteurs

Les agents réducteurs sont les composés les plus répandus et les plus utilisés comme inhibiteurs du brunissement enzymatique. Ils contrôlent le brunissement en empêchant l'accumulation d'*o*-quinones en les réduisant à leur état diphénolique d'origine ou en formant des produits incolores stables, empêchant ainsi la condensation non enzymatique des *o*-quinones en pigments perceptibles (Sapers et Miller, 1992; Nicolas *et al.*, 1994; Osuga *et al.*, 1994; Ashie *et al.*, 1996). Les composés réducteurs tels que les sulfites et l'acide ascorbique sont consommés au cours du processus d'inhibition et ne fournissent donc qu'une protection temporaire contre le brunissement, sauf s'ils sont utilisés à des concentrations élevées. Cependant, les composés réducteurs, piègeurs tels que la L-cystéine et le glutathion peuvent former avec les quinones des composés incolores stables, offrant ainsi une protection permanente tant qu'ils ne sont pas entièrement consommés (Vomas-Vigyazo, 1981).

Parmi les agents réducteurs, le dioxyde de soufre et les sulfites (sulfite de sodium, bisulfite de sodium ou métabisulfite de sodium) sont les inhibiteurs les plus puissants du brunissement enzymatique (McEvily *et al.*, 1992; Sapers, 1993; Whitaker et Lee, 1995). Les sulfates sont utilisés dans l'industrie des fruits et légumes en raison de leur efficacité et leur faible coût. Les sulfites inhibent les réactions de brunissement en interagissant avec les quinones, empêchant

leur polymérisation (Ashie *et al.*, 1996). Toutefois, en raison des effets néfastes des sulfites sur la santé (principalement les personnes asthmatiques), l'organisation mondiale de la santé a recommandé de limiter l'utilisation sulfites dans le traitement et la transformation des fruits et légumes (Queiroz *et al.*, 2008). La cystéine est un autre composé réducteur efficace contre le brunissement enzymatique. La cystéine réagit avec les *o*-quinones pour produire des composés stables et incolores (İyidoğan et Bayındırlı, 2004). Bien que la cystéine prévienne efficacement le brunissement à des concentrations très faibles, comprises entre 1 et 4 mM (Özoğlu et Bayındırlı, 2002; İyidoğan et Bayındırlı, 2004), son utilisation est limitée car elle dégage une odeur indésirable, même à de faibles concentrations (Jukanti, 2017).

L'acide ascorbique (vitamine C) est la meilleure alternative disponible aux sulfites (Yoruk et Marshall, 2003). Ce composé est considéré comme l'additif alimentaire le moins toxique, de même, il n'a pas d'arôme détectable et il n'est pas corrosif. Il réduit les quinones en diphénols avant qu'elles subissent des réactions secondaires responsables du brunissement. Il réduit également l'activité PPO en diminuant le pH du milieu réactionnel (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005). L'acide ascorbique est probablement le composé le plus utilisé, même si son effet n'est que temporaire en raison de son oxydation irréversible (Mesquita et Queiroz, 2013).

4.3.2. Acidifiants

L'application d'acides pour contrôler le brunissement enzymatique est largement utilisée. Les acides utilisés sont généralement ceux qu'on trouve naturellement dans les tissus végétaux, notamment les acides : citrique, malique, phosphorique et ascorbique. Ces acides abaissent le pH à ≤ 3 , réduisant considérablement l'activité enzymatique (Park et Luh, 1985; Eskin, 1990; Osuga *et al.*, 1994). Le pH optimal de la plupart des PPOs se situe entre 4,0 et 7,0. Ainsi, cette méthode est basée sur le fait d'abaisser le pH des tissus à une valeur loin du pH optimal, de réduire ou retarder le développement du brunissement enzymatique (Mesquita et Queiroz, 2013).

4.3.3. Agents chélateurs

Comme la PPO est une métalloprotéine dont le groupe prosthétique est le cuivre, elle peut être inhibée par des agents chélateurs de métaux tels que le cyanure, le monoxyde de carbone et l'éthylène-diamine-tétra-acétate (EDTA). L'acide citrique et l'acide ascorbique peuvent également agir directement sur l'enzyme en se chélatant avec son groupe prosthétique. De même, certains agents chélateurs peuvent réagir avec les quinones formées (Vomas-Vigyazo, 1981; McEvily *et al.*, 1992; Osuga *et al.*, 1994).

4.3.4. Agents complexants

La complexation des substrats phénoliques est un autre moyen pour inhiber les réactions de brunissement enzymatique. Les polymères adsorbants tels que les cyclodextrines, la polyvinyl-pyrrolidone (PVP) et les chalcones peuvent complexer les composés phénoliques et les isoler de la PPO (Vomas-Vigyazo, 1981; McEvily *et al.*, 1992). Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques produites à partir d'amidon par hydrolyse enzymatique. Ces glucides macrocycliques dotés de cavités internes apolaires peuvent former des complexes avec de nombreux composés y compris les substrats de la PPO (Irwin *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2002).

4.3.5. Inhibiteurs de l'enzyme

Les inhibiteurs de l'enzyme les plus utilisés sont généralement des composés qui possèdent des structures chimiques similaires aux *o*-diphénols mais qui ne sont pas des substrats de la PPO. Ainsi, ils peuvent se lier à la PPO et agir comme des inhibiteurs compétitifs. Parmi ces inhibiteurs on trouve les acides carboxyliques benzoïques et cinnamiques et leurs dérivés (Walker, 1976; Kermasha *et al.*, 1993), l'acide férulique (Nirmal et Benjakul, 2009) et les résorcinols substitués, tels que le 4-hexylrésorcinol (İyidoğan et Bayındırlı, 2004; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2007). Ces composés modifient la conformation de l'enzyme et empêchent la liaison du substrat à l'enzyme par un empêchement stérique. La PPO peut aussi être inhibée par des alcools aliphatiques, des détergents, des sels, des métaux et de peptides (McEvily *et al.*, 1992).

4.3.6. Traitements enzymatiques

L'inhibition de la PPO par des enzymes est une approche peu étudiée. Les enzymes testées comme inhibiteurs de brunissement enzymatique sont ; les O-méthyl-transférases et les protéases. L'O-méthyl-transférase méthyle les polyphénols en position 3, convertissant les substrats en inhibiteurs, par exemple : l'acide caféique en acide férulique (Finkle et Nelson, 1963). Cette enzyme est active à pH alcalin, tandis que la plupart des fruits sont légèrement acides (Vomas-Vigyazo, 1981). La PPO peut également être inactivée par digestion, si elle est soumise à l'action des enzymes protéolytiques. La dégradation de la PPO par les protéases induira leur inactivation. La ficine, la papaïne, l'actinidine et la bromélaïne ont été trouvées efficaces comme inhibiteurs du brunissement enzymatique (Labuza *et al.*, 1992; McEvily *et al.*, 1992; Lozano-de-Gonzalez *et al.*, 1993). Les protéases doivent être actives dans les pHs acides et menues d'une forte activité protéolytique. Cependant, dans certaines conditions les protéases peuvent provoquer l'activation de la PPO (Robinson et Dry, 1992).

5. Protéases végétales

5.1. Généralités

Les protéases sont un groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Elles sont également appelées enzymes protéolytiques ou protéinases (Dunn *et al.*, 1989; Barrett, 2000). Ces enzymes sont largement distribuées chez les plantes, les animaux et les microorganismes (Turk, 1999). Elles ont une grande importance dans l'industrie agroalimentaire, où près de la moitié des protéases commercialisées sont utilisées dans la transformation des aliments (Grzonka *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013; Mazorra-Manzano *et al.*, 2018). Chez les plantes, les protéases sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques tels que le renouvellement protéique, la dégradation des protéines mal repliées, la sénescence, la germination, les mécanismes de défense, la mort cellulaire programmée, etc. (Beers *et al.*, 2000; Estelle, 2001; Schaller, 2004).

Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tous effets désastreux (Khan et James, 1998). La plupart des protéases d'origine végétale sont des protéases à cystéine (Rawlings *et al.*, 2016). Les enzymes protéolytiques dérivées de plantes sont très attrayantes car elles peuvent être actives dans une large plage de température et de pH (Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011)

5.2. Classification

Les protéases font partie de la classe des hydrolases et elles forment elles mêmes un groupe très diversifié (Barrett, 1999). Ces enzymes se différencient dans la structure, le mode d'action, la spécificité, l'origine et la nature de site actif. Ainsi, plusieurs classifications peuvent être considérées (Dunn *et al.*, 1989; Barrett, 1999, 2000). La classification la plus rapportée est celle qui se base sur le mode d'action et la spécificité des protéases. Les protéases peuvent catalysées le clivage des liaisons peptidiques terminales (exopeptidases) ou couper à l'intérieur de la chaîne peptidique (endopeptidases). De même, les exopeptidases sont différenciées en fonction de leur spécificité en aminopeptidases ; capables de cliver les liaisons peptidiques à l'extrémité N-terminale, et carboxypeptidases ; capables de scinder les liaisons peptidiques à l'extrémité C-terminale (Barrett, 1999). Par ailleurs, les protéases sont aussi classées selon leur mécanisme catalytique, en se basant sur la nature du site actif de l'enzyme en : protéases à sérine, protéases à cystéine, protéases à thréonine, protéases aspartiques, protéases glutamiques et métallo protéases (López-Otín and Bond, 2008).

Chez les plantes, la majorité des protéases est caractérisée comme des endopeptidases, qui appartient principalement aux groupes : protéases à cystéine, protéases à serine, protéases aspartiques et métallo-protéases (Beynon et Bond, 2001; Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011).

5.2.1. Protéases à sérine

Les protéases à serine sont des enzymes neutres hébergeant un résidu serine dans leur site catalytique (Kraut, 1977; Turk, 1999; Palma *et al.*, 2002). Elles constituent l'un des groupes d'enzymes protéolytiques les plus importants chez les eucaryotes et les procaryotes (Barrett, 1999; Turk, 1999). Les protéases à serine sont présentes dans presque toutes les parties de la plante, mais plus abondantes dans les fruits (Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011). De nombreuses protéases à serine de plantes ont été purifiées et caractérisées telles que la kexine (Seidah *et al.*, 1998) et la cucumisine (Yamagata *et al.*, 1994).

5.2.2. Protéases à cystéine

Les protéases à cystéine, également connues sous le nom de thiol protéases sont le groupe de protéases végétales le plus étudié. Le site actif de ces enzymes est caractérisé par la présence d'un résidu cystéine dans le site catalytique. Les protéases à cystéine sont présentes chez tous les organismes vivants (Barrett, 1999, 2000; Palma *et al.*, 2002). Ainsi, plus de vingt familles de protéases à cystéine ont été décrites, dont beaucoup ont été caractérisées chez les végétaux telles que, la papaïne, la bromélaïne, la caricaïne, l'actinidine, la ficine, la calotropaine, l'aleuraine, etc. (Palma *et al.*, 2002; Grzonka *et al.*, 2007). Les protéases à cystéine nécessitent un environnement plutôt réducteur et acide pour être actives.

5.2.3. Protéases à acide spartique

Les protéases à acide aspartique sont caractérisées par la présence de deux résidus aspartiques au niveau du site actif, qui sont responsables de l'activité catalytique de l'enzyme. Les protéases aspartiques sont plus actifs à pH acide et elles ont une spécificité préférentielle de clivage entre les résidus d'acides aminés hydrophobes (Domingos *et al.*, 2000). Les protéases aspartiques végétales partagent des similarités structurelles et réactionnelles significatives avec les protéases aspartiques isolées des mammifères telles que la pepsine et la rénine. Parmi les protéases aspartiques les plus étudiées chez les plantes, on cite la cardosine, la phytepsine et la chlapsine (Simões et Faro, 2004).

5.2.4. Métallo-protéases

Les métallo-protéases végétales sont moins connues que les autres groupes de protéases. La plupart des enzymes contiennent un cation divalent, le plus souvent le Zn, bien que le cobalt ou le manganèse puissent également être présents (Bond et Butler, 1987). Parmi les différents types de protéases, les métallo-protéases sont les plus diverses en termes de structure et de fonction. Cependant, à ce jour, très peu de ces enzymes ont été caractérisées (Schaller, 2004). Chez les plantes, les protéases les mieux étudiées de cette classe sont les métallo-protéases matricielles, qui sont caractérisées par la présence d'un ion Zn^{2+} lié à 3 résidus histidine (Flinn, 2009; Marino et Funk, 2012).

5.3. Papaïne

La papaïne (EC 3.4.22.2) est la protéase à cystéine la plus connue. Elle a été isolée la première fois en 1879 à partir des fruits de *Carica papaya* L. Elle est également la première protéase pour laquelle une structure cristallographique a été déterminée (Drenth *et al.*, 1968; Kamphuis *et al.*, 1984). Le latex de papaye contient au moins quatre protéases à cystéine, dont la papaïne (Baines et Brocklehurst, 1979). La papaïne est composée de 212 acides aminés avec un poids moléculaire de 23,4 kDa (Mitchel *et al.*, 1970). Sa structure tridimensionnelle consiste en deux domaines structuraux distincts, séparés par une fente, qui englobe le site actif. Cette structure est stabilisée par la présence de trois ponts disulfures (Edwin and Jagannadham, 2000). L'activité optimale de la papaïne se produit à un pH de 5,8–7,0 et à une température de 50–57 °C, lorsque la caséine est utilisée comme substrat (Edwin et Jagannadham, 2000; Grzonka *et al.*, 2007). Elle coupe préférentiellement les liaisons peptidiques impliquant la phénylalanine et les acides aminés basiques, en particulier l'arginine et la lysine (Menard *et al.*, 1990). Cette enzyme est extrêmement stable par rapport à d'autres protéases, elle est active dans un intervalle de température de 10-90 °C et dans un intervalle de pH de 3,5 et 8,0 (Edwin et Jagannadham, 2000).

5.4. Bromélaïne

Le nom «bromélaïne» s'appliquait au mélange de protéases trouvé dans la tige et le fruit de l'ananas (*Ananas comosus* L). La protéase majeure présente dans la tige est appelée «bromélaïne de tige», tandis que la protéase majeure présente dans le fruit est dénommée «bromélaïne de fruit». La bromélaïne de fruit (EC 3.4.22.33), la principale endopeptidase présente dans le jus d'ananas, est caractérisée par un poids moléculaire de 26 kDa, un pH optimal de 3 à 8 et une température optimale entre 37 et 70 °C (Lopes *et al.*, 2009; Silvestre *et*

al., 2012). La bromélaïne de tige (EC 3.4.22.32) est une glycoprotéine composée de 212 acides aminés et un groupe prosthétique d'hydrate de carbone (Murachi et Neurath, 1960; Yasuda *et al.*, 1970). Elle est caractérisée par un poids moléculaire de 24,5 kDa, un pH optimal de 6 à 8,5 et une température optimale entre 50 et 60 °C (Grzonka *et al.*, 2007).

5.5. Ficine

La ficine (EC 3.4.22.3) est le nom des endopeptidases à cystéine isolées à partir de latex du genre *Ficus* (*F. glabrata*, *F. carica* et *F. elastica*). Le latex contient de nombreuses enzymes protéolytiques, regroupées sous le terme général de ficine. Le poids moléculaire de la ficine est entre 23 et 27 kDa (Devaraj *et al.*, 2008; Baeyens-Volant *et al.*, 2015; Homaei *et al.*, 2017). La ficine est active dans un intervalle de pH entre 4 et 9 avec un maximum d'activité entre 5 et 7, la température optimale est comprise entre 40 et 60 °C (Devaraj *et al.*, 2008). La ficine est composée de 210 résidus d'acides aminés (Husain et Lowe, 1970), dont le site actif est constitué principalement de deux acides aminés : la cystéine et l'histidine (Friedenson et Liener, 1972). Bien que, la ficine hydrolyse plusieurs liaisons peptidiques, elle clive préférentiellement les liaisons peptidiques au niveau de résidus : alanine, glycine, leucine, valine et les résidus d'acide aminé aromatique tels que la tyrosine et la phénylalanine (Englund *et al.*, 1968; Kortt *et al.*, 1974).

5.6. Calotropaine

La calotropaine est une endopeptidase à cystéine extraite à partir de latex des plantes du genre *Calotropis* (*C. procea*, *C. gigantea*) (Dubey et Jagannadham, 2003). Par comparaison à d'autres protéases à cystéine végétales (papaïne, bromélaïne et ficine), seulement quelques travaux ont été consacrés à la purification et la caractérisation de la calotropaine. Le latex contient au minimum 5 protéases (Pal et Sinha, 1980). La calotropine est une enzyme protéolytique hautement active avec un poids moléculaire de 24 kDa (Sengupta *et al.*, 1984). Elle est caractérisée par un pH optimum entre 4 et 8 et une température optimale entre 55 et 70 °C (Abraham et Joshi, 1979; Pal et Sinha, 1980). La calotropaine est composée de 210 résidus d'acides aminés et son site actif est constitué de 4 résidus d'acides aminés : cystéine, histidine, asparagine et tryptophane (Pal et Sinha, 1980; Heinemann *et al.*, 1982). La calotropaine hydrolyse de multiples liaisons peptidiques, cependant, les plus sensibles sont celles qui contiennent des résidus d'acides aminés: serine, alanine et glycine (Sengupta *et al.*, 1984).

5.7. Utilisation en agroalimentaire

Les protéases occupent la première place sur le marché mondial des enzymes (Leary *et al.*, 2009). Les préparations enzymatiques à partir d'extraits de plantes sont utilisées dans les procédés industriels depuis longtemps, avant même que l'on en sache beaucoup sur la nature et les propriétés des enzymes (Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011). En fait, la protéolyse modifie les propriétés chimiques, physiques, biologiques et immunologiques des protéines (Li *et al.*, 2013). Ainsi cette caractéristique peut être utilisée pour modifier les produits alimentaires. L'hydrolyse des protéines alimentaires, est réalisée pour diverses raisons: amélioration des caractéristiques nutritionnelles, ralentissement de la détérioration, modification de différentes propriétés fonctionnelles (solubilité, moussage, coagulation et capacités émulsifiantes), prévention des interactions indésirables, modification des arômes et odeurs et élimination des facteurs toxiques (Uhlig, 1998; Palma *et al.*, 2002; Grzonka *et al.*, 2007).

Les protéases de plantes, principalement les protéases à cystéine ont une importance commerciale considérable en raison de leur forte activité protéolytique sur une large gamme de substrats protéiques (Grzonka *et al.*, 2007). Des protéases telles que la papaïne, la bromélaïne et la ficine sont utilisées dans différents processus industriels (Uhlig, 1998). Certaines de ces protéases sont utilisées en fromagerie comme des agents de coagulation (Mazorra-Manzano *et al.*, 2018), en boissons afin de préparer des hydrolysats de protéines solubles (Kankanamge *et al.*, 2015), en viande comme agents d'attendrissement pour ramollir les fibre musculaire (Bailey et Light, 1989; Maqsood *et al.*, 2018), en boulangerie pour hydrolyser complètement ou partiellement le gluten (Tanabe *et al.*, 1996). Elles sont utilisées aussi pour la production d'émulsifiants et d'acides aminés essentiels tels que la lysine (Rao *et al.*, 1998; Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011). De même, les protéases à cystéine, en particulier la papaïne et la bromélaïne, sont largement utilisées pour préparer des hydrolysats de protéines avec des propriétés gustatives et nutritionnelles améliorées. L'hydrolyse des protéines du lait réduit les propriétés allergènes des produits laitiers. De plus, l'hydrolyse enzymatique est fortement préférée aux méthodes chimiques car elle donne des hydrolysats contenant des mélanges de peptides bien définis et évite la destruction des acides aminés de la série L et la formation de substances toxiques et des peptides amères (Grzonka *et al.*, 2007).

*Partie II. Matériel et
méthodes*

1. Démarche expérimentale

Nous rappelons que l'objectif de ce travail est de purifier, caractériser et inhiber la polyphénol-oxydase d'abricot (*PaPPO*). La caractérisation de la *PaPPO* est essentielle pour comprendre ses propriétés biochimiques et moléculaires, qui sont à leur tour, nécessaires pour établir les conditions d'inhibition de la *PaPPO*. Par ailleurs, une bonne caractérisation exige l'utilisation d'une enzyme pure. Ainsi, afin d'atteindre ces objectifs nous avons adopté une démarche expérimentale dans laquelle nous avons d'abord purifié, puis caractérisé la *PaPPO* d'abricot avant d'entamer la partie inhibition. Cette démarche expérimentale est représentée dans la figure 08.

De ce fait, la première partie consiste à extraire la *PaPPO* et à développer une stratégie de purification afin d'obtenir une enzyme pure et active. Dans la partie caractérisation, la majorité des paramètres étudiés sont des paramètres standards essentiels pour bien caractériser une enzyme et fixer ses conditions réactionnelles, tels que le poids moléculaire, le pH optimal, la température optimale, la cinétique enzymatique, etc. Cependant, d'autres paramètres sont plus au moins spécifiques à la polyphénol-oxydase (PPO) tels que l'activation et l'effet du dodécylsulfate de sodium (SDS). Ces paramètres sont en relation directe avec la latence de la PPO, ainsi ils permettent de distinguer le type de la PPO présente dans l'abricot.

Concernant la partie inhibition, et comme nous l'avons brièvement expliqué dans l'introduction, notre approche repose sur une combinaison de deux inhibiteurs (protéases et acide ascorbique) qui agissent différemment sur la *PaPPO*. Nous supposons que les protéases sélectionnées (papaïne, calotropaine, ficine et bromélaïne) peuvent inhiber le brunissement enzymatique en digérant la *PaPPO*, entraînant la perte de sa structure primaire (inhibition irréversible ou inactivation). Cependant, les protéases nécessitent un temps relativement variable afin de digérer leur substrat (*PaPPO*). D'autre part, l'AA (acide ascorbique) est un composé réducteur qui inhibe le brunissement enzymatique indirectement en réduisant les produits de l'oxydation enzymatique (quinones) à leur état d'origine (diphénols). C'est l'antioxydant le plus efficace et le moins toxique utilisé dans l'industrie alimentaire. Cependant, une fois qu'il est oxydé (par les quinones), les réactions de brunissement peuvent se manifester de nouveau dans l'aliment (Mellidou *et al.*, 2017). Ainsi, dans ce travail, nous avons combiné ces deux inhibiteurs (protéases et acide ascorbique) après avoir étudié leurs effets séparément, de manière à ce que l'acide ascorbique inhibe le brunissement enzymatique pendant le temps nécessaire aux protéases pour inactiver complètement la *PaPPO*.

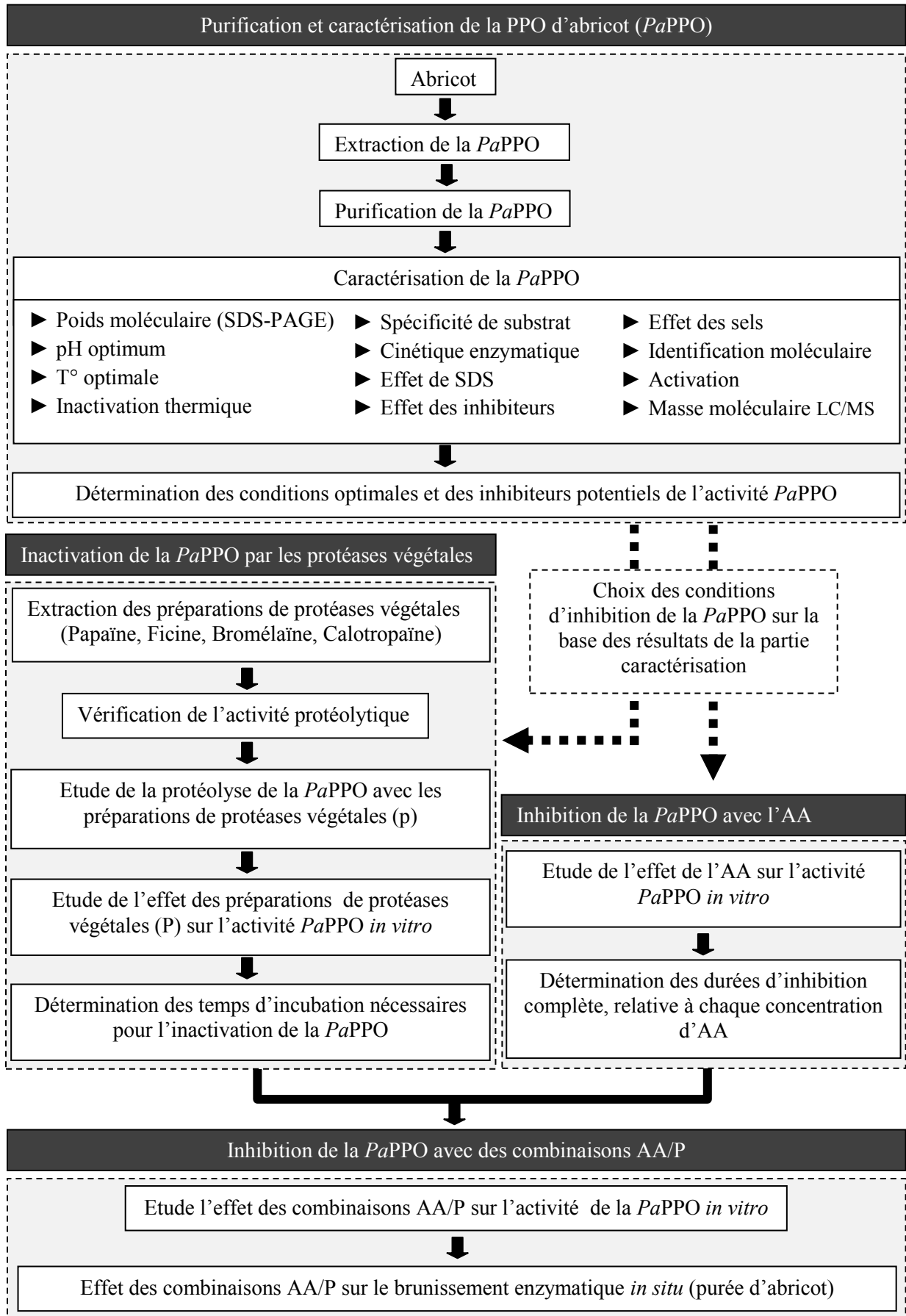


Figure 08. Schéma descriptif de la démarche expérimentale optée.

2. Collaboration scientifique

Afin d'atteindre les objectifs tracés et de mettre en marche la démarche adoptée, ce travail est une collaboration scientifique entre le laboratoire de recherche Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL) de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A), Université Frères Mentouri Constantine 1 (U.F.M.C.1) et le laboratoire de l'Institut de Chimie Biophysique, Faculté de Chimie, Université de Vienne. Ainsi, ce travail est réalisé grâce à la contribution scientifique, financière et technique des deux pays (l'Algérie et l'Autriche):

Côté Algérien :

- I.N.A.T.A.A. Université Frères Mentouri Constantine 1(U.F.M.C.1) ;
- Programme National Exceptionnel (PNE), Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique (MESRS).

Côté Autrichien :

- Institut de Chimie Biophysique, Faculté de Chimie, Université de Vienne ;
- Fonds Autrichien pour la Promotion de la Recherche Scientifique (FWF), projet : P25217 et 29144) ;
- Ministère Fédéral Autrichien des Sciences, de la Recherche et de l'Economie (BMWFV).

3. Matière première

3.1. Abricots

Les échantillons d'abricots utilisés dans cette étude sont collectés durant les deux premières semaines du mois de juin des années 2016, 2017 et 2018 au niveau de la Wilaya de M'sila connue pour ses grands vergers d'abricots. Notre choix est orienté vers l'une des variétés d'abricots les plus prépondérantes et les plus appréciées par le consommateur (*Bulida*). Cette variété est caractérisée par un arbre très productif, un fruit gros avec une chair ferme, parfumée et juteuse. C'est l'une des meilleures variétés hâtives (Figure 09). Les abricots sont prélevés au hasard de plusieurs arbres du même verger à diverses hauteurs et orientations. Ils sont récoltés à pleine maturité commerciale, lavés, dénoyautés et conservés à 4 °C jusqu'à utilisation. Cependant, les abricots destinés à l'extraction de la PPO ont été lyophilisés, puis conservés à - 25 °C jusqu'à utilisation. La lyophilisation est réalisée pendant 24 heures, dans une enceinte réfrigérée à 3 étagères (plateaux), sur lesquelles les échantillons sont repartis.

Les paramètres de lyophilisation sont : une température de $- 54\text{ }^{\circ}\text{C}$ et une pression de 0,015 mbar. Les abricots frais ont soumis à des mesures de leur humidité, ° Brix, pH, ainsi que leur teneur en composés phénoliques.



Figure 09. Abricots (variété *Bulida*).

3.2. Matière première des préparations de protéases végétales

Les préparations de protéases végétales : ficine et calotropaine ont été extraites à partir du latex récolté manuellement. Le latex de *Calotropis procera* (le pommier de Sodome) a été récolté à partir des tiges durant le mois de mars 2017 dans la wilaya d'Adrar (Sud Algérien) et celui de *Ficus carica* (le figuier) a été récolté à partir des fruits immatures du même arbre durant le mois de juillet 2017 dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Est Algérien). Les latex ont été récoltés dans des tubes propres et stockés à $- 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à extraction. Par ailleurs, les poudres lyophilisées des préparations de protéases végétales, papaïne : à partir de latex de *Carica papaya* (le papayer) et de bromélaïne de tige : à partir d'*Ananas comosus* (l'ananas) ont été achetées auprès de Roth (Vienne, Autriche).

4. Analyses physico-chimiques des abricots frais

4.1. Détermination de la teneur en eau (NF V 05-108, 1970)

Sécher 1 g de la purée d'abricot frais à une température de $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dans une étuve ventilée jusqu'à la stabilisation du poids final. La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation. La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante:

$$H\% = (M1 - M2)/P \times 100$$

avec :

$H\%$: humidité

$M1$: masse en g de la capsule + matière fraîche avant séchage.

M_2 : masse en g de l'ensemble après séchage à 105°C.

P : masse en g de la prise d'essai.

4.2. Détermination du pH (NF V 05-108, 1970)

Le pH est un d'indicateur de qualité biologique et chimique, sa mesure nous donne une idée sur la qualité du produit à analyser. La mesure du pH est basée sur la détermination en unité pH de la différence de potentiel existant entre deux électrodes en verre plongées dans la purée d'abricots.

4.3. Détermination du Brix

Le degré Brix de la purée d'abricot est déterminé avec un réfractomètre portable (Brix FG-108). La lecture est faite en plaçant une goutte de la purée sur la plaque de charnière de l'instrument, face à la lumière. La valeur de Brix est lue à travers l'œil de l'instrument. Il est essentiel de nettoyer le réfractomètre avec de l'eau distillée après chaque lecture pour s'assurer qu'aucune particule ne reste sur la plaque articulée (Witherspoon et Jackson, 1995).

5. Quantification des composés phénoliques

5.1. Extraction

L'extraction des polyphénols a été réalisée selon le protocole proposé par Ali *et al.* (2011). 5g d'abricots sont homogénéisés avec 25 ml de méthanol (80%, v/v) puis clarifiés par centrifugation (SEGMA 3-30K) à 10 000 ×g pendant 15 min. Le surnageant a été récupéré et filtré à l'aide de papier Wattman N°1, afin d'obtenir l'extrait phénolique.

5.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé avec la méthode de Folin-Ciocalteu. Le principe de cette méthode est basé sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits bleus (Sochor *et al.*, 2010). Pratiquement, le protocole de dosage suivi est celui décrit par Singleton *et al.*, (1999). 0,5 ml de l'extrait phénolique est dilué avec 5 ml d'eau distillée, puis 0,5 ml de réactif de Folin–Ciocalteu (1 N) est ajouté. Après 3 minutes, 0,5 ml de carbonate de sodium (20%, p/v) ont été ajoutés, puis le mélange est laissé à l'obscurité pendant 1 h à température ambiante. La lecture d'absorbance a été effectuée au spectrophotomètre (SHIMADZU 1800) à 765 nm. La concentration en composés phénoliques totaux de l'extrait a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage préparée avec de l'acide gallique

comme standard (Annexe I). Ainsi, les résultats sont exprimés en mg d'équivalents d'acide gallique (mg EAG) pour 100 g de matière fraîche (MF) et sèche (MS).

5.3. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes contiennent des groupements hydroxyles (OH) libres, qui forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ces complexes peuvent être dosés par spectrophotométrie UV-Visible (Chang *et al.*, 2002). Ainsi, l'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans l'extrait phénolique a été réalisée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Bahorun *et al.*, 1996). 1 ml de la solution d'extrait a été ajouté à 1 ml de solution de chlorure d'aluminium 2% (préparée dans du méthanol). Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue au spectrophotomètre à 430 nm. La concentration des flavonoïdes a été déterminée en se référant à une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (Annexe I) et les résultats sont exprimés en mg d'équivalents de quercétine (mg EQ) par 100 g de matière fraîche (MF) et sèche (MS).

6. Extraction des enzymes

6.1. Extraction de la PaPPO

La PaPPO a été extraite en suivant le protocole proposé par Ünal et Şener (2016) avec quelques modifications. 100 g d'abricots lyophilisés ont été homogénéisés pendant 2 min avec 500 ml d'acétone ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) froide ($-25\text{ }^\circ\text{C}$) contenant 4 g de polyéthylène glycol (PEG 4000). Le mélange a été filtré à travers un papier filtre (papier Wattman N°1) et le résidu a été ensuite extrait de nouveau plusieurs fois avec 300 ml d'acétone froide, jusqu'à l'obtention d'une pâte blanche. Cette dernière a été séchée pendant une nuit à température ambiante afin d'obtenir une poudre sèche. La poudre résultante a été ensuite extraite avec 1 l de tampon phosphate de sodium froid (0,1 M ; pH 6,8) contenant 30 mM d'ascorbate de sodium ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$), 1% (p/v) de poly-vinyl-poly-pyrrolidone (PVPP), 0,5% (v/v) Triton X-100 ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{C}_6\text{H}_4(\text{OC}_2\text{H}_4)_{9-10}\text{OH}$) et 1 mM de fluorure de phényl-méthyl-sulfonyle (PMSF : $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{SO}_2\text{F}$). L'homogénat a été agité pendant 45 min à $4\text{ }^\circ\text{C}$, puis centrifugé à $30\ 000 \times g$ pendant 30 min à $4\text{ }^\circ\text{C}$. Après la centrifugation, le surnageant a été récupéré puis soumis à une précipitation par le sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) à 85 % (p/v) de saturation. Le précipité a été séparé du surnageant par centrifugation à $30\ 000 \times g$ pendant 30 min à $4\text{ }^\circ\text{C}$, puis solubilisé dans 250 ml de tampon phosphate de sodium (10 mM ; pH 6,8). La solution obtenue est considérée comme l'extrait brut de la PaPPO (Figure 10).

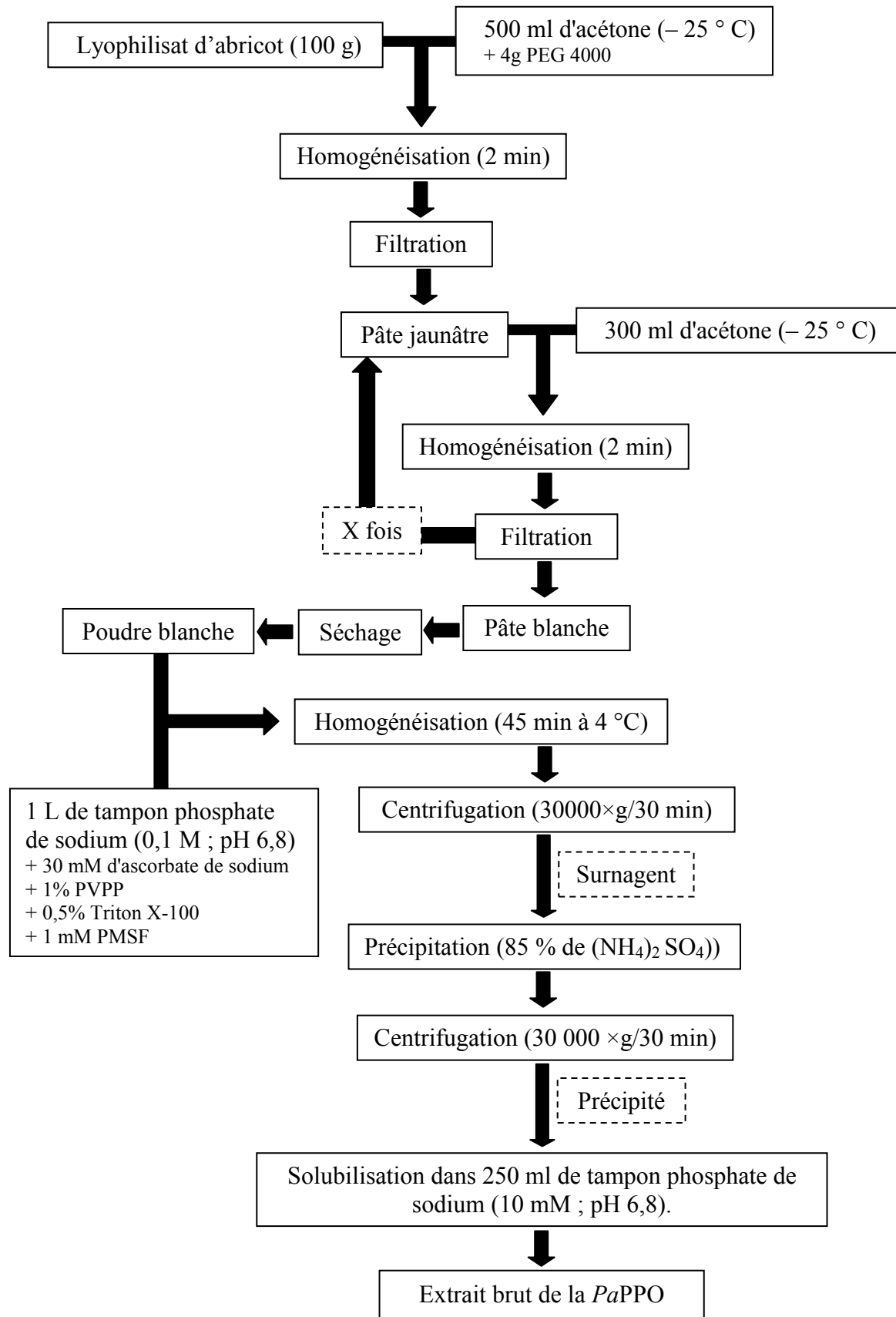


Figure 10. Récapitulatif des étapes d'extraction de la PaPPO.

6.2. Extraction des protéases végétales

L'extraction des protéases à partir des latex de *Calotropis procera* et *Ficus carica* a été réalisée selon la méthode de Nath et Dutta (1991) avec de légères modifications. A un volume de latex, deux volumes d'eau distillée ont été ajoutés, puis le mélange a été conservé pendant une nuit à -25 °C . Après décongélation, la gomme flottante a été séparée du mélange et la solution a été centrifugée à $10\,000 \times g$ pendant 10 min à 4 °C . Le surnageant obtenu a été filtré à travers un papier Whatman n° 1 puis lyophilisé. La poudre lyophilisée a été utilisée pour préparer les solutions de protéase (préparations).

7. Dosage des protéines

La méthode de quantification des protéines utilisée a été celle de Bradford (1976). Elle consiste à la formation d'un complexe entre le bleu de Coomassie G-250 ($C_{47}H_{49}N_3NaO_7S_2$) et les protéines en solution, plus précisément les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés. La concentration de protéines a été évaluée en mesurant la quantité de la forme bleue ionique du colorant. Ainsi, l'absorbance à 595 nm augmente proportionnellement avec la concentration en protéines. L'albumine sérique bovine a été employée comme étalon (Annexe II).

8. Mesure de l'activité PaPPO

L'activité PaPPO peut être déterminée en surveillant le taux de consommation du substrat (O_2) ou le taux de formation du produit (Mayer *et al.*, 1966; Vomas-Vigyazo, 1981). Ce dernier peut être déterminé par spectrophotométrie en mesurant la densité optique des composés colorés formés (quinones), à des longueurs d'onde spécifiques (environ 400 nm), selon le substrat utilisé (Mayer *et al.*, 1966). Ainsi, l'activité PPO a été déterminée en mesurant l'augmentation d'absorbance à 410 nm et en utilisant le catéchol ($C_6H_6O_2$) comme substrat. La mesure a été effectuée à 25 °C dans des puits de microplaques transparentes en utilisant un spectrophotomètre lecteur de microplaques (Infinite M200, Tecan). Le mélange réactionnel standard (200 μ l) a été constitué de 0,5 μ g d'enzyme (PaPPO) et 10 mM de catéchol dans 50 mM de tampon citrate de sodium ($C_6H_5Na_3O_7$) à pH 4,5. Le changement d'absorbance a été enregistré toutes les 0,2 secondes et l'activité enzymatique PaPPO a été calculée à partir de la pente de la partie linéaire initiale (V_0) des courbes expérimentales (absorbance par rapport au temps) (Figure 11) et exprimée en U/ml. Une unité d'activité enzymatique (U) est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la formation de 1 μ mol de quinones par minute (1 U = 1 μ mol/min).

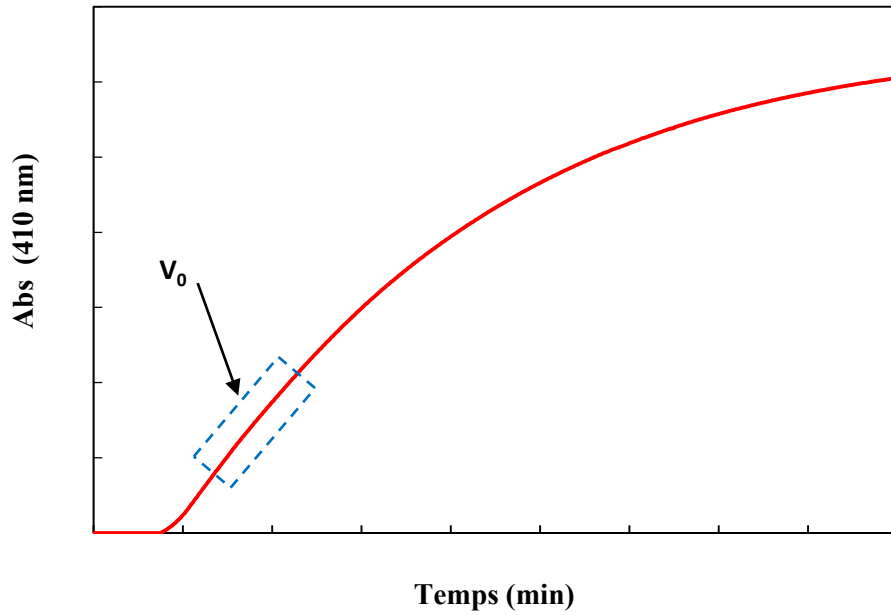


Figure 11. Courbe d'activité enzymatique (absorbance par rapport au temps).

L'activité enzymatique est calculée avec la formule suivante :

$$AE = \left[\frac{\frac{\Delta \text{abs}}{\Delta t}}{\varepsilon \times D} \right] \times VT/VE$$

- ε : coefficient d'extinction (pour le catéchol il est de $1623 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-3}$).
- D : distance de la cuve.
- V_T : volume total du mélange réactionnel.
- V_E : volume de la solution enzymatique.
- AE : activité Enzymatique U ml^{-1} ($\text{U} = \mu \text{ mol min}^{-1}$).
- Δ_{abs} : absorbance 2 (fin de la partie linéaire) – absorbance 1 (début de la partie linéaire).
- Δ_t : temps 2 (fin de la partie linéaire) – temps 1 (début de la partie linéaire).

Au niveau de la partie caractérisation et pour une meilleure comparaison, l'activité enzymatique PaPPO a été rapportée en pourcentage d'activité résiduelle.

9. Purification de la PaPPO

La purification de la PaPPO a été réalisée, principalement avec des chromatographies échangeuses d'ions en utilisant un système de chromatographie en phase liquide à protéine rapide (FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography) ÄKTA. La chromatographie échangeuse d'ions appartient aux méthodes chromatographiques qui sont généralement des méthodes physico-chimiques qui servent à séparer les différentes substances présentes dans un mélange. Elle utilise, comme l'indique son nom, un mécanisme d'échange d'ions pour séparer les molécules chargées (analytes), notamment les peptides et les protéines, selon leurs groupes chargés respectifs (Janson, 2012). Les ions de l'analyte subissent des interactions ioniques avec des charges opposées fixées sur la phase stationnaire, ce qui entraîne leur rétention d'une manière réversible. La phase stationnaire en question est constituée d'une matrice immobile qui contient des groupes fonctionnels chargés. Pour éluer une protéine adsorbée, il faut diminuer la force d'interaction, soit en modifiant le pH du tampon, ce qui transforme la charge de la protéine, soit en augmentant la force ionique, ce qui provoque une compétition entre les ions de la solution et la protéine pour les sites chargés. Une chromatographie échangeuse d'ions est composée d'une matrice substituée de groupements chargés positivement dans le cas d'un échangeuse d'anions, négativement dans le cas d'un échangeuse de cations. Ces groupements, ainsi que la matrice peuvent être de différentes natures (Selkirk, 2004).

Avant d'être appliqué à l'FPLC, l'extrait brut obtenu a été d'abord dialysé pendant une nuit contre un tampon Tris ($C_4H_{11}NO_3$)-HCl (10 mM, pH 8) sous une faible agitation. Puis, la suspension dialysée a été centrifugée à $30\,000 \times g$ pendant 30 min et filtrée à travers une membrane en polyéthersulfone de $0,45 \mu m$. Ensuite, la solution a été chargée sur une première colonne échangeuse d'anions (Q-Sepharose FF, 20 ml) pré-équilibrée avec une solution tampon de Tris-HCl (10 mM, pH 8). Les protéines liées ont été éluées avec un gradient linéaire de chlorure de sodium (0 à 1 M) avec un débit de 5 mL/min. Un dosage d'activité (diphénolase) et une mesure d'absorbance à 280 nm (en temps réelle) ont été effectués pour les fractions recueillies. Les fractions avec une activité PPO ont été regroupées et concentrées par ultrafiltration (filtre à 30 kDa) couplée à une centrifugation à $3200 \times g$. La solution protéique a été ensuite chargée sur une deuxième colonne échangeuse de cations (Mono S HR 5/50 GL). La colonne a été pré-équilibrée avec une solution tampon d'acétate de sodium (10 mM, pH 5) et éluee avec un gradient linéaire de chlorure de sodium (0 à 1 M) avec un débit de 1 ml/min. Les fractions actives ont été recueillies, regroupées, lavées avec une solution tampon de Tris-HCl (10 mM, pH 8) puis concentrées par ultrafiltration (30 kDa)

couplée à une centrifugation ($3200 \times g$). Toutes les étapes de purification de la *PaPPO* (Figure 12) ont été effectuées à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'activité enzymatique a été surveillée pendant la purification comme décrit ci-dessous, en utilisant le catéchol comme substrat dans un tampon citrate de sodium (50 mM , $\text{pH } 6,5$) contenant 2 mM de SDS comme activateur.

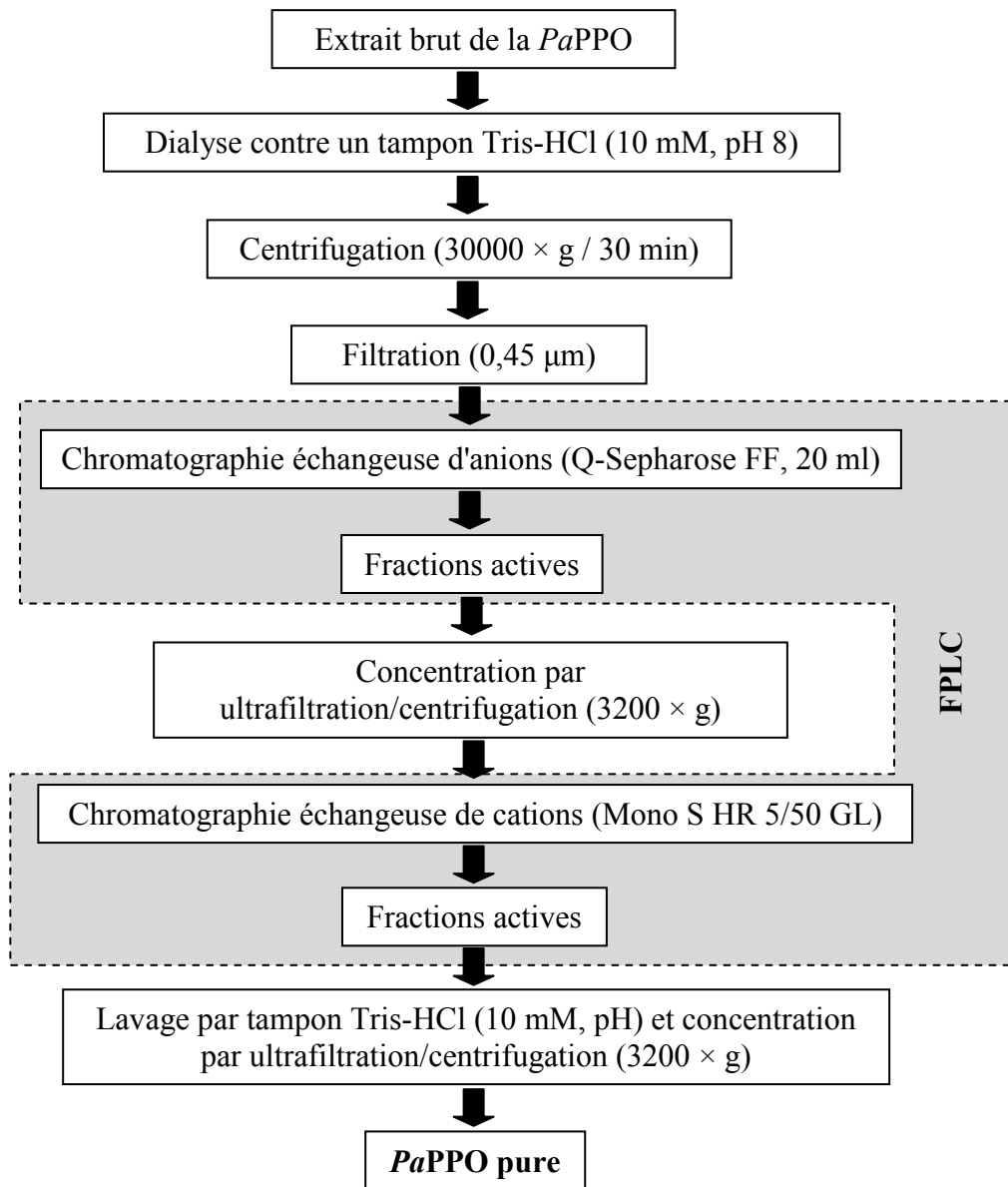


Figure 12. Récapitulatif des étapes de purification de la *PaPPO*.

Le degré et le rendement de purification de la *PaPPO*, pour chaque étape de purification ont été calculés en utilisant les formules suivantes:

- Degré de purification = $\frac{\text{Activité spécifique finale (après l'étape de purification)}}{\text{Activité spécifique initiale (de l'extrait brut)}}$
- Rendement (%) = $\frac{\text{Activité totale finale (après l'étape de purification)}}{\text{Activité totale initiale (de l'extrait brut)}} \times (100)$

10. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement en fonction de leur taille par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Le gel de polyacrylamide est la matrice la plus utilisée en électrophorèse pour séparer les protéines (Srinivas, 2019). Dans ce travail, l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) a été effectuée selon le protocole décrit par Laemmli (1970) (Annexe III) dans un mini-appareil à gel vertical (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad). Les solutions enzymatiques ont été réduites avec une solution de 10% de β -mercaptoéthanol (C_2H_6OS) puis dénaturées par chauffage à 99 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf) pendant 5 min. Les échantillons ont été déposés au-dessus d'un premier gel de concentration à 5 % de polyacrylamide (Tableau A.III.1). Les protéines ainsi concentrées ont été ensuite séparées selon leur taille dans le gel de séparation. La séparation a été effectuée sur un gel de polyacrylamide à 9% ou sur un gel à gradient de polyacrylamide de 10 à 15% (Tableau A.III.2). Après la migration des protéines sous un voltage constant de 120 V, les gels ont été fixés puis colorés avec le bleu de Coomassie (G-250). Les gels ont été finalement décolorés avec une solution de décoloration (Tableau A.III.3), puis lavés abondamment à l'eau distillée avant d'être photographiés. Un kit de marqueurs de poids moléculaires (10 - 250 kDa) a été utilisé (Precision Plus Protein Standard Dual Color, Bio-Rad), afin d'estimer le poids moléculaire des enzymes.

11. Zymographie

La zymographie est une technique employée pour détecter une enzyme en visualisant son activité sur un gel de polyacrylamide (zymogramme) (Vandooren *et al.*, 2013). Dans notre travail, nous avons utilisé cette technique pour détecter l'activité *PaPPO*, ainsi que l'activité protéase. La zymographie de la *PaPPO* a été effectuée par une SDS-PAGE partiellement dénaturante. L'électrophorèse a été effectuée comme décrit ci-dessus mais dans des conditions non-réductrices (sans le β -mercaptoéthanol) et non-dénaturantes (sans chauffage). L'activité *PaPPO* a été détectée à une température de 25 °C en immergeant le gel dans un tampon citrate de sodium (50 mM, pH 6,5) contenant 0,2 M de catéchol. Les gels ont été photographiés après 20 min d'incubation sous agitation. Comme pour la *PaPPO*, la zymographie des préparations de protéase a été réalisée dans des conditions non réductrices et non dénaturantes.

Quant au développement des zones d'activité, il a été réalisé en suivant la méthode de Garcia-carreno *et al.* (1993). Après électrophorèse et pour éliminer le SDS, les gels ont été trempés dans une solution de Triton X-100 (2,5%, v/v) pendant 30 min à 4 ° C. Ensuite, ils ont été immergés dans 50 ml d'une solution de caséine (2%, p/v) préparée dans un tampon citrate de sodium (50 mM, pH 4,5) ou dans un tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) pendant 30 min à 4 °C (afin de permettre au substrat de diffuser dans le gel, tout en maintenant une faible activité enzymatique). Ensuite, la température a été amenée à 25 °C et les gels ont été incubés pendant 90 min pour permettre la digestion du substrat protéique. Après l'incubation, les gels ont été lavés avec de l'eau distillée, fixés et colorés pendant une nuit avec du bleu de Coomassie.

12. Caractérisation de la PaPPO

12.1. Effet du pH

L'effet du pH sur l'activité PaPPO a été déterminé dans les mêmes conditions décrites précédemment (mesure de l'activité PaPPO), sur une plage de pH entre 2,0 à 9,5 en utilisant deux types de solutions tampons: le tampon citrate de sodium (50 mM) pour la gamme de pH de 2,0 à 7,0 et le tampon Tris-HCl (50 mM) pour la gamme de pH de 7,0 à 9,5. L'activité PaPPO a été calculée en forme de pourcentage d'activité résiduelle par rapport au pH optimal (100 %). Le pH optimal une fois déterminé, a été utilisé comme condition de dosage de l'activité PaPPO pour les autres expérimentations de caractérisation (à l'exception de la zymographie).

12.2. Effet de la température

L'influence de la température sur l'activité PaPPO a été estimée sur un intervalle de température entre 5 et 90 °C, en utilisant un spectrophotomètre (UV Shimadzu-1800) connecté à un thermostat chauffant (Julabo F25), ceci afin de contrôler et maintenir la température souhaitée. La température optimale de l'activité PaPPO a été déterminée en utilisant 50 mM du tampon citrate à pH 4,5 (pH optimal), dans un volume réactionnel de 600 µl contenant 1,5 µg d'enzyme et 10 mM de catéchol. Avant l'addition de la solution enzymatique, le substrat et le tampon ont été incubés pendant 10 min à la température appropriée en utilisant le bain-marie du thermostat chauffant. L'activité PaPPO a été présentée en forme de pourcentage d'activité résiduelle par rapport à l'activité PaPPO à la température optimale (100 %).

12.3. Inactivation thermique

Pour étudier l'inactivation thermique de la *PaPPO*, l'enzyme (0,5 µg) a été incubée pendant différentes durées (2, 5, 10, 20 et 30 min) dans un tampon citrate de sodium (50 mM ; pH 4,5) à différentes températures comprises entre 50 et 100 °C. L'incubation a été réalisée dans un agitateur thermostaté (Thermomixer comfort, Eppendorf). Après la période de chauffage, les échantillons ont été rapidement refroidis dans un bain de glace pendant 10 min, puis réchauffés jusqu'à 25 °C avant d'ajouter le substrat et mesurer l'activité enzymatique résiduelle de la même manière décrite précédemment. L'activité résiduelle a été rapportée en pourcentage par rapport à l'activité *PaPPO* à la température optimale (100 %).

12.4. Spécificité de substrat et cinétique enzymatique

Afin d'évaluer l'affinité de la *PaPPO* envers les différents composés phénoliques, la spécificité de substrat de la *PaPPO* a été déterminée avec plusieurs substrats phénoliques : deux monophénols (phénol et tyramine), six diphenols (L-dopa, acide caféique, acide chlorogénique, catéchol, 4-méthylcatéchol et dopamine) et un triphénol (pyrogallol). L'activité *PaPPO* a été mesurée en utilisant la même concentration de substrat (10 mM) sauf pour la L-dopa et l'acide caféique (1 mM) en raison de leur faible solubilité dans l'eau. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité enzymatique. L'activité *PaPPO* avec le catéchol (10 mM), comme substrat, a été considéré comme 100%. Les substrats (catéchol, 4-méthylcatéchol, acide chlorogénique et pyrogallol) qui ont présenté une activité *PaPPO* élevée ont été sélectionnés pour étudier quelques paramètres de la cinétique enzymatique: la constante de Michaelis (K_m), la vitesse maximale (V_{max}) et la constante catalytique (k_{cat}). Les valeurs K_m et V_{max} de l'enzyme ont été calculées par régression non linéaire. La constante catalytique (k_{cat}) a été calculée en divisant le nombre total de substrats convertis par minute par le nombre total de molécules de *PaPPO* présentes dans le mélange réactionnel. Les coefficients d'absorption molaire ont été déterminés par oxydation chimique (periodate de sodium) des diphenols respectifs selon la méthode décrite par Munoz *et al.* (2006).

12.5. Effet du SDS, des inhibiteurs et des ions métalliques

L'activité *PaPPO* est fortement affectée par la présence dans le milieu réactionnel des effecteurs, tels que les inhibiteurs, les ions métalliques et les détergents. Ces composés peuvent affecter l'activité *PaPPO*, en stimulant ou en inhibant la réaction enzymatique. Ainsi, nous avons étudié l'effet de différentes concentrations (0-10 mM) de SDS ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), sur l'activité *PaPPO*.

De même, l'effet d'une large gamme d'inhibiteurs (4-hexylrésorcinol, acide ascorbique, acide benzoïque, acide citrique, acide kojique, acide succinique, EDTA, glutathion réduit, L-cystéine et métabisulfite de sodium) a été testé avec des concentrations d'inhibiteur de 0,1, 1, 5 et 10 mM. Les composés choisis ont été parmi les inhibiteurs les plus testés et les plus efficaces sur la PaPPO. Nous avons testé aussi l'effet de deux concentrations (1 et 10 mM) de divers ions métalliques (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} et Ni^{2+}) sur l'activité PaPPO. L'activité enzymatique du mélange témoin sans SDS, inhibiteurs et ions métalliques a été prise comme 100%, puis comparée aux autres traitements. L'activité enzymatique a été mesurée comme nous l'avons reportée précédemment, à l'exception que l'inhibiteur a été ajouté au milieu réactionnel avant l'ajout du substrat.

12.6. Stabilité au cours du stockage

Afin d'évaluer le comportement de la PaPPO au cours de son stockage à 4 °C, des tests d'activité enzymatique, des gels de SDS-PAGE, ainsi que des zymogrammes sont effectués chaque semaine durant 4 semaines. L'activité enzymatique est mesurée sans et avec SDS (0,5 mM) et rapportée par rapport à l'activité PaPPO (fraîchement purifiée) sans SDS (100%).

12.7. Détermination de la masse moléculaire

La masse moléculaire de la PaPPO a été déterminée par une chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS). La spectrométrie de masse a été réalisée en utilisant un système d'ionisation par électronébulisation de type ESI-LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific Bremen, Allemagne). Les caractéristiques de l'instrument sont : une plage de masse m/z de 200-4000 et une précision < 3 ppm. Avant les mesures spectrométriques, la solution protéique a été ultrafiltrée par centrifugation (3200 x g) en modifiant le système tampon en acétate d'ammonium (5 mM, pH 5), ceci afin de réduire au minimum la concentration de sels non-volatils. Par la suite, la solution protéique a été diluée avec une solution d'acétonitrile (C_2H_3N) à 80% (v/v) contenant 0,1% d'acide formique (CH_2O_2) (v/v).

12.8. Identification de la séquence par cartographie des digestats peptidiques

La méthode de l'empreinte peptidique massique « *Peptide Mass Fingerprinting* » ou PMF est une stratégie d'identification des protéines (Pappin *et al.*, 1993; Thiede *et al.*, 2005). Les protéines ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE dénaturante (gel à 9%), puis les morceaux de gel contenant les bandes cibles ont été soumis à une digestion trypsique. La

trypsine coupe après les résidus d'acides aminés Arg et Lys (Annexe IV). Les peptides ont été extraits du gel puis analysés par une nano chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (UHPLC-ESI-MS/MS) en utilisant un spectromètre de masse Orbitrap à haute résolution (Dionex Ultimate 3000 RSLCnano, Q Exactive Orbitrap, Thermo Scientific). L'analyse des données a été réalisée avec l'outil informatique Proteome Discoverer 1.4 en comparant la liste des masses obtenues aux listes de masses théoriques obtenues par digestion *in silico* de la PPO de *P. armeniaca* de la banque de données UniProt (O81103). L'identification des protéines a été faite en fonction du nombre de masses peptidiques qui correspondent à la protéine, du pourcentage de recouvrement de la séquence protéique (ou plus précisément le nombre de peptides identifiés), de la comparaison entre le poids moléculaire de la protéine identifiée et le poids moléculaire théorique de la protéine sujette et enfin la précision de mesure des différentes masses peptidiques (Pappin *et al.*, 1993).

Une protéine est identifiée par empreinte peptidique massique lorsque le pourcentage de recouvrement dépasse 30% (Saraswathy et Ramalingam, 2011). L'identification a été réalisée avec une précision de 5 ppm et une tolérance de masse des fragments de 0,5 Da. Les modifications autorisées ont été l'oxydation des méthionines et la carbamidométhylation des cystéines.

13. Protéolyse de la PaPPO

Afin d'étudier la capacité des préparations de protéases végétales (P) sélectionnées (papaïne, calotropaine, ficine et bromélaïne) à hydrolyser la PaPPO, cette dernière (5 µg) a été soumise à l'action de 20 µg de préparations de protéases. La réaction de protéolyse a été réalisée dans le pH optimal (pH 4,5) de la PaPPO en utilisant le tampon citrate de sodium (50 mM) pour deux périodes d'incubation (15 min et 2 h), en se basant sur des essais préalables. La réaction de protéolyse a été suivie par une SDS-PAGE. Ainsi, après la période d'incubation la réaction a été stoppée par l'addition du tampon réducteur contenant le β-mercaptoéthanol, puis le mélange a été chauffé à 99 °C pendant 5 min avant d'être chargé sur le gel. Un témoin sans préparations de protéases, constitué avec 5 µg de PaPPO préparé dans un tampon citrate de sodium (50 mM, pH 4,5), a été également chargé sur le gel. L'électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée dans les mêmes conditions décrites précédemment.

14. Inhibition de la *PaPPO* par l'acide ascorbique

L'effet inhibiteur de l'acide ascorbique (AA) sur l'activité *PaPPO* a été étudié avec différentes concentrations (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 et 10 mM) d'AA. L'activité *PaPPO* (activité catécholase) a été déterminée de la même manière décrite précédemment à pH 4,5 en utilisant le catéchol comme substrat. Dans le cas d'inhibition complète de la *PaPPO* par l'AA, la réaction a été surveillée pendant 24 h, à moins que l'activité *PaPPO* rétablie préalablement. L'activité enzymatique a été présentée sous forme de pourcentage d'activité résiduelle par rapport à l'activité *PaPPO* du témoin sans l'AA (100%).

15. Effet des préparations de protéases sur la *PaPPO*

Pour étudier l'effet des préparations de protéases végétales sélectionnées (papaïne, calotropaine, ficine et bromélaïne) sur l'activité *PaPPO*, nous avons incubé la *PaPPO* (1 µg) avec différentes quantités (50, 100, 200 et 500 µg) de préparations de protéases dans un tampon citrate de sodium (50 mM ; pH 4,5). De même, et afin d'évaluer l'effet des préparations de protéases sur la *PaPPO* à pH 7,0 (pH optimal généralement rapporté pour les protéases sélectionnées), la *PaPPO* (1 µg) a été incubée avec 100 µg de préparations de protéases dans un tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,0). Les différents mélanges ont été incubés pendant différents temps (0, 2, 5, 10, 20, 30 min, 1, 2, 4, 8, 16 et 24 h), avant d'ajouter le substrat (catéchol) et mesurer l'activité *PaPPO*. L'activité enzymatique du mélange témoin à pH 4,5 sans protéases a été considérée comme 100%.

16. Inhibition de la *PaPPO* par combinaison « acide ascorbique/préparations de protéases »

La combinaison AA/P a pour objectif d'investir les deux mécanismes d'inhibition (inhibition temporaire avec l'AA et inactivation avec les préparations de protéases) afin d'inhiber complètement la *PaPPO* d'abricot en utilisant le minimum d'inhibiteurs. Pour ceci, nous avons éliminé les concentrations d'AA qui assurent une inhibition complète de la *PaPPO* durant 24 heures. Ainsi, les concentrations (0,1, 0,5, 1 et 2 mM) d'AA ont été sélectionnées pour la combinaison AA/P. Donc, nous avons testé 16 combinaisons (AA/P) pour chaque préparation de protéase, ce qui fait un total de 64 combinaisons (Tableau 05).

Tableau 05. Combinaisons AA/P testées.

AA (mM)	Protéases (µg)															
	Papaine				Calotropaine				Ficine				bromélaïne			
	50	100	200	500	50	100	200	500	50	100	200	500	50	100	200	500
0,1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
0,5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

AA : Acide ascorbique

Les combinaisons AA/P ont été mélangées avec 1 µg de *PaPPO* et l'activité enzymatique a été déterminée comme nous l'avons décrite précédemment à pH 4,5. La réaction a été surveillée pendant 24 h, pour vérifier un éventuel rétablissement de l'activité *PaPPO*. L'activité enzymatique du mélange témoin à pH 4,5 sans inhibiteurs a été définie comme 100%.

17. Application des combinaisons « acide ascorbique/ préparations de protéases » sur la purée d'abricot et colorimétrie

Afin de tester l'efficacité de notre approche *in situ*, nous avons appliqué les combinaisons AA/P sur la purée d'abricot. Ainsi, et à partir des résultats de la purification et de l'inhibition *in vitro* de la *PaPPO*, nous avons choisi les concentrations 100 et 500 mg d'AA et les concentrations 10, 50 et 100 mg de préparations de protéases pour les combinaisons AA/P. Ces dernières ont été préparées dans 1 ml d'eau distillée puis appliquées sur 100 g d'abricots frais.

Les abricots frais ont été nettoyés et dénoyautés, ensuite, 100 g ont été introduits dans un mixeur plongeant avec 1 ml de la solution de combinaison AA/P fraîchement préparée. Le tout a été mélangé pendant 2 min jusqu'à l'obtention d'une purée homogène. Une purée témoin a été préparée sans l'ajout des inhibiteurs. De plus, et pour une meilleure comparaison, nous avons traité la purée d'abricot uniquement avec de l'AA (50, 100, 500 et 1000 mg), sans l'ajout de préparations de protéases. Après homogénéisation, les purées d'abricot ont été emballées dans des boîtes en polypropylène de 250 ml et conservées à 4 °C. La couleur de la purée d'abricot a été mesurée immédiatement après homogénéisation afin de déterminer la couleur initiale (0 min). Le changement de couleur de la purée a été suivi pendant 10 jours, où des mesures ont été prises après 5, 10, 30 min; 1, 2, 4, 8, 16 h; 1, 2, 5 et 10 jours.

La couleur de la purée a été mesurée par un système de vision par ordinateur (Figure 13), puis exprimée en coordonnées colorimétriques L^* , a^* , b^* (Tristimulus) de l'espace CIELAB. Le système de vision par ordinateur est composé d'un système d'éclairage normalisé (mini studio photo) doté de trois lampes (spots) LED (lumière du jour 6500 K, 6 W), un appareil photo numérique Canon EOS-1200D (CMOS 18 Mpx, 3x 18–55 mm f / 3,5–5,6) et un ordinateur avec le logiciel Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc., USA).

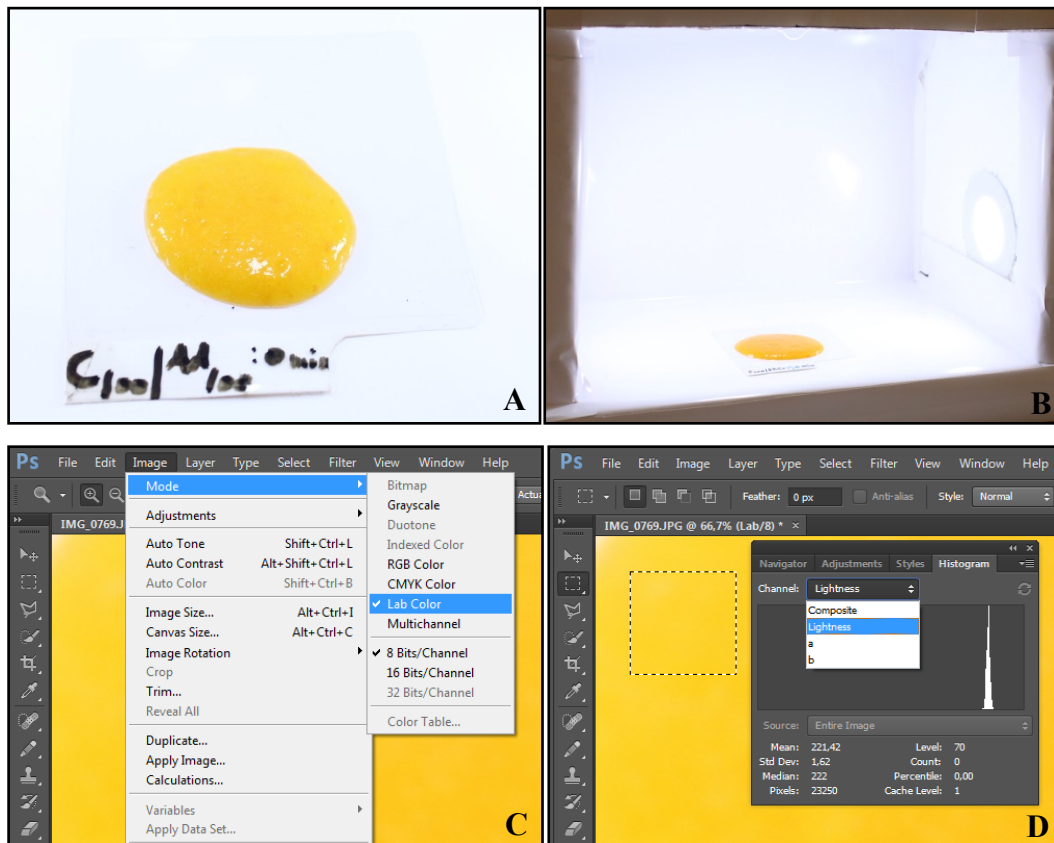


Figure 13. Colorimétrie par un système de vision par ordinateur.

Pour chaque essai, 3 g de purée d'abricots ont été versés sur une feuille (en PVC transparent) carrée ($70 \times 70 \times 0,2$ mm) étiquetée (Figure 13.A), puis l'échantillon a été placé dans le mini studio photo (à fond blanc) (Figure 13.B). Toutes les photos ont été prises en mode manuel (1/80, F5.6, ISO400). La mesure de la couleur a été réalisée selon la méthode décrite par Zhou *et al.* (2015). Les coordonnées colorimétriques L (luminance), a (vert-rouge) et b (bleu-jaune) données par le logiciel Adobe Photoshop ont été obtenues à partir de l'histogramme de la barre de menu en utilisant le mode « Couleur LAB » (Figure 13.C). L'outil de sélection rectangulaire dans le menu principal a été utilisé pour sélectionner la zone de mesure (Figure 13.D). Ensuite, les valeurs L , a et b de la zone sélectionnée ont été transformées au modèle colorimétriques CIELAB (L^* , a^* , b^*) en utilisant les équations suivantes:

$$L^* = \frac{L}{2.5}$$

$$a^* = \frac{240 a}{255} - 120$$

$$b^* = \frac{240 b}{255} - 120$$

La différence de couleur totale (ΔE) a été calculée selon l'équation suivante:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L^*_0)^2 + (a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2}$$

L^* , a^* et b^* sont les valeurs de couleur des échantillons, tandis que L^*_0 , a^*_0 et b^*_0 sont les valeurs de couleur de la purée avec le minimum de brunissement (purée traitée avec 1000 mg d'AA à 0 min).

18. Analyses statistiques et traitement des résultats

Les résultats des tests effectués ont exprimés en moyenne \pm écart-type. L'activité enzymatique est rapportée en pourcentage d'activité résiduelle, en considérant l'activité enzymatique à pH 4,5 sans inhibiteur comme 100%. Les courbes et les histogrammes ont été tracés avec le logiciel OriginPro 9.1. L'analyse de la variance à un seul facteur (ANOVA) a été réalisée par le test de Tukey au seuil de signification $p \leq 0,05$ avec le logiciel XLSTAT 2009.

***Partie III. Résultats
et discussion***

1. Caractérisation des abricots frais

Les abricots frais ont été caractérisés pour leurs teneurs moyennes en composés phénoliques : polyphénols totaux (PT) et flavonoïdes totaux (FT), ainsi que pour quelques paramètres physicochimiques (pH, humidité et degré Brix). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 06.

Tableau 06. Paramètres physicochimiques et teneurs en composés phénoliques de l'abricot.

pH	°Brix	Humidité	PT (mg EAG)		FT (mg EQ)	
			/100 g MF	/100 g MS	100 g MF	/100 g MS
4,38 ±0,33	14,1±0,3	84,6±0,5	54,4±1,8	353,2±11,7	9,6±0,5	66,3±3,2

Légende : PT, polyphénols totaux ; FT, flavonoïdes totaux ; EAG, équivalents d'acide gallique ; EQ, équivalents de quercétine.

Le dosage des PT et des FT a été effectué avec des méthodes spectrophotométriques et les teneurs ont été estimées à partir des équations obtenues par les courbes d'étalonnage (Annexe II). Ainsi, les résultats présentés dans le Tableau 06 ont été exprimés par rapport à 100g de matière fraîche (MF) et de matière sèche (MS). La teneur moyenne en PT par rapport à la MS ($353,2 \pm 11,7$ mg EAG/100 g MS) est proche des teneurs : 354 mg EAG/100 g MS, 319 - 413 mg EAG/100 g MS et 148,43 - 541,14 mg EAG/100 g MS rapportées, respectivement, par Hussain *et al.* (2013), Milošević *et al.* (2013) et Leccese *et al.* (2007). De même, la comparaison de nos résultats avec d'autres études, qui ont rapporté la teneur en PT par rapport à la MF montre que la teneur moyenne obtenue concorde avec les valeurs (50,6 mg EAG/100g de MF) de Dragovic-Uzelac *et al.* (2007) et valeurs (33 et 62 mg EAG/100g de MF) de Campbell et Padilla-Zakour (2013). Selon ces derniers, la teneur totale d'abricots en PT peut varier de 314,29 jusqu'à 2465 mg EAG/100 g MS pour certaines variétés. D'autre part, les teneurs moyennes en FT enregistrées sont proches de la teneur (11,4 mg EQ/100 g de MF) rapportée par Roussos *et al.* (2011) mais légèrement inférieures à la teneur (14 mg EQ/100 g de MF) citée par Hussain *et al.* (2013).

En effet, les composés phénoliques sont reconnus comme substrats de la PPO. Selon Vomas-Vigyazo (1981), le brunissement enzymatique observé dans les fruits et légumes est fortement lié à leur teneur en composés phénoliques. Ainsi, la teneur élevée en PT obtenue dans cette étude explique l'altération post-récolte rapide du fruit par le brunissement enzymatique.

Par ailleurs, les valeurs moyennes des différents paramètres physicochimiques étudiés (humidité, pH et °Brix) se situent dans les plages d'humidité (74,19% et 88,17%), de pH (3,80 à 5,20) et de Brix (12,34 à 15,80°) rapportées, respectivement par Akin *et al.* (2008), Ali *et al.* (2011) et Leccese *et al.* (2012).

2. Extraction et purification de la PaPPO

L'extraction des PPOs à partir des matrices végétales est souvent un procédé délicat en raison de la présence de différents composés (polyphénols, pectines, polysaccharides, etc.), qui sont plus ou moins difficiles à séparer (Anderson, 1968; Pierpoint, 2004; Wang *et al.*, 2008). De même, plusieurs PPOs se trouvent liées aux membranes cellulaires (Hutcheson *et al.*, 1980; Cabanes *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2018). Ainsi, l'extraction de la PPO à partir des tissus végétaux implique généralement plusieurs étapes et exige l'utilisation de plusieurs composés chimiques afin d'extraire le maximum de PPO, tout en conservant son activité enzymatique. La présence des composés phénoliques dans l'extrait brut est fortement inconvenable. Ces composés sont des substrats de la PPO et leur présence peut provoquer des réactions de brunissement et l'activation de la forme latente de la PPO (Vomas-Vigyazo, 1981; Soler-Rivas *et al.*, 1997; Yoruk et Marshall, 2003; Wang *et al.*, 2008).

Ainsi, nous avons opté pour une première extraction de la PaPPO par l'acétone à froid. L'acétone est utilisé afin de précipiter les protéines et éliminer la plupart des composés interférents de faible poids moléculaire, principalement les polyphénols et les caroténoïdes (Wang *et al.*, 2008). De même, nous avons utilisé le PVPP dans le tampon d'extraction pour complexer les polyphénols résiduels et éviter leur l'interaction avec la PaPPO (Galeazzi *et al.*, 1981). Le Triton X-100 est largement utilisé pour libérer les PPOs liés à la membrane. Ce détergent induit la solubilisation douce non dénaturante des protéines liées sans affecter leurs structures et leur activité (Galeazzi *et al.*, 1981). L'acide ascorbique a également été inclus pendant la procédure d'extraction afin d'éviter toute réaction d'oxydation éventuelle (Golan-Goldhirsh et Whitaker, 1984). Le PMSF a été ajouté au tampon d'extraction comme inhibiteur des protéases à sérine pour stopper les réactions de protéolyse, qui peuvent activer la forme latente ou donner naissance aux iso-formes (Flurkey et Jen, 1980; Wang *et al.*, 2008; Plaxton, 2019). Par ailleurs, dans le but d'isoler la partie protéique (principalement la PaPPO) des autres composés, l'extrait obtenu a été soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium à 85% de saturation.

Après la précipitation au sulfate d'ammonium, nous avons pu purifier la L-*Pa*PPO avec une stratégie de purification en trois étapes, comprenant une dialyse, une chromatographie échangeuse d'anions (Figure 14.A) et une chromatographie échangeuse de cations (Figure 14.B).

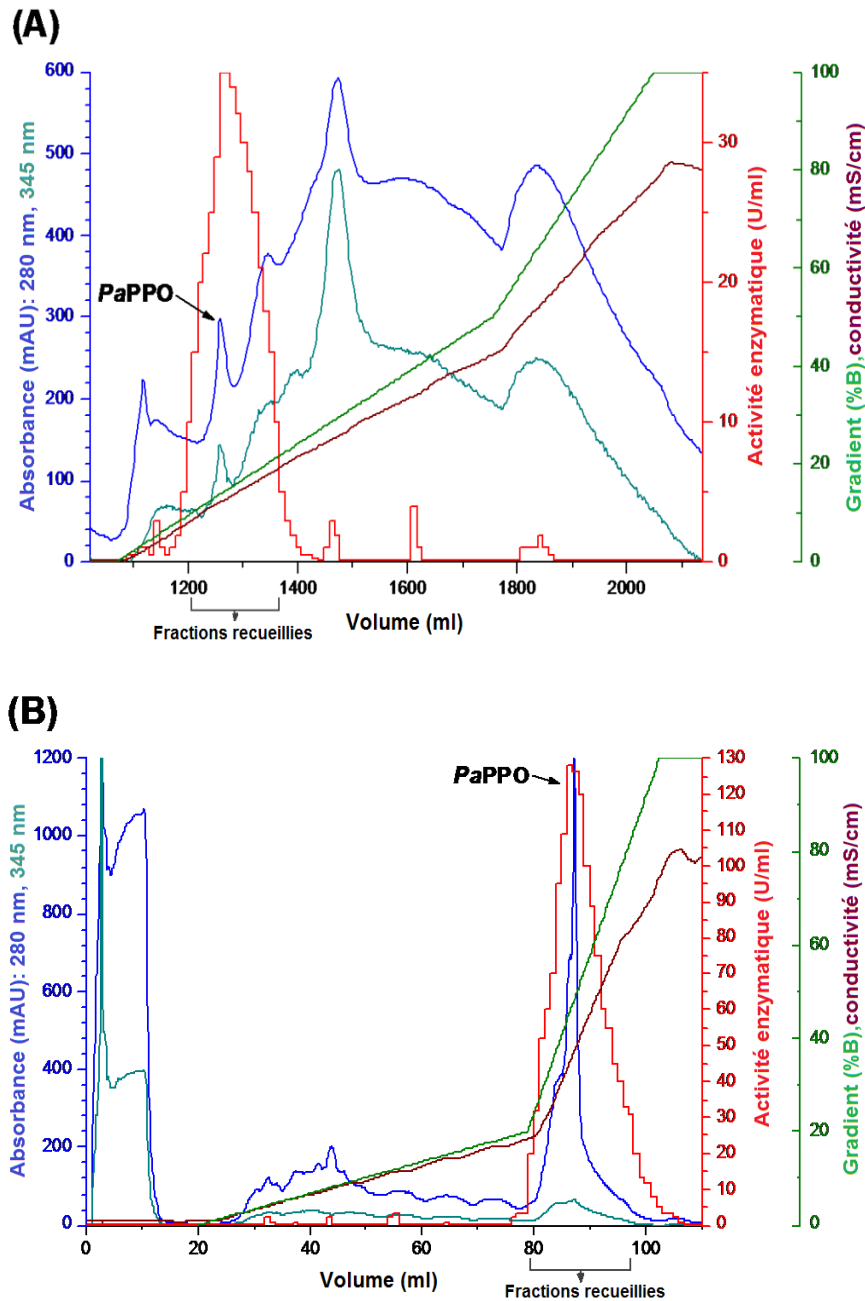


Figure 14. Purification de la *Pa*PPO par chromatographie FPLC.

(A) chromatographie échangeuse d'anions, Q-Sépharose. (B) Chromatographie échangeuse de cation, MonoS. Légende : bleu, absorbance UV à 280 nm (mAU) ; viride, absorbance UV à 345 nm (mAU) ; rouge, activité *Pa*PPO (U/mL) ; vert, gradient d'éluion (% tampon B) ; marron, conductivité (mS/cm).

Nous avons d'abord dialysé l'extrait brut pendant 24 h contre un tampon Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) dans le but d'éliminer le maximum de sels, ainsi que d'autres composés de faible poids moléculaire. Par la suite, la solution protéique résultante est appliquée à une colonne échangeuse d'anions en utilisant le système FPLC (Figure 14). Cinq pics protéiques majeurs ont été élués suite à cette chromatographie. L'activité *PaPPO*, est principalement présente au tour du deuxième pic à ~9 mS/cm (1210-1390 ml) (Figure 14.A), où nous avons détecté une forte activité *PaPPO*. Ces fractions ont été récupérées et regroupées pour l'étape suivante. L'activité *PaPPO* a été négligeable dans les autres fractions éluées. Seulement une purification partielle est obtenue après la première chromatographie comme le montre clairement le gel de SDS-PAGE (Figure 15). Ainsi, les fractions regroupées (actives) sont concentrées puis chargées sur une colonne échangeuse de cations (MonoS) pour une deuxième chromatographie. Cette dernière chromatographie a permis de bien séparer l'enzyme cible des autres protéines et d'éluer la *PaPPO* en un seul pic à ~18,5 mS/cm (78-96 mL) (Figure 14.B). Ceci est confirmé par le gel de SDS-PAGE, où une seule bande est apparue à 63 kDa (Figure 15). Ainsi, près de 3 mg de *PaPPO* sont purifiées avec un rendement de récupération de 51,01 %, un degré de purification de 23,2 et une activité spécifique (avec 10 mM de catéchol) de 459 U/mg (Tableau 07).

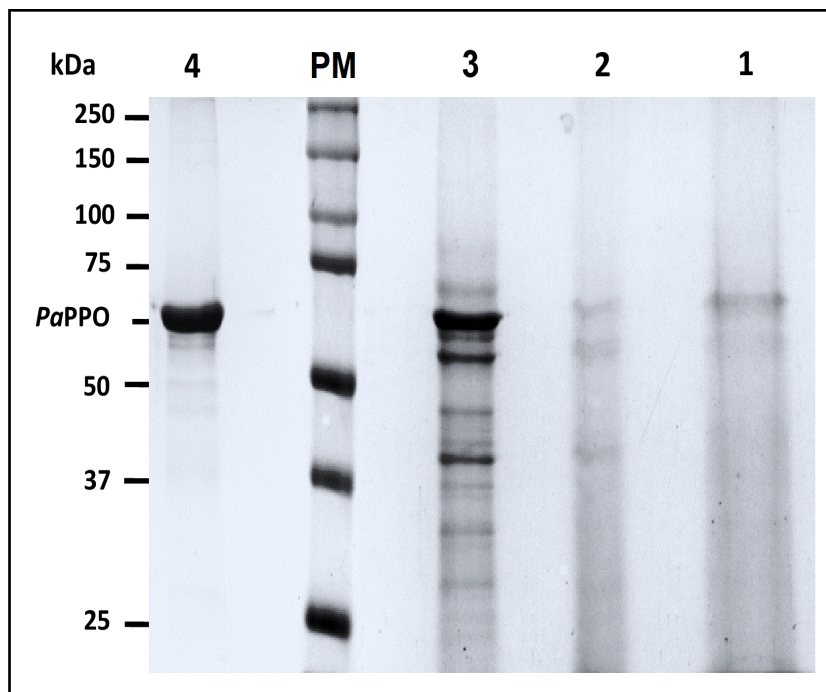


Figure 15. SDS-PAGE des étapes de purification de la *PaPPO*.

1, extrait brut ; 2, dialyse ; 3, chromatographie échangeuse d'anions Q-Sepharose ; PM, marqueurs de poids moléculaire (les valeurs sont données en kDa) ; 4, chromatographie échangeuse de cations MonoS.

Tableau 07. Bilan global de la purification de la *PaPPO*.

Etapas de purification	Volume (ml)	Protéines (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg de protéines)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait brut	250	130	2570,17	19,77	1	100
Dialyse	300	69	2312,42	33,51	1,694	89,97
Q-Sépharose FF	1,23	12,05	1505,61	124,9	6,317	58,58
MonoS 5/50 GL	1	2,859	1310,94	459,28	23,23	51,01

Il est à signaler qu'une faible activité *PaPPO* a été constatée dans les fractions de l'échantillon, non-retenus par les deux colonnes, ce qui a induit une perte d'activité après les deux chromatographies (Tableau 07).

3. Caractérisation de la *PaPPO*

3.1. Poids moléculaire

D'après les séquences peptidiques de différentes PPOs, les masses moléculaires de la forme latente sont généralement autour de 60 kDa et les masses moléculaires de la forme active sont autour de 40 kDa (Sommer *et al.*, 1994; Van Gelder *et al.*, 1997; Koussevitzky *et al.*, 1998). Toutefois, les poids moléculaires des PPOs déterminés par SDS-PAGE varient considérablement dans la bibliographie, et parfois ils sont très loin des masses moléculaires calculées. Certaines études ont rapporté des poids moléculaires très faibles pour les PPOs, tel que celui de la PPO d'ananas (25 kDa) (Das *et al.*, 1997), cependant d'autres études ont rapporté des poids moléculaires relativement élevés, tel que celui de la PPO d'haricot (120 kDa) (Paul et Gowda, 2000).

La *PaPPO* étudiée est apparue comme une seule bande protéique sur le gel de SDS-PAGE avec un poids moléculaire de 63 kDa (Figure 15). Ce poids est identique aux poids moléculaires (63 et 60 kDa) de la *PaPPO* latente détectée avec SDS-PAGE par Fraignier *et al.* (1995) et Chevalier *et al.* (1999), respectivement. Ainsi, ces résultats fournissent la première indication que l'enzyme que nous avons purifiée est la forme latente de la *PaPPO* (*L-PaPPO*). Plusieurs PPOs isolées à partir d'autres fruits, ont été caractérisées avec des poids moléculaires proches telles que la PPO de pêche (60 kDa) (Cabanes *et al.*, 2007), de banane (62 kDa) (Galeazzi *et al.*, 1981) et de mûrier (65 kDa) (Arslan *et al.*, 2004). Cependant le poids moléculaire que nous avons détecté (63 kDa) est supérieure à la masse moléculaire de la

PaPPO mature (56,2 kDa) (forme latente) calculée par Chevalier *et al.* (1999) (en se basant sur la séquence peptidique de l'enzyme) et supérieure aussi au poids moléculaire de la *PaPPO* (57 kDa) détecté par SDS-PAGE par Ünal et Şener (2016). Nous supposons que cette différence est due à la glycosilation de la *PaPPO*. La glycosilation ou l'attachement des glucides aux PPOs a déjà été rapportée pour de nombreuses espèces telles que les pêches (Flurkey et Jen, 1980), les fèves (Ganesa *et al.*, 1992; Raffert et Flurkey, 1995), les pommes de terre (Kwon et Kim, 1996), les haricots (Kanade *et al.*, 2009) et les aubergines (Shetty *et al.*, 2011; Jukanti et Bhatt, 2015).

3.2. Effet du pH

L'activité enzymatique dépend strictement du pH du milieu réactionnel. Le pH affecte directement l'enzyme en changeant l'état de protonation des groupes fonctionnels des acides aminés impliqués dans la réaction catalytique, ou encore en modifiant la structure protéique native tridimensionnelle de l'enzyme. Ainsi, si la protonation est un processus réversible, la détérioration de la structure de l'enzyme est souvent irréversible (Bisswanger, 2014). De ce fait et afin d'étudier l'effet du pH sur la *PaPPO* purifiée, nous avons mesuré l'activité *PaPPO* à différentes valeurs de pH, allant de 2,0 à 9,5, en utilisant le catéchol comme substrat (Figure 16).

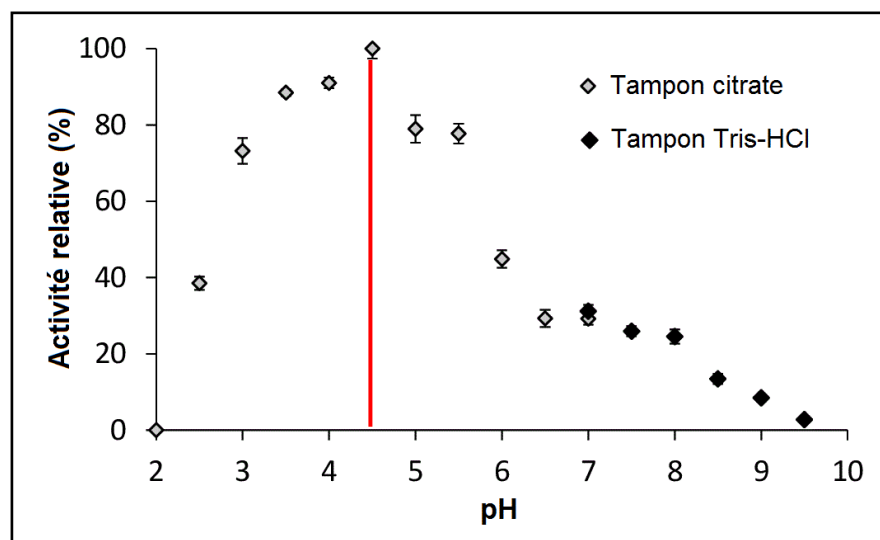


Figure 16. Effet du pH sur l'activité *PaPPO*.

Les résultats montrent que l'effet du pH sur l'enzyme en question suit le modèle standard de la plupart des enzymes, où l'activité *PaPPO* a augmenté de zéro à partir de la région fortement acide (pH 2,0) jusqu'à une valeur maximale (pH optimal), puis elle a diminué de nouveau presque à zéro dans la région fortement alcaline (pH 9,5) (Figure 16). Globalement,

la PaPPO a montré un caractère acidophile, où elle a été plus active pour des pHs acides avec un pH optimum de 4,5 (100%). Ainsi, l'enzyme a révélé 38% de son activité à pH 2,5. Cependant, la PaPPO a perdu plus de 30% de son activité dans la région alcaline (>7,0) et elle a conservé seulement 17% de son activité à pH 9,0. Le pH optimal rapporté ici pour la PaPPO est plus bas que celui trouvé par Ünal et Şener (2016) (5,0 à 5,8) et Fraignier *et al.* (1995) (5,0 à 5,5) en utilisant, respectivement, le catéchol et le 4-méthylcatéchol comme substrat. De plus, les valeurs enregistrées sont largement inférieures à celle d'Arslan *et al.* (1998) qui ont rapporté un pH optimal de 8,5 pour la PaPPO (variété Malatya). La comparaison des résultats obtenus avec d'autres espèces du même genre (*Prunus*) a révélé une ressemblance avec le pH optimum (4,5) de la PPO de pêche (variété Catherina) en utilisant le 4-tert-butylcatéchol comme substrat (Cabanes *et al.*, 2007). Les PPOs sont généralement caractérisées par un pH optimal neutre ou proche de la neutralité (Wong *et al.*, 1971; Yoruk et Marshall, 2003; Zaini *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2014; Amiour et Hambaba, 2016; Jukanti, 2017; Siddiq et Dolan, 2017). Cependant, plusieurs PPOs ont été caractérisées par un pH optimal acide telles que les PPOs : de pomme (Marrufo-Hernández *et al.*, 2017), de Cerise (Colak *et al.*, 2005) et du kaki (Navarro *et al.*, 2014), ou alcalin telles que les PPOs : de banane (Ünal, 2007) et du litchi (Liu *et al.*, 2007). Le pH optimal de la PPO dépend fortement de la source de l'enzyme (Yoruk et Marshall, 2003). Cependant, d'autres facteurs peuvent également influencer le pH optimal de la PPO, tels que la nature du substrat utilisé (Arslan *et al.*, 2004; Cheema et Sommerhalter, 2015), le stade de maturation (Ayaz *et al.*, 2008), la présence d'iso-enzymes (Şener et Ünal, 2011) et la forme de l'enzyme (latente ou active) (Han *et al.*, 2019). En fait, la forme latente de l'enzyme peut avoir un pH optimal plus acide par rapport à la forme active (Molitor *et al.*, 2015).

3.3. Effet de la température

La température est un autre facteur important de la réaction enzymatique. La vitesse de cette dernière augmente généralement avec l'augmentation de la température jusqu'à une température optimale, et seulement la déstabilisation ou la dénaturation de la structure tridimensionnelle des enzymes à haute température limite cette progression (Bisswanger, 2014). Ainsi, pour étudier l'effet de la température sur la PaPPO, nous avons dosé l'activité PaPPO sur une plage de température entre 5 et 90 °C (Figure 17).

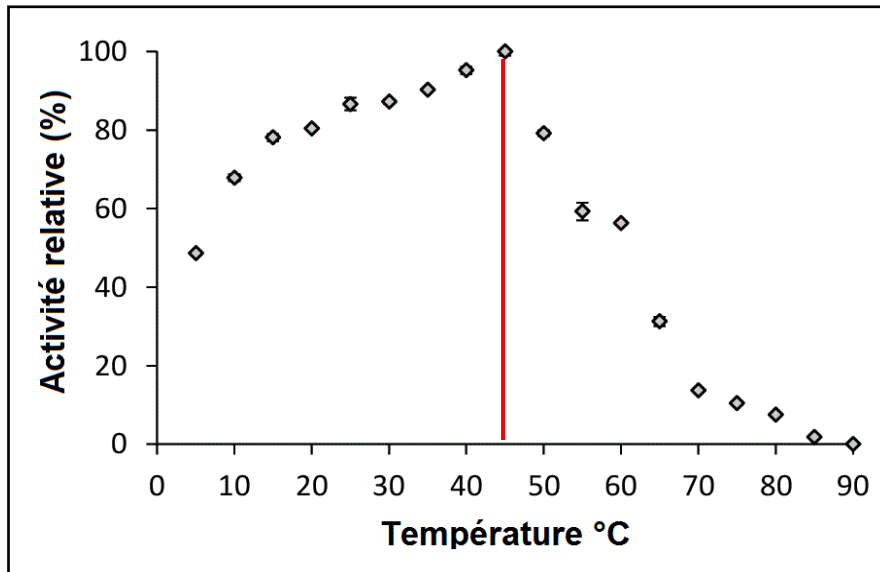


Figure 17. Effet de la température sur l'activité *PaPPO*.

L'effet de la température sur l'activité *PaPPO* ressemble à l'effet du pH. La vitesse de la réaction enzymatique a augmenté avec l'élévation de la température pour arriver à un maximum à 45 °C (température optimale), suivie d'une diminution progressive jusqu'à une inactivation complète à 90 °C. Ainsi, la *PaPPO* est active dans l'intervalle mesurable de 5 à 85 °C. La diminution de l'activité *PaPPO* a été observée à partir de 50 °C et l'enzyme a perdu 45, 86 et 92% de son activité maximale à 60, 70 et 80 °C, respectivement. La température optimale que nous avons déterminée est semblable à la température optimale (45 °C) de la *PaPPO* (variété Hacihaliloglu) rapportée par Yemenicioğlu et Cemeroğlu (2003). Cependant, les travaux de Ünal et Şener (2016) ont rapporté une température optimale inférieure (30-40°C) pour la *PaPPO* (variété Alyanak), en utilisant le catéchol comme substrat. La comparaison de nos résultats avec d'autres espèces a montré que la PPO de litchi a une activité optimale dans la même température (45 °C), en utilisant le (-)-épicatéchine comme substrat (Liu *et al.*, 2007). La température optimale de l'activité PPO est généralement entre 30 et 40 °C (Yang *et al.*, 2000; Nagai et Suzuki, 2001; Dincer *et al.*, 2002; Aydin *et al.*, 2015; Siddiq et Dolan, 2017). Plusieurs facteurs sont responsables de la variation de la température optimale des PPOs, tels que les conditions environnementales dans lesquelles le fruit pousse, l'espèce, la variété, ainsi que la nature du substrat et du tampon utilisés (Yoruk et Marshall, 2003; Doğan *et al.*, 2005; Goyeneche *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015).

3.4. Inactivation thermique

Les résultats de l'effet des traitements thermiques à diverses températures (50 à 100 °C) pendant des durées croissantes de 2 à 30 min sur l'activité *PaPPO* sont présentés sur la Figure 18.

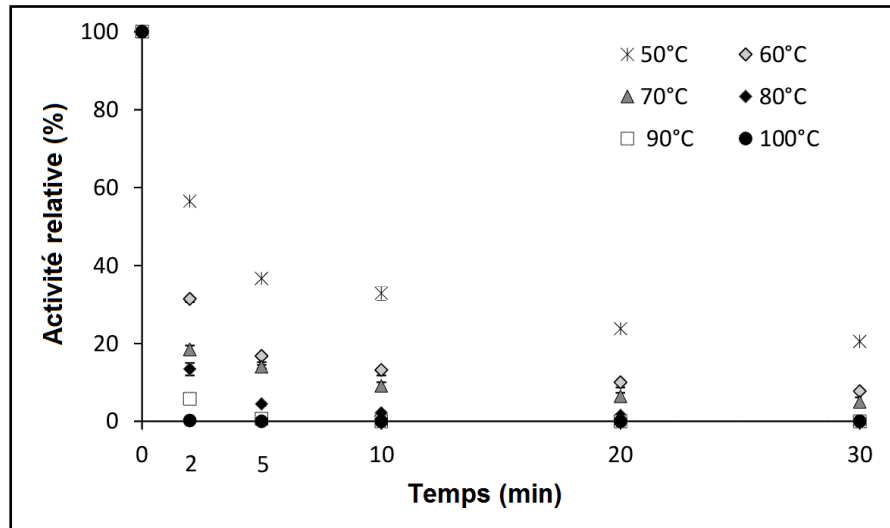


Figure 18. Inactivation thermique de la *PaPPO*.

Les PPOs comme toutes les enzymes sont sensibles aux traitements thermiques, qui provoquent leur dénaturation irréversible. Le processus de dénaturation dépend à la fois de la température appliquée, de la durée du traitement et de l'enzyme en question. Ainsi, les résultats enregistrés montrent clairement que l'activité *PaPPO* diminue progressivement avec l'augmentation de la température et de la durée d'incubation. Les traitements thermiques ≥ 60 °C ont affecté considérablement la *PaPPO*, où cette dernière a conservé seulement 31, 18, 13 et 6% de son activité après 2 min d'incubation à 60, 70, 80 et 90 °C, respectivement. De même, plus de 90% de l'activité *PaPPO* a été perdue après 10 min d'incubation à 70 °C. En outre, la *PaPPO* a été complètement inactivée après incubation pendant 30, 10 et 2 min à 80, 90 et 100 °C, respectivement. Ces résultats sont comparables à ceux de Yemenicioğlu et Cemeroğlu (2003), qui ont rapporté une perte d'activité de 95% pour la *PaPPO* (variété Kabaasi) après 10 min d'incubation à des températures ≥ 80 °C (en utilisant le catéchol comme substrat). Cependant, leur enzyme a été plus stable à 70 °C. La PPO de prune (Siddiq *et al.*, 1996) (espèce du même genre « *Prunus* ») a montré une stabilité thermique similaire à 55 °C, où l'enzyme n'a conservé que 50% de son activité après 5 min d'incubation. La PPO de myrtille (Siddiq et Dolan, 2017) a également montré un comportement similaire à 85 °C, où elle n'a conservé que 3% de son activité après 2 min d'incubation.

Par ailleurs, les travaux sur la fraise (Serradell *et al.*, 2000) et la nèfle (Dincer *et al.*, 2002) ont montré que leurs PPOs sont relativement thermostables par rapport à la *PaPPO*, car elles ont conservé plus de 60% de leur activité après 30 min d'incubation à 50 °C. Cependant, la *PaPPO* est moins thermolabile par rapport à la PPO de pomme de terre (Duangmal et Aparenten, 1999), qui a été complètement inactivée après 10 min d'incubation à 70 °C.

3.5. Spécificité de substrat et cinétique enzymatique

Les tests d'activité avec les différents substrats phénoliques ont montré que l'enzyme purifiée (*PaPPO*) est activée dans le milieu réactionnel en contact avec le substrat sans l'ajout d'un activateur externe (comme le SDS). Cette activation peut être attribuée à l'acidité du milieu réactionnel (pH 4,5). L'activation de la forme latente de la PPO dans un pH acide a été déjà signalée dans plusieurs travaux (Kenten, 1957; Cabanes *et al.*, 2007; Molitor *et al.*, 2015). Ainsi, nous avons étudié la spécificité de substrat de la *PaPPO* en utilisant 9 substrats phénoliques (2 monophénols, 6 diphénols et un triphénol) sans l'ajout d'activateur. L'activité *PaPPO* est rapportée en pourcentage d'activité résiduelle par rapport à l'activité *PaPPO* avec le catéchol (100%) (Tableau 08).

Tableau 08. Spécificité de substrat de la *PaPPO*.

Substrat	Concentration (mM)	λ (nm)	$\varepsilon(\lambda)$ ($M^{-1} cm^{-1}$)	Activité relative (%)
Monophénols				
Phénol	10	426	4300	0,0 ± 0,00
Tyramine	10	395	1500	0,0 ± 0,00
Diphénols				
Acide chloroginique	10	475	511	738,70 ± 5,4
4-Methylcatéchol	10	400	1720	378,48 ± 12
Catéchol	10	426	4300	100,0 ± 0,71
Acide caféique	1	481	591	336 ± 0,65
L-Dopa	1	392	1240	5,47 ± 0,33
Dopamine	10	395	1500	8,85 ± 0,80
Triphénol				
Pyrogallol	10	457	926	181,25 ± 3,9

Les résultats présentés dans le Tableau 08 montrent que la *PaPPO* est dotée d'une forte activité catéchol-oxydase. L'activité *PaPPO* la plus élevée est enregistrée avec l'acide chlorogénique, puis le 4-méthylcatéchol, l'acide caféique, le pyrogallol et le catéchol. En outre, l'activité la plus faible est enregistrée avec la dopamine et la L-dopa comme substrats. L'acide chlorogénique et le 4-méthylcatéchol sont souvent rapportés comme des substrats préférés par les PPOs de plusieurs espèces, telles que la PPO de café (Mazzafera et Robinson, 2000) et de pomme (Marrufo-Hernández *et al.*, 2017). De plus, l'acide chlorogénique est le composé phénolique majeur d'abricots (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2007), ce qui peut expliquer l'efficacité catalytique élevée de la *PaPPO* avec ce substrat.

Par ailleurs, aucune activité n'a été détectée avec les substrats monophénoliques (phénol et tyramine), ce qui suggère que la forme latente de la *PaPPO* est dépourvue de l'activité monophénolase. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Arslan *et al.* (1998) et de Yemenicioğlu et Cemeroğlu, (2003), qui ont rapporté l'absence de l'activité monophénolase chez la *PaPPO* en utilisant l'hydroquinone et le *p*-crésol comme substrats. De même, plusieurs études ont signalé l'absence de l'activité monophénolase chez les PPOs isolées des fruits telles que la PPO de sapote (Palma-Orozco *et al.*, 2011) et la PPO de myrtille (Siddiq et Dolan, 2017). Cependant, certains rapports ont attribué cette absence à la latence de l'enzyme et non à son mécanisme catalytique, où le site actif de la forme latente est bloqué par le C-terminal, ce qui ne lui permet pas de catalyser les substrats monophénoliques qu'après activation (par élimination du C-terminal) (Laveda *et al.*, 2001; Kampatsikas *et al.*, 2017, 2019).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons testé l'activité monophénolase de la *PaPPO* active (après auto-activation) et nous avons pu détecter une légère activité monophénolase ($0,0724\% \pm 0,0010\%$) en utilisant la tyramine comme substrat. Malgré cette très faible activité par rapport à la forte activité diphénolase, ces résultats confirment que la *PaPPO* possède une activité monophénolase, ainsi elle peut assurer la réaction d'hydroxylation des monophénols. Cependant, il faut noter que la détection de l'activité monophénolase nécessite l'utilisation d'une grande quantité d'enzyme ($\geq 10 \mu\text{g}$) et une longue durée de suivi (1 à 3 heures) (Figure 19).

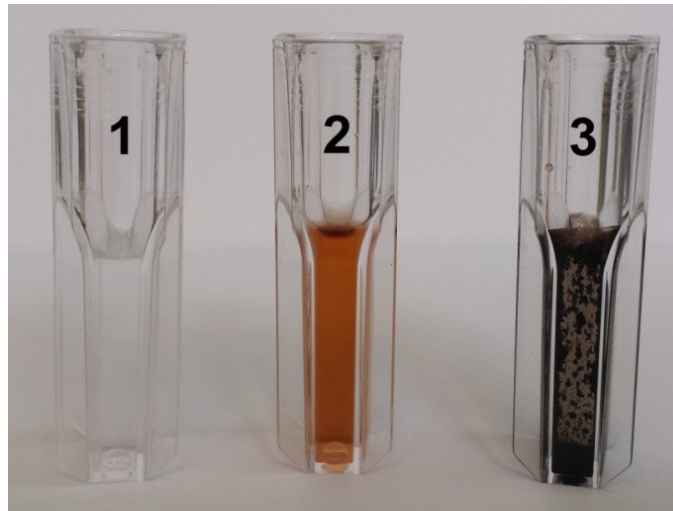


Figure 19. Cuvettes de l'activité monophénolase de l'A-*PaPPO* avec la tyramine (4 mM).
 (1) test à blanc, (2) test d'activité monophénolase après 3 heures, (3) test d'activité monophénolase après un jour,
 (3) formation des mélanines après un jour de réaction.

Les substrats (catéchol, 4-méthylcatéchol, acide chlorogénique et pyrogallol) avec lesquels la *PaPPO* a montré une grande affinité ont été sélectionnés pour mesurer quelques paramètres de la cinétique enzymatique (K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m). Le K_m et le k_{cat} . Ces paramètres ont été calculés par régression non linéaire en utilisant diverses concentrations de substrats (Figure 20). De même, et afin d'évaluer l'efficacité catalytique de chaque substrat nous avons calculé le rapport k_{cat}/K_m . Les résultats sont présentés dans le Tableau 09.

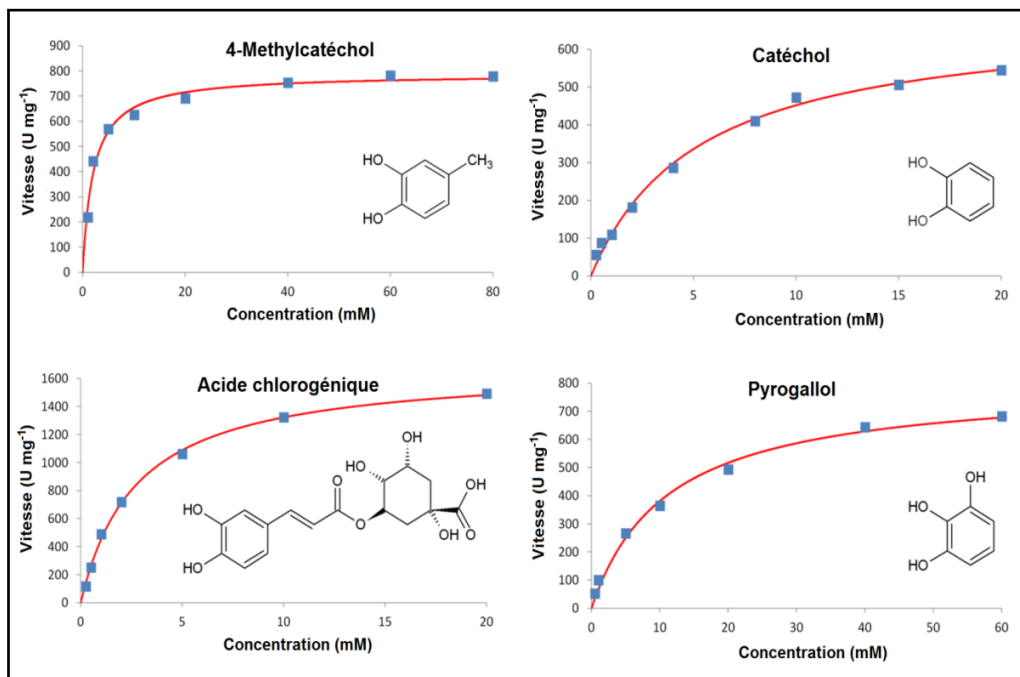


Figure 20. Diagrammes de Michaelis-Menten des substrats testés.

Tableau 09. Paramètres de la cinétique enzymatique de la *PaPPO*.

Substrat	K_m (mM)	k_{cat} (S^{-1})	k_{cat}/K_m ($S^{-1} mM^{-1}$)
Catéchol	$5,3 \pm 0,60$	220 ± 30	40 ± 10
Acide chlorogénique	$2,7 \pm 0,16$	1400 ± 210	500 ± 80
4-Méthylcatéchol	$2,0 \pm 0,26$	700 ± 110	340 ± 70
Pyrogallol	$11 \pm 1,50$	590 ± 90	50 ± 10

Les résultats de l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) des substrats testés ont suivi le même ordre obtenu précédemment pour la spécificité de substrat: acide chlorogénique > 4-méthylcatéchol > pyrogallol > catéchol (Tableau 09). De même, la constante de Michaelis (K_m) la plus faible a été enregistrée avec le 4-méthylcatéchol (2 mM), suivi de l'acide chlorogénique (2,7 mM), du catéchol (5,3 mM) et du pyrogallol (11 mM). La valeur de K_m est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme envers le substrat. Ainsi, la *PaPPO* étudiée a présenté plus d'affinité envers le 4-méthylcatéchol et l'acide chlorogénique. Les résultats enregistrés sont proches des valeurs de K_m (6,6 mM avec le catéchol et 1 mM avec l'acide chlorogénique) rapportées, respectivement par Arslan *et al.* (1998) (variété Malatya) et Dijkstra et Walker (1991) (variété Moorpark) pour la *PaPPO*. De même, la comparaison avec d'autres espèces a montré que les valeurs obtenues sont proches de K_m (3,1 mM avec le 4-méthylcatéchol) rapportée par Palma-Orozco *et al.* (2014) pour la PPO de mangue et de K_m (1,5 mM avec l'acide chlorogénique) rapportée par Zhou et Feng (1991) pour la PPO de poire.

3.6. Effet du SDS, des inhibiteurs et des ions métalliques

Afin d'évaluer l'effet de différents effecteurs sur l'enzyme purifiée (*PaPPO*), l'activité *PaPPO* a été mesurée en présence du détergent SDS (activateur), des inhibiteurs et des ions métalliques (sels). La PPO existe dans les tissus végétaux sous forme active et/ou sous forme latente. Cette dernière est souvent inactive ou partiellement active. Ainsi, l'activation complète de la forme latente ne peut être détectée qu'en ajoutant des détergents, des acides gras ou après une protéolyse partielle de l'enzyme latente (Mayer, 1986; Yoruk et Marshall, 2003). Pour cette raison, nous avons déterminé l'activité enzymatique de la *PaPPO* purifiée dans des conditions de dosage normales (en utilisant le catéchol comme substrat) en présence de diverses concentrations de SDS. Les résultats de l'effet du SDS sur l'activité *PaPPO* sont présentés dans la Figure 21.

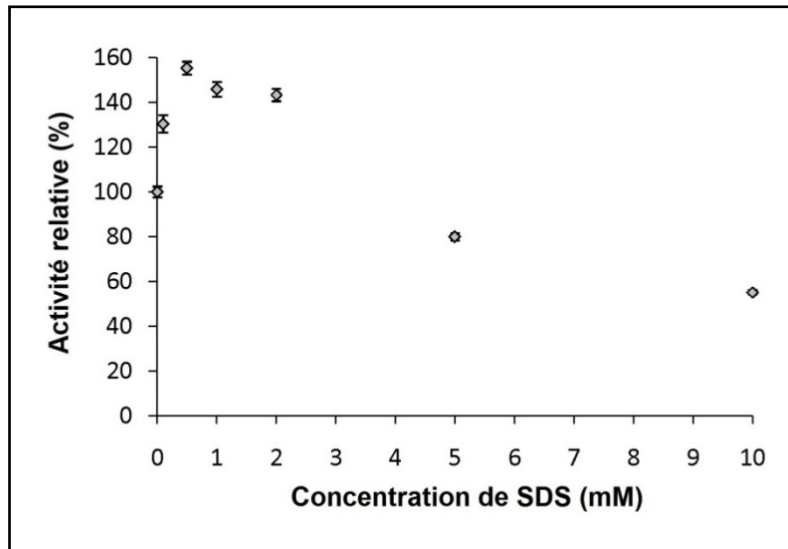


Figure 21. Effet du SDS sur l'activité *PaPPO*.

Les faibles concentrations de SDS (0,1, 0,5, 1 et 2 mM) ont remarquablement amélioré l'activité *PaPPO*. L'activité maximale (155%) a été enregistrée avec 0,5 mM de SDS. Cependant, les concentrations les plus élevées (5 et 10 mM) ont affecté négativement l'activité *PaPPO*, où cette dernière a diminué amplement pour atteindre 55% (avec 10 mM de SDS). L'amélioration (activation) de l'activité *PaPPO* avec le SDS suggère de nouveau que l'enzyme purifiée est la forme latente de la *PaPPO* (*L-PaPPO*). L'activation de la forme latente par le SDS a été rapportée pour la PPO isolée de plusieurs organismes végétaux tels que la banane (Sojo *et al.*, 1998), le café (Mazzafera et Robinson, 2000), la pêche (Cabanes *et al.*, 2007) et les pétales de *C. grandiflora* (Molitor *et al.*, 2015). En outre, l'effet du SDS (3,5mM) sur l'activité PPO de cinq espèces de *Prunus* (pêche, amande, cerise, prune et abricot) a été étudié par Fraignier *et al.* (1995). Ils ont rapporté que l'activité PPO en présence de SDS est 1,5 et 2 fois plus élevée que l'activité PPO sans SDS pour la prune et la cerise, respectivement, avec une légère augmentation de l'activité PPO pour l'amande et l'abricot. Cependant, ils ont observé une légère diminution de l'activité PPO pour la pêche. Cette diminution est peut-être attribuée à la concentration relativement élevée de SDS utilisé dans cette étude (3,5 mM), ce qui a probablement joué le rôle inverse (inhibition). L'augmentation de l'activité PPO en présence de SDS est due à l'activation de la forme latente de la PPO par des changements de conformation (Moore et Flurkey, 1990). L'activation de la PPO par le SDS est généralement détectée avec de faibles concentrations. Ainsi, les concentrations élevées de SDS peuvent provoquer l'effet inverse en diminuant l'activité enzymatique au lieu de l'augmenter (Sojo *et al.*, 1998).

Par ailleurs, nous avons aussi testé l'effet de quelques inhibiteurs sur l'activité *PaPPO* en utilisant quatre concentrations (0,1, 1, 5 et 10 mM). Les résultats sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10. Effet de différents inhibiteurs sur l'activité *PaPPO*.

Inhibiteurs	Activité relative (%)			
	0,1 mM	1 mM	5 mM	10 mM
4-Hexylrésorcinol	34 ± 1,4	11,0 ± 0,66	0,31 ± 0,05	0,0 ± 0,0
Acide ascorbique	89 ± 1,1	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,0
Acide benzoïque	95 ± 2,2	41 ± 1,2	8,3 ± 0,11	5,4 ± 0,49
Acide citrique	100 ± 1,5	93 ± 1,5	88 ± 2,1	80,6 ± 0,87
Acide kojique	65 ± 2,2	28 ± 1,1	7,3 ± 0,47	4,1 ± 0,52
Acide Succinique	99 ± 1,6	94 ± 1,6	90,9 ± 0,80	89,1 ± 0,53
EDTA	99,7 ± 0,45	93,7 ± 0,59	90,3 ± 0,43	88 ± 1,5
L-Glutathion réduit	84,3 ± 0,67	2,5 ± 0,21	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
L-Cystéine	89,3 ± 0,45	0,65 ± 0,07	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Bisulfite de Sodium	72 ± 2,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Tous les inhibiteurs semblent empêcher la formation de mélanines en empêchant la formation d'*o*-quinones ou en réduisant ces derniers à des produits incolores et stables (Yoruk et Marshall, 2003). Cependant, le processus d'inhibition peut impliquer un ou plusieurs mécanismes à la fois, selon l'inhibiteur considéré. Ainsi le taux d'inhibition varie considérablement d'un inhibiteur à l'autre (McEvily *et al.*, 1992).

L'inhibition de la *PaPPO* avec 0,1 mM d'inhibiteurs, a révélé le 4-hexylrésorcinol comme l'inhibiteur le plus efficace, où l'enzyme a conservé seulement 34% de son activité. Contrairement aux autres inhibiteurs testés, le 4-hexylrésorcinol est un inhibiteur compétitif, ainsi l'addition de faibles concentrations de cet inhibiteur modifie la conformation de l'enzyme et empêche la liaison du substrat à l'enzyme (Arias *et al.*, 2007). Toutefois, en augmentant la concentration des inhibiteurs à ≥ 1 mM, nous constatons que le métabisulfite de sodium, l'acide ascorbique et la L-cystéine deviennent les inhibiteurs les plus efficaces de la *PaPPO*, suivis par la L-glutathion réduit, le 4-hexylrésorcinol, l'acide kojique et l'acide benzoïque. En outre, une inhibition complète de la *PaPPO* a été observée avec : 1 mM de métabisulfite de sodium et d'acide ascorbique ; 5 mM de L-cystéine et de L-glutathion réduit ; 10 mM de 4-hexylrésorcinol. Toutefois, l'acide citrique, l'EDTA et l'acide succinique sont les

inhibiteurs les plus faibles, où même avec 10 mM, la PaPPO a conservé 81, 87 et 89% de son activité, respectivement.

Les résultats soulevés dans la présente étude sont en accord avec ceux de Ünal et Şener (2016), qui ont détecté une inhibition complète de la PaPPO avec 1 mM de métabisulfite de sodium et d'acide ascorbique. Le métabisulfite de sodium et l'acide ascorbique sont des agents réducteurs qui inhibent les réactions de brunissement enzymatique en réduisant les quinones formées (après oxydation) à leur état initial (diphenols) (McEvily *et al.*, 1992). Le métabisulfite de sodium peut agir aussi sur l'enzyme elle-même en se liant de manière irréversible aux formes «*met*» et «*oxy*» du site actif (centre di-nucléaire de cuivre) (Golan-Goldhirsh et Whitaker, 1984; McEvily *et al.*, 1992). Le métabisulfite de sodium a été rapporté comme le meilleur inhibiteur de la PPO de plusieurs espèces, parmi lesquelles figurent le poire (Siddiq *et al.*, 1994), la pomme de terre (Duangmal et Apenten, 1999), le raisin (Ünal et Şener, 2006), la sapote (Palma-Orozco *et al.*, 2011) et la mangue (Palma-Orozco *et al.*, 2014). De même, le métabisulfite de sodium, l'acide ascorbique et la L-cystéine ont été signalés comme des inhibiteurs efficaces de la PPO de myrtille (Siddiq et Dolan, 2017). Par ailleurs, Palma-Orozco *et al.* (2014) ont rapporté des valeurs comparables à nos résultats pour la PPO de mangue, où ils ont enregistré une activité résiduelle de 67, 69 et 79% suite à un traitement avec 10 mM d'acide citrique, d'acide succinique et d'EDTA, respectivement.

La PPO est une métallo-enzyme avec un centre di-nucléaire de cuivre, ainsi la présence des ions métalliques dans le milieu réactionnel peut affecter la réaction enzymatique. L'effet de différents ions métalliques sur la PaPPO est regroupé dans le Tableau 11.

Tableau 11. Effet des ions métalliques sur l'activité PaPPO.

Ions métalliques	Activité relative (%)	
	1 mM	10 mM
Mg ²⁺	101,75 ± 1,70	106,76 ± 1,78
Fe ²⁺	50,41 ± 2,56	33,53 ± 1,91
Zn ²⁺	103,28 ± 1,76	108,04 ± 1,90
Cu ²⁺	107,71 ± 1,49	133,78 ± 1,10
K ⁺	86,89 ± 1,41	44,81 ± 2,83
Na ⁺	94,45 ± 1,51	56,44 ± 1,19
Ca ²⁺	77,56 ± 2,52	23,17 ± 1,42
Mn ²⁺	85,11 ± 0,99	22,51 ± 1,25
Ni ²⁺	83,51 ± 2,26	14,85 ± 1,44
Al ³⁺	80,01 ± 2,02	3,67 ± 0,31

La présence de la plupart des ions métalliques testés a affecté négativement l'activité enzymatique. Les ions métalliques tels que l' Al^{3+} , le Ni^{2+} , le Mn^{2+} , le Ca^{2+} et le Fe^{2+} ont inhibé considérablement l'activité *PaPPO*, ainsi avec une concentration de 10 mM, la *PaPPO* a conservé moins de 35% de son l'activité. Cependant la présence des ions Mg^{2+} , Zn^{2+} et Cu^{2+} a stimulé l'activité *PaPPO*. Ainsi, une concentration de 10 mM de Cu^{2+} a amélioré l'activité *PaPPO* à 133,78 %. Des effets similaires ont été observés par Aydin *et al.* (2015) pour la PPO de pomme, où ils ont rapporté une augmentation d'activité (145%) avec 50 mM de Cu^{2+} et une diminution (50%) avec 3,69 mM d' Al^{3+} . De même, l'activité PPO de litchi a été réduite en présence de Fe^{2+} et Na^+ et stimulée en présence Cu^{2+} (Yue-Ming *et al.*, 1997). De plus, l'activité de la PPO de mangue (Palma-Orozco *et al.*, 2014) a été stimulée en présence de Mg^{2+} , cependant, et contrairement à nos résultats, ils ont noté une diminution de l'activité PPO en présence de Cu^{2+} et une augmentation en présence de Zn^{2+} .

Selon Sun *et al.* (2012), les ions métalliques comme le Ca^{2+} peuvent provoquer la répulsion de l'oxygène et donc l'inhibition de l'activité PPO. Cependant, certains ions métalliques peuvent améliorer l'activité PPO en favorisant la liaison du substrat au site actif de l'enzyme (Palma-Orozco *et al.*, 2011).

3.7. Stabilité et auto-activation au cours du stockage

Pour étudier l'effet du stockage à 4 °C sur la stabilité de la *PaPPO* purifiée, nous avons suivi son activité enzymatique avec et sans SDS pendant 4 semaines. Les résultats sont présentés dans la Figure 22.A.

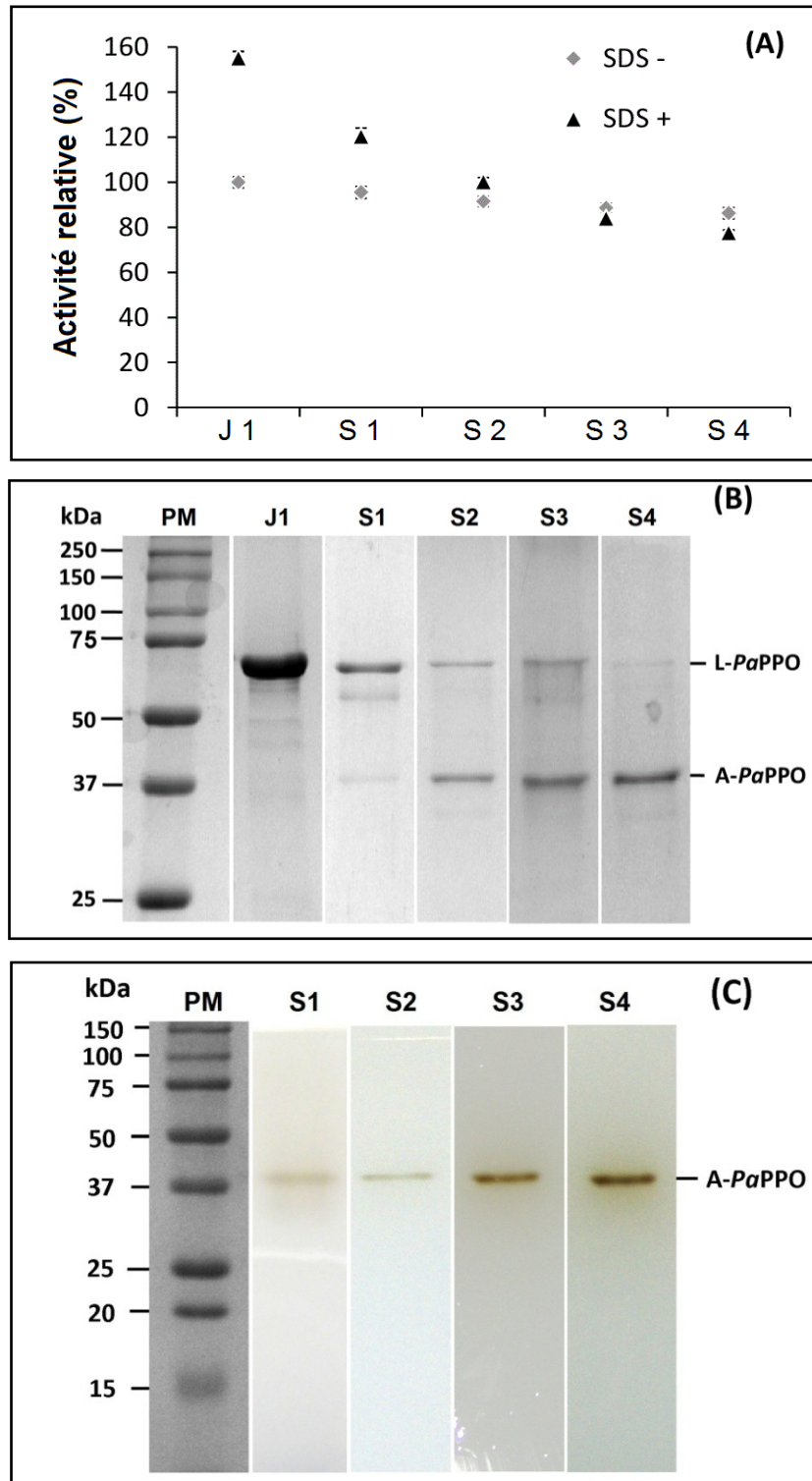


Figure 22. Effet du stockage à 4 °C sur la PaPPO.

(A) activité PaPPO en absence (SDS-) et en présence (SDS +) de 0,5 mM de SDS, (B) SDS-PAGE dénaturante de la PaPPO, (C) zymogrammes de la PaPPO. (PM) marqueurs de poids moléculaire (en kDa), (J1) enzyme fraîchement purifiée, (S1) 1^{ère} semaine de stockage, (S2) 2^{ème} semaine de stockage, (S3) 3^{ème} semaine de stockage, (S4) 4^{ème} semaine de stockage (à 4 °C dans un tampon Tris-HCl (pH 8,0)).

La mesure de l'activité *PaPPO* en présence de SDS montre que l'enzyme a perdu plus de 50% de son activité relative après un mois de stockage, passant de 155% (premier jour de purification) à 78% (4^{ème} semaine de stockage). Cependant, seulement une légère diminution (13%) a été observée pour les mesures d'activité réalisées sans SDS, de 100% (premier jour) à 87% (4^{ème} semaine). De plus, à partir de la troisième semaine de stockage, le SDS est passé d'un activateur à un inhibiteur de la *PaPPO*, ainsi, à la fin de la période du stockage (4^{ème} semaine), une diminution de 10% de l'activité *PaPPO* a été enregistrée pour les mesures d'activité sans SDS (87%) par rapport aux mesures d'activité avec SDS (77%). La perte d'activité pendant le stockage à 4 °C est une observation courante pour les PPOs, où l'enzyme devient moins stable et moins active avec le temps (Nagai et Suzuki, 2001). Cependant, le comportement particulier de l'activité *PaPPO* (avec et sans SDS) que nous avons remarqué pendant le stockage n'a pas été rapporté auparavant. Pour cela et pour mieux comprendre pourquoi la *PaPPO* n'est plus activée en présence de SDS, une SDS-PAGE dénaturante (Figure 22.B) et un zymogramme (SDS-PAGE partiellement dénaturante) (Figure 22.C) ont été réalisées chaque semaine pendant la période du stockage.

Les résultats présentés dans la Figure 22.B, montrent la formation d'une nouvelle bande à 38 kDa (*A-PaPPO*) pendant le stockage. Cette bande est apparue à partir de la première semaine du stockage et elle devient plus épaisse au fil des semaines. En parallèle la bande de l'enzyme purifiée à 63 kDa (*L-PaPPO*) devient plus mince jusqu'à ce qu'elle disparaisse presque totalement après la quatrième semaine (Figure 22.B). Par ailleurs, nous avons détecté une seule bande sur les zymogrammes (Figure 22.C). Cette bande est apparue à 38 kDa, dans la même position que la bande formée sur les gels de SDS-PAGE durant le stockage (*A-PaPPO*). D'après ces résultats, nous pouvons confirmer que la bande apparue à 38 kDa représente la forme active de la *PaPPO* (*A-PaPPO*). Le poids moléculaire de l'*A-PaPPO* est proche du poids moléculaire (43 kDa) rapporté par Fraignier *et al.* (1995) pour la *PaPPO*. Selon Yoruk et Marshall (2003), les PPOs de plantes sont généralement stockées sous forme latente, qui peut être complètement inactive ou partiellement active (Raffert et Flurkey, 1995) (cas de la *L-PaPPO*). Cette forme est composée d'un domaine catalytique d'environ 40 kDa (active) lié à un domaine C-terminal de 15 à 20 kDa (Van Gelder *et al.*, 1997). Donc, l'absence ou la réduction de l'activité PPO chez la forme latente est due principalement au domaine C-terminal qui bloque complètement ou partiellement le site actif de l'enzyme (Marusek *et al.*, 2006).

Ainsi, nos résultats donnent une grande indication sur l'existence de la *PaPPO* dans le fruit (abricot) sous forme latente, une forme partiellement active avec un poids moléculaire de 63 kDa. De même, le suivi du comportement de la *PaPPO* pendant le stockage a révélé que la forme latente peut s'auto-activer spontanément pendant le stockage à 4 °C, générant une forme active avec un poids moléculaire de 38 kDa.

3.8. Masse moléculaire de la forme active

La détermination de la masse moléculaire de la *PaPPO* avec spectrométrie a été possible seulement pour la forme active (*A-PaPPO*) obtenue après auto-activation durant le stockage. Nous supposons que la glycosylation N-terminale de la forme latente est la raison pour laquelle nous n'avons pas pu détecter la masse moléculaire de la forme latente avec spectrométrie de masse. Le spectre de masse (ESI-LTQ) de l'enzyme active (après stockage) est donné dans la Figure 23.A avec une section agrandie de ce spectre (Figure 23.B). Le spectre obtenu indique la présence d'une espèce protéique majeure. Douze pics distincts ont été utilisés pour calculer la masse. Ainsi, en supposant que les états de charges positifs sont uniquement causés par la fixation de protons, la masse moléculaire moyenne évaluée est de $37\,455,6 \pm 0,9$ Da. Ces résultats confirment les résultats obtenus par SDS-PAGE (38 kDa) et indiquent que la forme latente (*L-PaPPO*) a été convertie en forme active (*A-PaPPO*) après un mois de stockage à 4 °C.

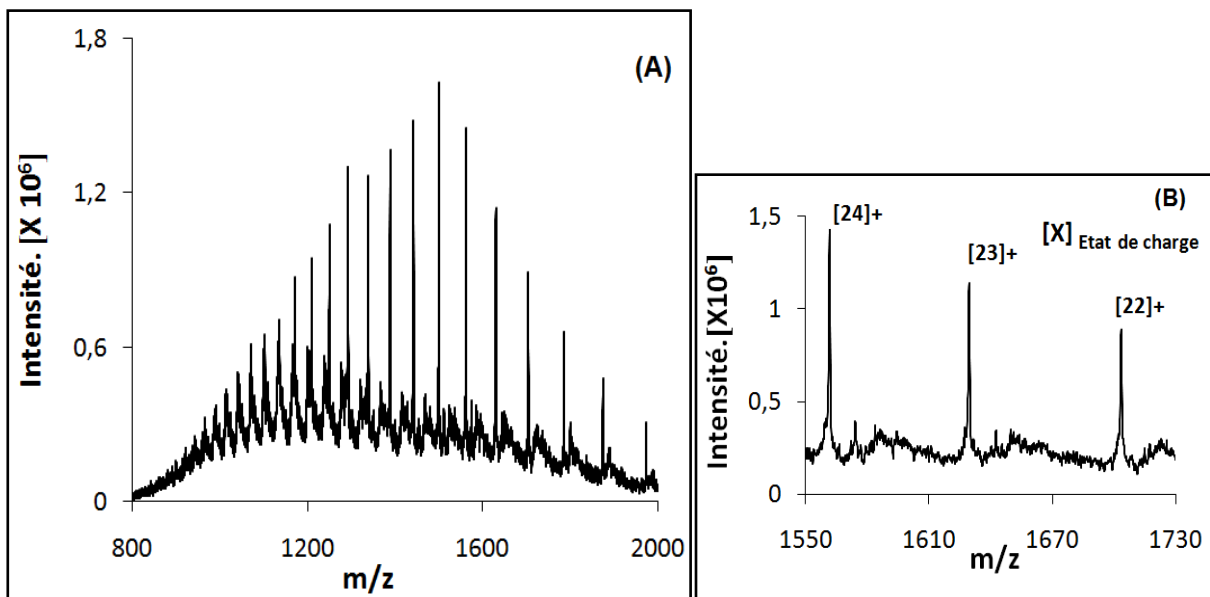


Figure 23. Spectres de masses (ESI-LTQ Orbitrap Velos MS) de l'*A-PaPPO*.

(A) Spectre de masse complet de l'*A-PaPPO*. (B) Section zoomée du spectre $[M + 22H]^{22+}$ à $[M + 24H]^{24+}$.

3.9. Identification de la séquence par cartographie des digestats peptidiques

Afin d'identifier et de confirmer la séquence peptidique de la *PaPPO* purifiée, les bandes des deux formes de l'enzyme (*L-PaPPO* et *A-PaPPO*) ont été soumises à une digestion trypsique. Les masses des peptides obtenues sont comparées avec la liste de masses théoriques obtenues par digestion *in silico* de la *PaPPO* de la banque de données UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/O81103>). Les peptides identifiés sont présentés dans les Tableaux 12 et 13.

Tableau 12. Liste des séquences peptidiques identifiées de la *L-PaPPO* (Asp¹⁰²→Ser⁵⁹⁷).

	Positions	Séquences des peptides identifiées	Masse (Da)
Peptides du domaine actif	135 - 147	K.IKTFKPDLSIPLR.T	1527.92
	137 - 147	K.TFKPDLSIPLR.T	1286.74
	172 - 180	R.ALPDDDDPR.S	898.42
	172 - 186	R.ALPDDDDPRSMVQQAQ.V	1686.80
	220 - 227	R.MYLYFYER.I	1184.54
	270 - 286	R.NADHQPPVLVDLSYGGK.D	1809.91
	270 - 295	R.NADHQPPVLVDLSYGGKDDDDVDEQTR.I	2883.33
	270 - 305	R.NADHQPPVLVDLSYGGKDDDDVDEQTRIDENLAIMYR.Q	4101.95
	287 - 305	K.DDDVDEQTRIDENLAIM(+15.99)YR.Q	2327.03
	296 - 305	R.IDENLAIMYR.Q	1237.62
	306 - 323	R.QMVSGAKTPDLFFGHAYR.A	2025.00
	313 - 323	K.TPDLFFGHAYR.A	1323.64
	381 - 386	R.MWNIWK.T	877.43
	419 - 427	K.VRDSLEPEK.Q	1072.56
	419 - 430	K.VRDSLEPEKQLR.Y	1469.80
421 - 430	R.DSLEPEKQLR.Y	1214.63	
Peptides du domaine C-terminal	431 - 448	R.YNYEPVSLPWLFTKPTAR.K	2182.10
	458 - 466	K.VAATQLTSK.F	918.52
	458 - 485	K.VAATQLTSKFPATLVEVTTVEVARPKPR.K	3009.71
	467 - 485	K.FPATLVEVTTVEVARPKPR.K	2110.20
	490 - 502	K.KEKVDEEELLIK.D	1585.90
	491 - 502	K.EKVDEEELLIK.D	1457.81
	491 - 513	K.EKVDEEELLIKDIEFEGTEAVK.F	2676.38
	493 - 502	K.VDEEELLIK.D	1200.67
	493 - 513	K.VDEEELLIKDIEFEGTEAVK.F	2419.25
	503 - 513	K.DIEFEGTEAVK.F	1237.59
	503 - 527	K.DIEFEGTEAVKFDVFINDDAESLR.R	2846.34
	514 - 527	K.FDVFINDDAESLR.R	1627.76
	514 - 528	K.FDVFINDDAESLRR.D	1783.86
	528 - 544	R.RDKSEFAGSFVHVPQGK.T	1888.96
	529 - 544	R.DKSEFAGSFVHVPQGK.T	1732.86
	529 - 547	R.DKSEFAGSFVHVPQGKTTK.A	2063.05
	531 - 544	K.SEFAGSFVHVPQGK.T	1489.74
	556 - 580	K.LGITDLEDLGAEDDSSVLVTLVPR.V	2640.39
581 - 592	R.VSNSPITIGGFK.I	1219.66	
581 - 597	R.VSNSPITIGGFKIEYSS	1798.92	

Tableau 13. Liste des séquences peptidiques identifiées de l’A-*Pa*PPO (Asp¹⁰²→Arg⁴³⁰).

	positions	Séquences des peptides identifiées	Masse (Da)
Peptides du domaine actif	135 - 147	K.IKTFKPDLSIPLR.T	1527.92
	137 - 147	K.TFKPDLSIPLR.T	1286.74
	172 - 186	R. ALPDDDP RSMVQQAK.V	1686.80
	220 - 227	R. MYLYFYER.I	1184.54
	270 - 286	R.NADHQPPVLVDLSYGGK.D	1809.91
	270 - 295	R.NADHQPPVLVDLSYGGKDDDVDEQTR.I	2883.33
	296 - 305	R.IDENLAIMYR.Q	1237.62
	313 - 323	K.TPDLFFGHAYR.A	1323.64
	381 - 386	R. MWNIWK.T	877.43
	419 - 430	K. VRDSLEPEKQLR.Y	1469.80

Les PPOs de plantes sont synthétisées sous forme d’un précurseur protéique (pro-enzyme) d’environ 65 à 68 kDa (Figure 24). Ce précurseur est formé de trois domaines: un peptide de transit N-terminal (~ 4-9 kDa), un domaine catalytiquement actif (~ 40 kDa) et un domaine C-terminal (~19 kDa) (Koussevitzky *et al.*, 1998). Le précurseur de la *Pa*PPO est un polypeptide de 597 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 67,1 kDa et la protéine mature est composée de 496 acides aminés (Asp102 → Ser597) avec une masse moléculaire calculée de 56,2 kDa (Chevalier *et al.*, 1999). Toutefois, aucune information n’est disponible sur la masse moléculaire et la position du domaine catalytique de la *Pa*PPO.



Figure 24. Séquence de la *Pa*PPO (UniProt O81103).

Surbrillance pêche, peptide de transit N-terminal. Surbrillance vert, domaine catalytique (*A-Pa*PPO). Surbrillance jaune, Domaine C-terminal. Les crochets indiquent le début et la fin de la *L-Pa*PPO. La ligne verticale rouge indique le site du clivage (la fin de l’*A-Pa*PPO et le début du C-terminal). Les peptides identifiés par UHPLC-ESI-MS/MS pour la *L-Pa*PPO et l’*A-Pa*PPO sont soulignés en bleu et en pourpre, respectivement.

La masse moléculaire de la A-*PaPPO* (37 455,6 Da) déterminée par spectrométrie de masse (ESI-LTQ) correspond parfaitement à la masse du polypeptide Asp102 → Leu429 avec un pont thioester (Lerch, 1982) et deux ponts disulfure, contenant les cinq cystéines présentes dans la chaîne peptidique (Figure 24). Ceci nous a permis de déterminer le site du clivage (Leu429-Arg430) au niveau de la séquence peptidique, qui sépare le domaine catalytique (forme active) et la partie C-terminale.

D'après les résultats obtenus, nous avons identifié la *PaPPO* latente purifiée (L-*PaPPO*) à 63kDa comme la *PaPPO* (UniProt O81103), avec une couverture de séquence de 48,87% (*PaPPO* (Asp102 → Ser597)) et un total de 36 peptides identifiés (Tableau 12) : 16 peptides dans le domaine catalytique et 20 peptides dans la partie C-terminale. Les peptides de la L-*PaPPO* sont soulignés en bleu dans la Figure 24 et regroupés dans le Tableau 12.

De même, pour la forme active (A-*PaPPO*), nous avons obtenu une couverture de séquence de 41,4% (*PaPPO* (Asp102 → Leu429)), ainsi, tous les peptides identifiés (12 peptides) sont dans la région du domaine catalytique et aucun peptide n'a été identifié dans la partie C-terminale au-delà de l'Arg430. La présence de l'Arg430 dans le dernier peptide identifié peut fournir une indication sur l'élimination (clivage) du domaine C-terminal de l'enzyme, qui peut se faire dans plusieurs sites de clivage au niveau du peptide lieur. Cette observation a également été rapportée par Zekiri *et al.* (2014) pour la PPO des feuilles de noyer. Les peptides identifiés de la A-*PaPPO* sont soulignés en cramoisi dans la Figure 24 et regroupés dans le Tableau 13. La comparaison de la séquence de notre enzyme identifiée avec d'autres séquences de PPOs du genre *Prunus* a montré que la *PaPPO* (UniProt O81103) présente une similarité de 96,65% et 94,14% avec la PPO d'abricot japonais (*Prunus mume*; GenBank 645236994) et de pêche (*Prunus persica*; UniProt I1U4K7), respectivement.

4. Électrophorèse sur gel et zymographie des préparations de protéases

Les préparations de protéases végétales de la papaïne, la calotropaine, la ficine et la bromélaïne ont été analysées par SDS-PAGE. Le gel obtenu est présenté dans la Figure 25.A. De même, une zymographie a été réalisée à pH 4,5 et 7,0 afin de vérifier l'activité protéolytique des différentes préparations de protéases. Les zymogrammes obtenus sont présentés dans la Figure 25.B.

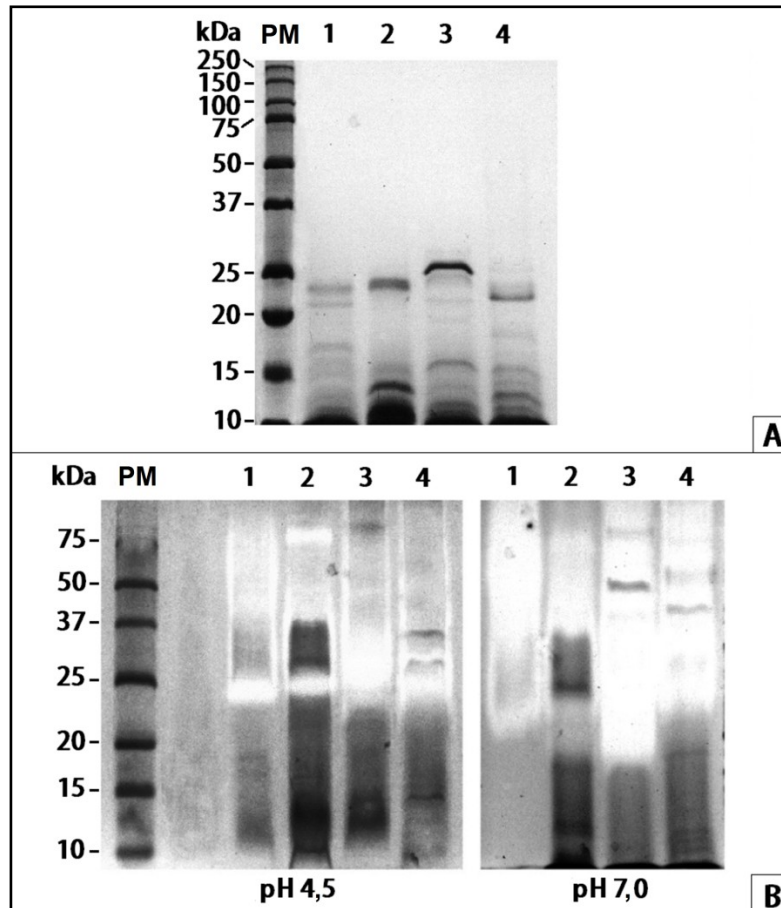


Figure 25. Electrophorèse des préparations de protéases.

(A) SDS-PAGE de préparations de protéases : PM, marqueurs de poids moléculaire ; 1, papaïne ; 2, calotropaine ; 3, ficine ; 4, bromélaïne. (B) Zymogrammes de préparations de protéases à pH 4,5 et 7,0: PM, marqueurs de poids moléculaire ; 1, papaïne ; 2, calotropaine ; 3, ficine ; 4, bromélaïne.

La SDS-PAGE dénaturante des différentes préparations de protéases montre clairement l'existence des bandes de protéines apparentes avec des poids moléculaires compris entre 23 et 27 kDa. Ainsi, aucune bande claire n'est observée au-delà de 27 kDa. Les poids moléculaires des principales bandes observées sont : 23,7, 24,5, 26,5 et 23 kDa pour la papaïne, la calotropaine, la ficine et la bromélaïne, respectivement. Ces poids sont compatibles avec les valeurs rapportées dans la bibliographie pour la papaïne (23 kDa) (Mathew et Juang, 2005), la calotropaine (25-26 kDa) (Ramos *et al.*, 2013), la ficine (27 kDa) (Baeyens-Volant *et al.*, 2015) et la bromélaïne (24 kDa) (Matagne *et al.*, 2017) et se situent dans la fourchette des poids moléculaires généralement rapportés pour les protéases à cystéine (21 - 30 kDa) (Grzonka *et al.*, 2007).

La zymographie des préparations de protéases a été effectuée à pH 4,5 et 7,0 afin d'évaluer l'activité protéolytique des protéases sélectionnées dans le pH optimal de la PaPPO (4,5) et des protéases (7,0) en utilisant la caséine comme substrat. Les zones claires apparues dans les

zymogrammes indiquent une activité protéolytique. Ainsi, la caséine non digérée par les protéases est responsable du noircissement du gel (Garcia-carreno *et al.*, 1993). Le zymogramme préparé à pH 4,5 montre des activités protéolytiques dans plusieurs zones, où toutes les préparations de protéases contiennent plus d'une protéine capable de produire une zone d'activité (éclaircissement). Ceci est une observation courante pour les zymogrammes préparés avec des extraits bruts de protéase (Lantz et Ciborowski, 1994). Les préparations de protéases végétales sélectionnées contiennent généralement plus d'une protéase, et la même protéase peut avoir plusieurs iso-formes (Grzonka *et al.*, 2007; Gonzalez-Rabade *et al.*, 2011). Cependant, les principales zones d'activité sont détectées à des poids moléculaires entre 22 à 27 kDa, ce qui est compatible avec les poids moléculaires des bandes observées sur le gel de SDS-PAGE (dénaturante). Par ailleurs, les zones d'activité détectées sur le zymogramme préparé à pH 7,0 sont plus intenses, ce qui a rendu difficile, le positionnement des bandes et la détermination des poids moléculaires. Cela peut s'expliquer par l'augmentation de l'activité protéolytique dans ces conditions de pH, où la papaïne (Homaei *et al.*, 2010), la calotropaïne (Freitas *et al.*, 2007) la ficine (Devaraj *et al.*, 2008) et la bromélaïne (Harrach *et al.*, 1998) sont optimalement actives dans un pH neutre. De même, cette différence d'intensité entre les zones d'activité à pH 7,0 et 4,5 peut être attribuée à l'agglomération des caséines à pH 4,5 (Post *et al.*, 2012), ce qui a réduit probablement leur hydrolyse par les préparations de protéases.

D'après ces résultats, nous avons confirmé la présence de protéases actives dans nos extraits. L'activité protéolytique des préparations de protéases est plus élevée à pH 7,0. Cependant, toutes les préparations de protéases ont gardé une activité protéolytique importante à pH 4,5, permettant leur utilisation et leur application sur la PaPPO à ce pH acide. La papaïne (Homaei *et al.*, 2010), la ficine (Devaraj *et al.*, 2008), la calotropaïne (Freitas *et al.*, 2007; Anusha *et al.*, 2014) et la bromélaïne (Harrach *et al.*, 1998) ont été trouvées significativement actives à des pH acides, ainsi elles ont été successivement utilisées dans de nombreuses applications alimentaires telles que la coagulation du lait, l'attendrissement de la viande (Grzonka *et al.*, 2007) et la préparation d'oligomères de chitosane (Lin *et al.*, 2002).

5. Protéolyse de la PaPPO

Nous rappelons que la PaPPO a été incubée (15 min et 2 h) avec les différentes protéases afin de tester la capacité de ces derniers à l'hydrolyser à pH 4,5. Après incubation, les mélanges ont été analysés par SDS-PAGE. Les gels obtenus sont présentés dans la Figure 26.

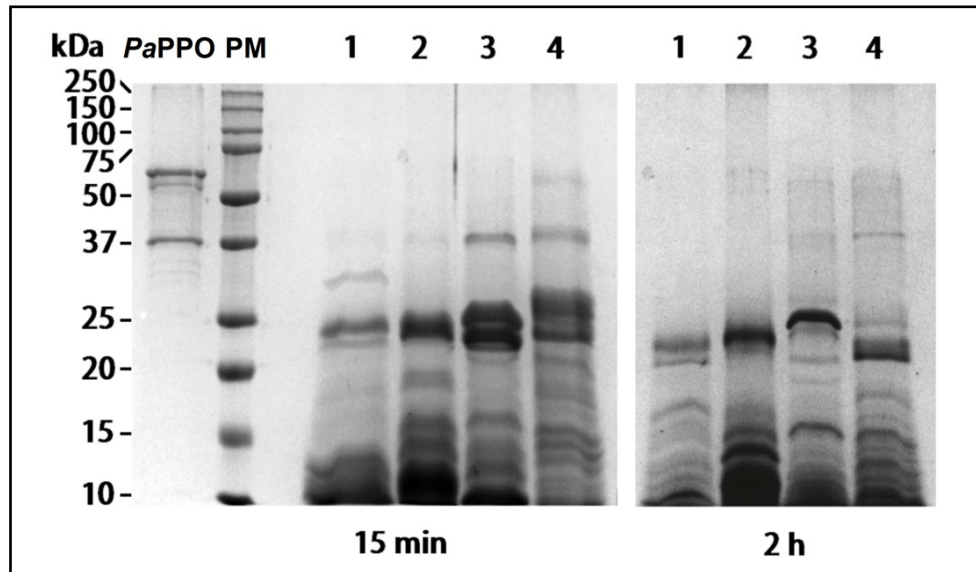


Figure 26. SDS-PAGE de la protéolyse de la *PaPPO* par les préparations de protéases (après 15 min et 2 h d'incubation à pH 4,5).

PaPPO, polyphénol oxydase d'abricot ; PM, marqueurs de poids moléculaire ; 1, papaïne + *PaPPO* ; 2, calotropaine + *PaPPO* ; 3, ficine + *PaPPO* ; 4, bromélaïne + *PaPPO*.

Comme nous l'avons signalé précédemment, la *PaPPO* peut s'auto-activer spontanément pendant le stockage, générant, ainsi, une forme active avec un poids moléculaire de 38 kDa. Cela peut expliquer l'apparition d'une deuxième bande à 38 kDa (forme active) dans la ligne de la *PaPPO* (Figure 26), où une partie de la *L-PaPPO* purifiée a été convertie en *A-PaPPO* (la protéolyse de la *PaPPO* par les préparations de protéases a été réalisée une semaine après la purification de la *PaPPO*). Les gels de SDS-PAGE montrent clairement que les quatre préparations de protéases (papaïne, calotropaine, ficine et bromélaïne) ont la capacité d'hydrolyser la *PaPPO* mais avec des degrés différents, selon la protéase appliquée et le temps d'incubation. Après 15 min d'incubation, les préparations de papaïne et de calotropaine ont presque hydrolysé complètement la *PaPPO*, où la bande de la *L-PaPPO* est entièrement disparue et seulement une légère bande de l'*A-PaPPO* est à peine visible. Cependant, avec la ficine et la bromélaïne, la *PaPPO* n'est que partiellement hydrolysée après 15 min d'incubation, où les bandes de l'*A-PaPPO* sont toujours visibles et presque aussi intenses que la bande de la ligne de la *PaPPO*. Après 2 heures d'incubation, les préparations de protéases ont complètement hydrolysé les deux formes de la *PaPPO* et seulement des traces de l'*A-PaPPO* sont difficilement observées dans la ligne de la *PaPPO* traitée avec de la bromélaïne (ligne 4, Figure 26). Par ailleurs, nous avons remarqué que l'hydrolyse des deux formes (*L-PaPPO* et *A-PaPPO*) par les préparations de protéases ne s'est pas produite de la même manière, où la bande de la *L-PaPPO* a disparu avant la bande de l'*A-PaPPO* malgré que la bande de la *L-PaPPO* a été initialement plus intense (ligne *PaPPO*). Ceci peut être attribué

principalement à une protéolyse limitée de la L-*PaPPO*, donnant naissance à l'A-*PaPPO*. Plusieurs études ont rapporté qu'une protéolyse limitée de la forme latente de la PPO libère le C-terminal et génère la forme active de la PPO (Tolbert, 1973; King et Flurkey, 1987; Robinson et Dry, 1992). Robinson et Dry (1992), ont rapporté que la PPO latente de l'haricot est plus sensible au clivage protéolytique à l'extrémité C-terminale. Leurs travaux ont montré qu'en présence des protéases, la forme latente de 60 kDa est clivée, donnant naissance à une forme active de 45 kDa. Cela suggère qu'au départ, les protéases attaquent les chaînes peptidiques exposées de la L-*PaPPO*, libérant ou hydrolysant ainsi le domaine C-terminal, ce qui conduit à la génération de l'A-*PaPPO*. Toutefois, les bandes de l'A-*PaPPO*, sont elles même disparues après 2 heures d'incubation. Ainsi, l'hydrolyse poussée a entraîné la digestion complète des deux formes de la *PaPPO*, ce qui dévoile l'importance du temps d'incubation pour la dégradation et l'inactivation de la *PaPPO*.

6. Inhibition de la *PaPPO* par les préparations de protéases

La Figure 27 illustre les résultats de l'effet de différentes concentrations (50, 100, 200 et 500 µg) de préparations de protéases (papaïne, calotropaine, ficine et bromélaïne) sur l'activité *PaPPO*.

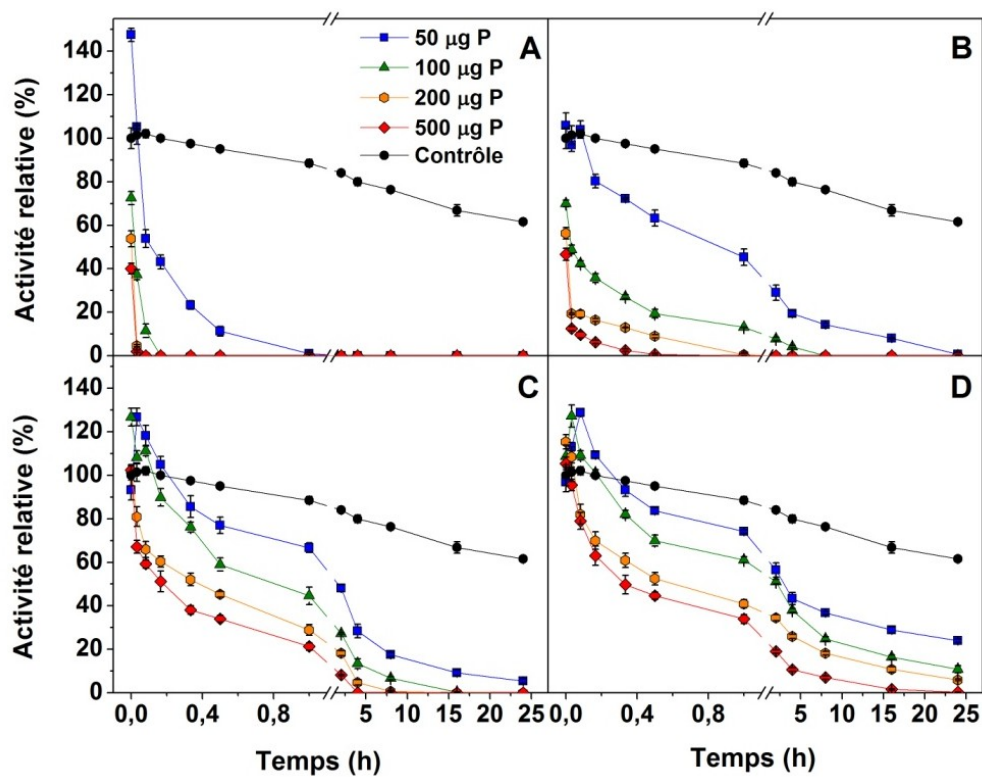


Figure 27. Effet de différentes concentrations de préparations de protéases (P) et du temps d'incubation sur l'activité *PaPPO* à pH 4,5.

A, papaïne ; B, calotropaine ; C, ficine ; D, bromélaïne.

La comparaison de l'activité *PaPPO* en présence et sans protéases (contrôle) montre que les faibles concentrations de protéases ont provoqué une augmentation de l'activité *PaPPO* pendant les premières minutes d'incubation. Ainsi, avec 50 µg de protéases, l'activité enzymatique a augmenté à $148 \pm 3,0\%$ et $106 \pm 5,7\%$ immédiatement, sans incubation, pour la papaïne et la calotropaine, respectivement. De même, l'activité *PaPPO* a augmenté à $127 \pm 4,0\%$ et $129 \pm 1,8\%$ après 2 et 5 min d'incubation pour la ficine et la bromélaïne, respectivement. Nous pouvons attribuer cette augmentation à l'activation de la forme latente de la *PaPPO* suite à une protéolyse limitée par les protéases. Cette hypothèse est compatible avec les résultats obtenus précédemment durant la protéolyse de la *PaPPO* par les préparations de protéases. Des observations similaires ont été rapportées par Tolbert (1973), qui a enregistré une activation de la PPO latente d'épinards (*Spinacia oleracea* L.) après 30 secondes d'incubation avec la trypsine (10-200 µg). Toutefois, l'activité *PaPPO* a commencé à diminuer rapidement en prolongeant la durée d'incubation et/ou en augmentant la concentration des protéases. Ainsi, le taux d'inhibition de la *PaPPO* est proportionnel au temps d'incubation et à la concentration de protéase.

Globalement, toutes les préparations de protéases ont réussi à inhiber la *PaPPO*. Cependant, le degré d'inhibition varie selon la protéase appliquée. Une forte inhibition a été observée avec la papaïne et la calotropaine par rapport à la ficine et la bromélaïne. La papaïne est l'inhibiteur le plus efficace de la *PaPPO*, où après 2 min d'incubation avec 100, 200 et 500 µg, la *PaPPO* a perdu 62, 95 et 98% de son activité, respectivement. De plus, 5 min d'incubation avec 200 µg de papaïne ont été suffisantes pour inhiber complètement la *PaPPO*, ainsi, aucune activité *PaPPO* n'a été détectée après une heure d'incubation, pour toutes les concentrations de papaïne. Ces résultats suggèrent que la papaïne possède une forte activité protéolytique sur la *PaPPO*, ce qui confirme les résultats de la protéolyse sur gel de la *PaPPO* (Figure 26). Pour la calotropaine, une inhibition complète de la *PaPPO* a été achevée en moins d'une heure d'incubation pour les concentrations 200 et 500 µg. Cependant, nous avons détecté une activité résiduelle de 0,69% après 24 heures d'incubation pour la concentration 50 µg. Concernant la ficine, nous avons enregistré une inhibition complète après 24, 16 et 4 heures d'incubation avec 100, 200 et 500 µg, respectivement. En outre, la bromélaïne est l'inhibiteur le plus faible, où aucune inhibition complète n'a été enregistrée pour toutes les concentrations testées durant les 24 heures d'incubation, ainsi, nous avons détecté une activité résiduelle de 24, 11, 5,9 et 0,31% avec 50, 100, 200 et 500 µg de bromélaïne, respectivement.

Selon ces résultats, nous pouvons confirmer qu'une inactivation complète de *PaPPO* par les préparations de protéases n'a pu être achevée que si ces dernières ont bénéficié d'un temps d'incubation nécessaire pour digérer la *PaPPO*. Le temps d'incubation peut durer de quelques minutes à plusieurs heures, selon la concentration et l'activité protéolytique de la protéase appliquée. De plus, une courte période d'incubation peut provoquer l'activation de la *PaPPO* et l'augmentation de son activité. Nous avons aussi comparé l'effet des préparations de protéase sur l'activité *PaPPO* à deux pH différents (7,0 et 4,5), en utilisant la même quantité de protéase (100 µg). Les résultats sont présentés dans la Figure 28.

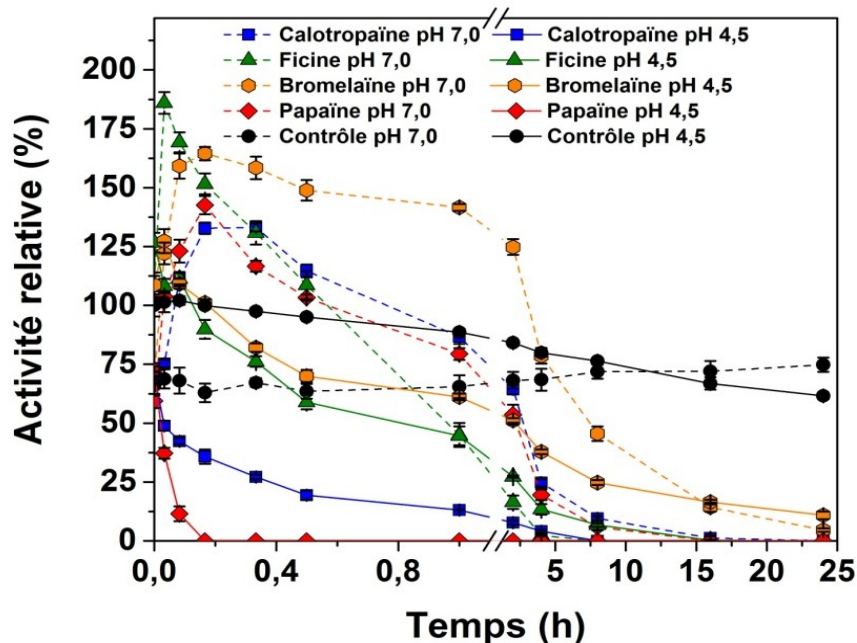


Figure 28. Effet de 100 µg de préparations de protéases et du temps d'incubation sur l'activité *PaPPO* à pH 4,5 et 7,0.

L'inhibition de la *PaPPO* par les préparations de protéases à pH 7,0 montre des profils similaires à son inhibition à pH 4,5. Toutefois, l'ampleur des courbes d'activités montrent clairement que l'activation de la *PaPPO* pendant les premières minutes d'incubation est plus élevée à pH 7,0 qu'à pH 4,5 pour les quatre préparations de protéases. De même, l'inactivation de la *PaPPO* à pH 7,0 est moins efficace par rapport à son inactivation à pH 4,5. Cette différence est probablement attribuée à la différence entre le pH optimal de la forme latente et la forme active de la *PaPPO*. Autrement, l'A-*PaPPO* résultant (après la protéolyse limitée) est plus stable et plus active à pH 7,0. Des observations similaires ont été rapportées par Molitor *et al.* (2015) pour la PPO isolée des pétales de *Coreopsis grandiflora*, où ils ont trouvé que la forme latente et la forme active de la PPO sont optimalement actives à deux pH différents (4,0 et 6,0), respectivement. Similairement, ils ont lié cette différence à l'activation de la forme latente à pH acide (pH 4,0).

7. Inhibition de la PaPPO par l'acide ascorbique

Parmi les inhibiteurs testés dans la partie caractérisation de la PaPPO, nous avons choisi l'acide ascorbique pour le combiner avec les préparations de protéases. En plus de son efficacité comme inhibiteur de la PaPPO, d'autres critères nous ont motivés vers ce choix :

- C'est une vitamine (vitamine C) essentielle et bénéfique pour la santé humaine dotée d'une forte activité antioxydante (Mellidou *et al.*, 2017).
- Il est probablement l'additif alimentaire le moins toxique connu (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005; Mellidou *et al.*, 2017).
- Avec des concentrations modérées, l'AA n'a aucun effet sur le goût ou l'odeur des aliments (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005).
- On peut le considérer comme un agent promoteur de l'activité protéolytique, où les composés réducteurs agissent souvent comme des activateurs des protéases à cystéine (Singleton et Buttle, 2013).

Les résultats de l'inhibition de la PaPPO avec de l'acide ascorbique sont présentés dans la Figure 29.

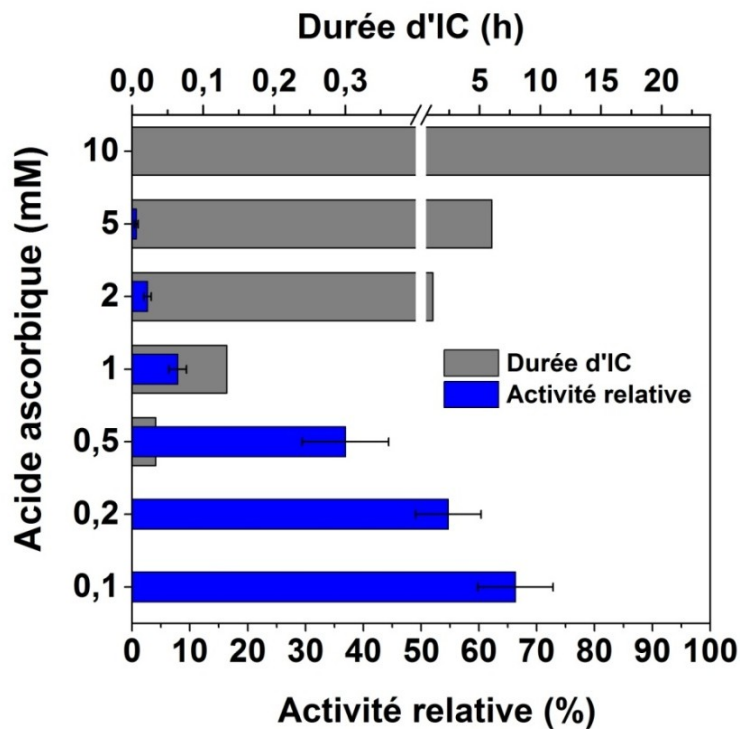


Figure 29. Effet de différentes concentrations d'acide ascorbique sur l'activité PaPPO et le temps d'inhibition complète (IC).

L'effet inhibiteur de l'AA sur le *PaPPO* est proportionnel à la concentration appliquée. Les faibles concentrations (0,1 et 0,2 mM) d'AA, ont diminué l'activité *PaPPO* à $66 \pm 6,5\%$ et $55 \pm 5,7\%$, respectivement. Ainsi, aucune inhibition complète (IC) n'a été enregistrée et le brunissement a commencé immédiatement. Cependant, pour toutes les concentrations d'AA > 0,2 mM, nous avons enregistré une IC de la *PaPPO*. La durée de l'IC augmente avec la concentration d'AA. Les concentrations 0,5, 1 et 2 mM ont assuré une IC pendant 2, 10 et 70 min, respectivement. L'augmentation de la concentration d'AA à 5 mM a inhibé complètement la *PaPPO* pendant plus de 6 heures, suivie seulement d'une légère récupération d'activité ($0,76 \pm 0,31\%$). En outre, 10 mM d'AA ont garanti une IC de l'activité *PaPPO* pendant toute la durée de l'expérience (24 heures).

Ces résultats prouvent que l'inhibition de la *PaPPO* par l'AA est une inhibition temporaire et que ce dernier perd son efficacité au fil du temps, empêchant ainsi le brunissement pour une période limitée, qui dépend de la concentration d'AA utilisée. Gil *et al.* (1998) ont rapporté des observations similaires, où ils ont trouvé que les traitements avec l'AA fournissent seulement une inhibition temporaire du brunissement enzymatique. L'AA inhibe le brunissement enzymatique en réduisant les *o*-quinones formés à leur état diphénolique d'origine. Ainsi, l'activité *PaPPO* est de nouveau détectable une fois toute la quantité d'AA disponible dans le milieu est consommée dans le processus d'inhibition (Arias *et al.*, 2007).

8. Inhibition de la *PaPPO* par combinaison « acide ascorbique/préparations de protéases »

Dans le but d'optimiser l'inhibition de la *PaPPO* avec les préparations de protéases, nous avons combiné ces dernières avec l'AA. Le choix des combinaisons AA/préparations de protéases (AA/P) est basé sur les résultats précédents (inhibition de la *PaPPO* avec l'AA). Ainsi, les concentrations d'AA (5 et 10 mM), qui ont donné une IC > 5 heures ont été écartées des combinaisons AA/P. Les résultats de l'effet des combinaisons AA/P sur la *PaPPO* sont illustrés sur la Figure 30.

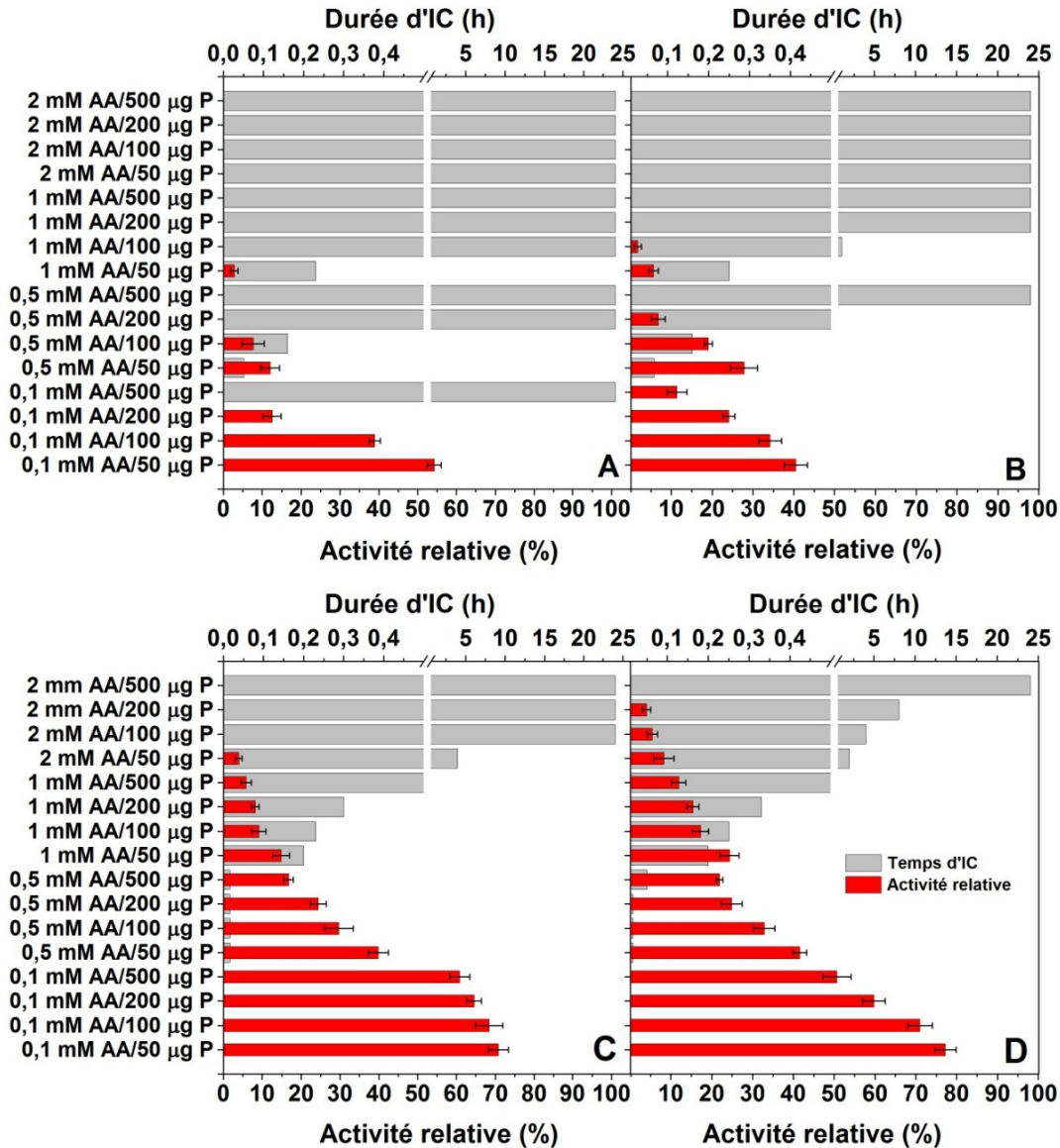


Figure 30. Effet de différentes combinaisons Acide ascorbique/préparation de protéases (AA/P) sur l'activité *PaPPO* et la durée d'inhibition complète (IC).
(A) papaine. (B) calotropaine. (C) ficine. (D) bromélaïne.

L'efficacité des combinaisons AA/P varie considérablement selon la protéase utilisée. La majorité des combinaisons AA/papaine (Figure 29.A) et AA/calotropaine (Figure 30.B) ont garanti une IC de l'activité *PaPPO* durant les 24 heures de suivi, principalement lorsque la papaine et la calotropaine sont combinées avec 1 et 2 mM d'AA. Cependant, lorsque la papaine et la calotropaine sont combinées avec de faibles concentrations d'AA (0,1 et 0,5 mM), l'activité *PaPPO* s'est manifestée très tôt, en particulier pour les combinaisons contenant 50 et 100 µg de préparations de protéases. Cette activité indique que l'AA a été oxydée dans le milieu réactionnel avant que les protéases ne puissent terminer l'inactivation complète de la *PaPPO*.

D'autre part, les combinaisons AA/ficine (Figure 30.C) et AA/bromélaïne (Figure 30.D) ne sont pas aussi efficaces que les combinaisons AA/papaine et AA/calotropaine. Ainsi, nous avons enregistré une IC pendant 24 heures uniquement pour 3 combinaisons d'AA/ficine (2 mM AA/100 µg P, 2 mM AA/200 µg P et 2 mM AA/500 µg P), et une seule combinaison AA/bromélaïne (2 mM AA/500 µg P).

Ces résultats peuvent être justifiés par la faible activité protéolytique de la ficine et la bromélaïne par rapport à la papaine et la calotropaine (Figure 25.B et 26). C'est pourquoi ces deux protéases (ficine et bromélaïne) nécessitent une concentration plus élevée d'AA pour couvrir la période (relativement lente) nécessaire pour une hydrolyse complète de la PaPPO. Cependant, même si certaines combinaisons n'ont pas assuré une IC de la PaPPO pendant 24 heures, elles ont amélioré le temps de l'IC par rapport aux traitements effectués avec uniquement de l'AA. Par exemple, si l'inhibition avec 2 mM d'AA a assuré une durée de l'IC de 1 heure, la combinaison 2 mM AA/50 µg ficine a augmenté cette durée à 4 heures. Cette amélioration est apportée par la protéolyse et l'inactivation d'une partie des PaPPOs par les protéases, ce qui a réduit le nombre des PaPPOs actives, diminuant ainsi également la quantité de *o*-quinones produites, ce qui a indirectement augmenté la durée de l'IC.

9. Effet des combinaisons « acide ascorbique/préparations de protéases » sur le brunissement de la purée d'abricots

A partir de résultats des expériences précédentes, et afin de tester l'efficacité des combinaisons AA/P *in situ* sur la purée d'abricots (obtenue par broyage des fruits dénoyautés), nous avons choisi les concentrations 100 et 500 mg (/100g de purée) d'AA et 10, 50 et 100 mg (/100g de purée) de préparations de protéases pour les combinaisons AA/P à tester. De même, dans le but de comparer l'efficacité des différentes combinaisons, des échantillons contrôles de purée d'abricots, sans additif (non traité) et des purées d'abricots traités avec différentes concentrations d'AA (50, 100, 500 et 1000 mg/100g de purée) sont également analysés.

Le changement des coordonnées colorimétriques (a^* , b^* et L^*) et le changement de la différence de couleur totale (ΔE) pendant la période de suivi sont illustrés dans les Figures 31 et 32, respectivement. De même, et pour mieux évaluer l'efficacité des traitements, une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée sur les paramètres de couleur à la fin de la période de stockage (au 10^{ème} jour) (Tableau 14).

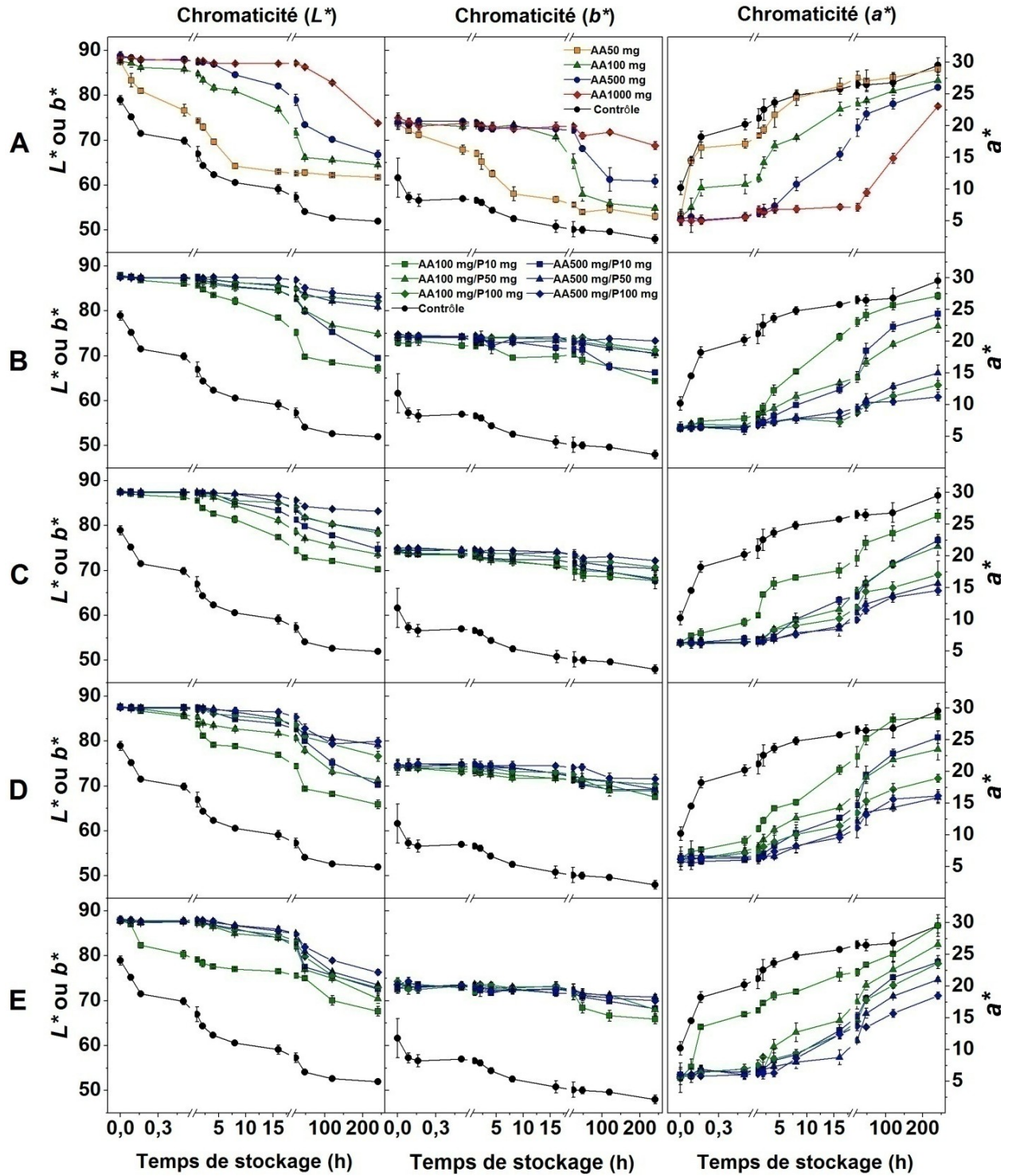


Figure 31. Évolution des chromaticités (a^* , b^* et L^*) des purées d'abricots traitées et non traitées (contrôle) pendant 10 jours de stockage à 4 °C.

(A) échantillons traités avec différentes concentrations d'AA. (B), (C), (D), (E) : échantillons traités avec des combinaisons AA/P (B, AA/papaïne ; C, AA/calotropaine ; D, AA/ficine ; E, AA/broméline).

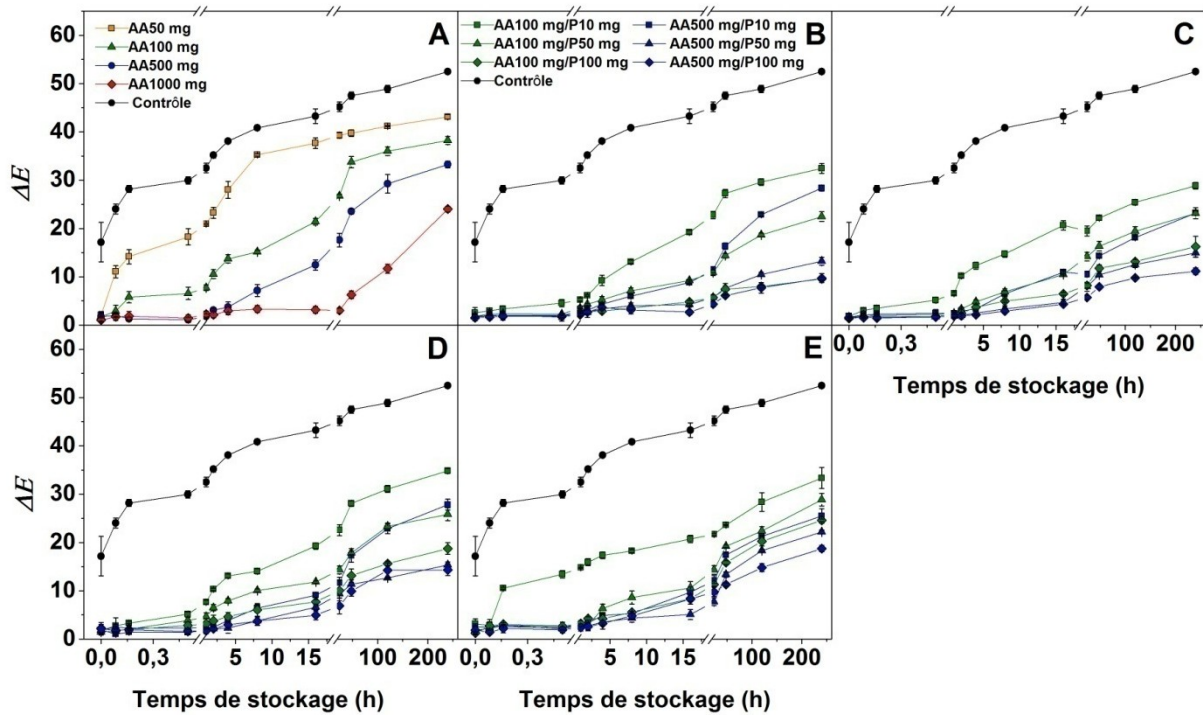


Figure 32. Évolution de la différence de couleur totale (ΔE) des purées d'abricots traitées pendant 10 jours de stockage à 4 °C.

(A) Échantillons traités avec différentes concentrations d'AA. (B), (C), (D), (E) : échantillons traités avec différentes combinaisons d'AA/P (B, AA/papaïne ; C, AA/calotropaine ; D, AA/ficine ; E, AA/bromélaïne).

D'une manière générale, la détection du brunissement par colorimétrie est marquée par une diminution de la luminosité (L^*) et un rougissement (augmentation de a^*), ce qui augmente par conséquent la différence de couleur totale (ΔE). Ainsi, en observant l'aspect global des résultats obtenus durant la période de stockage, nous remarquons que la colorimétrie des purées d'abricots, est marquée par une diminution progressive des valeurs b^* et L^* et une augmentation progressive des valeurs a^* et ΔE , quelque soit le traitement appliqué. Cependant, nous avons signalé des différences importantes entre les différents échantillons. A titre d'exemple, les coordonnées colorimétriques enregistrées pour la purée non traitée, récemment homogénéisée (0 min) sont $a^* = 10 \pm 1,1$, $b^* = 62 \pm 4,3$ et $L^* = 79 \pm 1,0$. Ces valeurs sont significativement différentes des coordonnées colorimétriques respectives de tous les échantillons traités à 0 min (Figure 31). Cette différence reflète un brunissement intense et immédiat dans la purée d'abricots non traité, qui a principalement survécu lors de l'homogénéisation. De plus, le brunissement de la purée non traitée a augmenté (Figure 32), progressivement pendant la durée de stockage. Ainsi, le ΔE est passé de $17 \pm 4,1$ (0 min) à $52,5 \pm 0,23$ après 10 jour de stockage, où 50% de ce brunissement s'est produit dans les 10 premières minutes. En outre, par rapport aux échantillons non traités, le traitement de la purée d'abricots avec seulement de l'AA (100, 500 et 1000 mg) a été efficace pour retarder le

brunissement enzymatique pendant 5, 30 min et 24 heures, respectivement. Cependant, le brunissement s'est manifesté subséquemment par un déclin des chromaticités L^* et b^* et une augmentation de ΔE et de a^* , où l'AA a inhibé le brunissement pendant une durée limitée, ce qui est cohérent avec les résultats de l'inhibition de la PaPPO avec l'AA *in vitro*.

Tableau 14. Paramètres de couleur (a^* , b^* , L^* et ΔE) des échantillons de purée d'abricots traités et non traités après 10 jours de stockage.

Combinaisons		L^*	a^*	b^*	ΔE
AA (mg)	P (mg)				
Contrôle					
-	-	52,1 ± 0,57 ^a	29,5 ± 1,13 ^{klmn}	48,0 ± 0,99 ^a	51,5 ± 0,23 ^m
AA					
50	-	61,8 ± 0,29 ^b	28,9 ± 0,99 ^{mn}	53,0 ± 0,73 ^b	41,9 ± 0,50 ^l
100	-	64,5 ± 0,37 ^c	27,1 ± 0,86 ^{lmn}	54,9 ± 0,46 ^b	38,2 ± 0,82 ^k
500	-	66,7 ± 1,01 ^{cd}	26,0 ± 0,40 ^{kl}	60,9 ± 1,42 ^c	33,3 ± 0,71 ^j
1000	-	73,8 ± 0,25 ⁱ	23,1 ± 0,26 ^{ghij}	68,8 ± 0,85 ^{fghijk}	24,0 ± 0,55 ^{efg}
AA/Papaïne					
100	10	67,1 ± 0,92 ^{de}	27,2 ± 0,55 ^{lmn}	64,4 ± 0,16 ^d	32,4 ± 1,03 ^j
500	10	69,5 ± 0,43 ^{ef}	24,4 ± 0,78 ^{hijkl}	66,3 ± 0,56 ^{def}	28,4 ± 0,63 ^{hi}
100	50	74,9 ± 0,61 ^{ij}	22,4 ± 1,03 ^g	70,5 ± 0,89 ^{hijkl}	22,5 ± 1,01 ^{ef}
500	50	80,9 ± 0,58 ^{nop}	15,0 ± 1,26 ^{bc}	70,6 ± 0,43 ^{hijklm}	13,2 ± 0,81 ^{bc}
100	100	82,2 ± 0,36 ^{op}	11,3 ± 0,74 ^a	71,2 ± 0,85 ^{klm}	9,6 ± 0,26 ^a
500	100	83,1 ± 0,90 ^p	13,1 ± 0,72 ^{ab}	73,4 ± 0,47 ^m	9,7 ± 0,91 ^a
AA/Calotropaine					
100	10	70,3 ± 0,46 ^{fg}	26,3 ± 0,94 ^{kl}	67,7 ± 1,77 ^{efgh}	28,9 ± 0,69 ⁱ
500	10	74,9 ± 1,36 ^{ij}	22,5 ± 0,89 ^{ghi}	67,9 ± 0,98 ^{efghi}	23,2 ± 0,45 ^{efg}
100	50	73,6 ± 0,70 ^{hi}	21,6 ± 1,49 ^{fg}	68,2 ± 0,83 ^{efghij}	23,2 ± 1,13 ^{efg}
500	50	78,9 ± 0,55 ^{lmn}	15,7 ± 0,89 ^{bcd}	70,4 ± 0,68 ^{hijkl}	14,9 ± 0,90 ^c
100	100	78,4 ± 0,75 ^{klm}	17,1 ± 2,07 ^{cde}	70,7 ± 0,95 ^{ijklm}	16,2 ± 2,14 ^{cd}
500	100	83,2 ± 0,35 ^p	14,5 ± 0,76 ^{bc}	72,2 ± 0,28 ^{lm}	11,1 ± 0,67 ^{ab}
AA/Ficine					
100	10	65,9 ± 0,94 ^{cd}	28,6 ± 0,24 ^{mn}	67,5 ± 0,55 ^{efg}	33,4 ± 0,54 ^j
500	10	70,2 ± 0,56 ^{fg}	25,4 ± 0,99 ^{ijkl}	69,2 ± 0,78 ^{fghijk}	27,8 ± 1,12 ^{hi}
100	50	71,3 ± 0,45 ^{fgh}	23,5 ± 1,74 ^{ghijk}	68,9 ± 0,74 ^{fghijk}	25,8 ± 1,33 ^{gh}
500	50	79,2 ± 0,77 ^{mno}	15,9 ± 0,91 ^{bcde}	69,3 ± 0,99 ^{ghijkl}	15,3 ± 0,62 ^c
100	100	76,6 ± 1,10 ^{ijkl}	18,9 ± 0,62 ^{ef}	70,5 ± 1,13 ^{hijkl}	18,7 ± 1,21 ^d
500	100	80,0 ± 0,79 ^{mno}	16,1 ± 1,00 ^{bcde}	71,6 ± 1,02 ^{klm}	14,3 ± 1,20 ^{bc}
AA/Bromélaïne					
100	10	67,66 ± 1,03 ^{de}	29,57 ± 1,72 ⁿ	65,90 ± 1,02 ^{de}	33,34 ± 2,16 ^j
500	10	72,54 ± 1,30 ^{ghi}	23,78 ± 1,01 ^{ghijk}	68,18 ± 1,49 ^{efghij}	25,46 ± 1,52 ^{fg}
100	50	70,50 ± 1,07 ^{fg}	26,62 ± 0,69 ^{klmn}	68,00 ± 0,91 ^{efghij}	28,86 ± 1,28 ⁱ
500	50	73,53 ± 0,23 ^{hi}	21,06 ± 0,33 ^{fg}	70,88 ± 0,58 ^{ijklm}	22,19 ± 0,41 ^e
100	100	73,00 ± 0,33 ^{hi}	23,57 ± 0,78 ^{ghijk}	69,93 ± 0,42 ^{ghijkl}	24,58 ± 0,30 ^{efg}
500	100	76,33 ± 0,63 ^{jk}	18,49 ± 0,55 ^{def}	69,93 ± 1,35 ^{ghijkl}	18,76 ± 0,66 ^d

Le même exposant (°) signifie absence de différence significative entre les échantillons.

Par comparaison aux purées d'abricots non traitées, toutes les combinaisons AA/P ont significativement ($p < 0,0001$) diminué le brunissement, ainsi, plus la concentration d'AA et / ou de protéases appliquées augmentent, plus la purée d'abricots conserve mieux sa couleur (Tableau 14). De plus, contrairement aux échantillons traités uniquement avec de l'AA, nous n'avons pas observé un rétablissement brusque du brunissement (après consommation de l'AA) pour les échantillons traités avec les combinaisons AA/P, où le profil de changement de couleur (ΔE) est resté constant pendant la période de stockage. Ainsi, les résultats montrent clairement que les combinaisons AA/P réduisent considérablement le brunissement de la purée et elles sont plus efficaces que l'utilisation de l'AA seul (Annexe V). Les combinaisons AA/papaïne sont les plus efficaces, elles ont significativement ($p < 0,05$) conservé la couleur de la purée traitée par rapport aux autres combinaisons AA/P. Ainsi, certaines combinaisons AA/Papaïne (AA 500 mg/papaïne 100 mg, AA 100 mg/papaïne 100 mg) ont réduit le brunissement de 80%. Les combinaisons AA/calotropaine ont été légèrement moins efficaces, suivies des combinaisons AA/ficine et AA/bromélaïne. Ces observations sont comparables à nos résultats *in vitro*. Cependant, aucune combinaison n'a réussi à inhiber complètement les réactions de brunissement dans la purée (*in situ*) comme elles l'ont fait *in vitro*. L'inhibition complète du brunissement enzymatique *in situ* a toujours été un objectif difficile à atteindre pour les fruits et légumes, même avec des inhibiteurs puissants (McEvily *et al.*, 1992; Marshall *et al.*, 2000; Li-Qin *et al.*, 2009; Cabezas-Serrano *et al.*, 2013) ou avec du blanchiment (Deylami *et al.*, 2016), ainsi, un brunissement résiduel est toujours détecté. Cependant, même si la principale cause de changement de couleur dans la purée d'abricots est attribuée à la PaPPO, le brunissement *in situ* peut être engendré par d'autres phénomènes, qui peuvent également contribuer à ce changement de couleur. La libération des liquides cellulaires suite au broyage favorise la fuite, la sédimentation et la dessiccation du jus, entraînant ainsi une diminution de la capacité de rétention d'eau de la purée au cours du stockage, ce qui conduit à une réflectance plus faible et à une diminution des chromaticités L^* et b^* (Zhang *et al.*, 2018). Différentes réactions peuvent également contribuer simultanément aux changements de couleur de la purée, comme le brunissement non enzymatique et l'oxydation des caroténoïdes et de l'AA (De Ancos *et al.*, 2011).

*Conclusion générale
et perspectives*

L'objectif principal de ce travail de thèse est de contribuer à l'apport des éléments de compréhension de la réaction de brunissement enzymatique qui se produit dans l'abricot à travers l'extraction, la purification et la caractérisation de l'enzyme responsable de ces réactions qui est bien la PPO, et de tester une nouvelle approche afin d'inhiber cette enzyme et contrôler le brunissement enzymatique. L'approche testée combine deux inhibiteurs, l'acide ascorbique et les protéases végétales (la papaïne, la calotropaïne, la ficine et la bromélaïne) qui agissent avec deux modes d'inhibition différents, où l'acide ascorbique est utilisé principalement pour sa capacité à inhiber la *PaPPO* en réduisant les *o*-quinones formés, cependant, les protéases sont utilisées pour leur capacité à inactiver (digérer) la *PaPPO*.

Les principaux constats soulevés montrent que la *PaPPO* est présente dans le fruit sous une forme latente (*L-PaPPO*), partiellement active (sans l'ajout d'activateurs). Plusieurs indications ont confirmé la latence de la *PaPPO*, tels que le poids moléculaire élevé de l'enzyme purifiée (63 kDa), l'amélioration de l'activité *PaPPO* en présence de faibles concentrations de SDS, la zymographie et l'activation de la forme latente au cours de son stockage à 4 °C, donnant naissance à une forme active (*A-PaPPO*) de faible poids moléculaire (38 kDa). Cette capacité de la *L-PaPPO* à s'autoactiver spontanément *in vitro* pendant son stockage à 4 °C a été mise en évidence pour la première fois pour les PPOs. En outre, la caractérisation biochimique de la *PaPPO* a révélé que la *L-PaPPO* possède une forte activité diphénolase et qu'elle est dépourvue de l'activité monophénolase. Toutefois, l'*A-PaPPO* est dotée d'une légère activité monophénolase, ce qui renforce les hypothèses suggérant que les PPOs de plantes sont catalytiquement capables d'hydroxyler les monophénols. De même, la détermination de la masse moléculaire de l'*A-PaPPO* nous permet de déduire la position du site de clivage qui sépare le domaine catalytique (*A-PaPPO*) et le domaine C-terminal de la *PaPPO*.

Par ailleurs, ce travail apporte pour la première fois la preuve évidente que la papaïne, la calotropaïne, la ficine et la bromélaïne sont capables de digérer la *PaPPO* à un pH de 4,5, provoquant son inactivation. La papaïne et la calotropaïne ont été les protéases les plus efficaces. L'activité protéolytique élevée des protéases sélectionnées leur donne la capacité de digérer la *PaPPO* provoquant ainsi son inactivation irréversible en raison des dommages causés à sa structure primaire.

Les résultats obtenus montrent que la protéolyse de la PaPPO par les protéases est une réaction qui nécessite un temps d'incubation relatif (de quelques minutes à plusieurs heures) pour inactiver complètement la PaPPO. Le temps d'incubation a été proportionnel à l'activité protéolytique et à la concentration de la protéase utilisée. Cependant, ce mode d'inactivation peut provoquer l'activation de la PaPPO au début de la protéolyse.

Nos résultats prouvent clairement que la combinaison entre l'acide ascorbique et les protéases végétales (AA/P) est une approche très efficace pour inhiber la PaPPO. Ces combinaisons ont montré une grande compatibilité *in vitro*, où l'acide ascorbique a empêché les réactions de brunissement qui peuvent survenir avant et pendant l'inactivation de la PaPPO avec les protéases. De même, l'application des combinaisons AA/P sur la purée d'abricot a considérablement conservé la couleur des échantillons traités, démontrant ainsi la faisabilité de ce concept *in situ*. Cette approche peut être une méthode pratique pour inhiber le brunissement enzymatique dans les produits à base de fruits et légumes et un substitut des inhibiteurs chimiques tels que les sulfites et leurs dérivés.

Ainsi, et comme perspectives, ce travail peut servir de point de départ à d'autres études visant à caractériser ou inhiber les PPOs. En fait, les résultats que nous avons présenté suggèrent une révision de quelques concepts et caractéristiques des PPOs, tels que l'absence d'activité monophénolase rapportée dans la bibliographie pour les PPOs de plusieurs espèces de plantes, la forme de la PPO présente dans les tissus végétales, les modes d'activation *in vitro* de la forme latente, ainsi que les différences biochimiques entre les deux formes (active et latente). Nous pensons que plusieurs différences rapportées dans la littérature entre les PPOs isolées de la même espèce sont, principalement dues à l'activation de la forme latente au cours des procédés d'extraction, de purification et de stockage de la PPO. Ainsi la recharacterisation des PPOs des plantes est une nécessité pour éclaircir les différences et les contradictions. De même, la démarche que nous avons proposé pour inhiber la PaPPO construit une piste vierge, encore à développer et à optimiser, où il serait très intéressant de la tester sur d'autres espèces, en utilisant d'autres protéases ou un autre inhibiteur que l'acide ascorbique. En outre, nous supposons que le fait de tester cette approche sur des fruits moins acides ou sur des PPOs avec un pH optimum proche de la neutralité peut donner de meilleurs résultats, où les protéases seront probablement plus actives. Nous proposons aussi d'investir la biotechnologie (production des protéases à l'échelle microbienne) et l'immobilisation (des protéases) afin d'optimiser cette approche et de minimiser les coûts.

*Références
bibliographiques*

1. Abraham, K.I., Joshi, P.N., 1979. Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. I. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 568, 111–119.
2. Adkison, E.C., Biasi, W.B., Bikoba, V., Holstege, D.M., Mitcham, E.J., 2018. Effect of Canning and Freezing on the Nutritional Content of Apricots. *Journal of Food Science* 83, 1757–1761.
3. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), 2012. Table de composition nutritionnelle des aliments-CIQUAL. <https://ciqual.anses.fr/> (consulté le 15-02-2020).
4. Akin, E.B., Karabulut, I., Topcu, A., 2008. Some compositional properties of main Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Food Chemistry* 107, 939–948.
5. Ali, S., Masud, T., Abbasi, K.S., 2011. Physico-chemical characteristics of apricot (*Prunus armeniaca* L.) grown in Northern Areas of Pakistan. *Scientia Horticulturae* 130, 386–392.
6. Amiour, S.D., Hambaba, L., 2016. Effect of pH, temperature and some chemicals on polyphenoloxidase and peroxidase activities in harvested Deglet Nour and Ghars dates. *Postharvest Biology and Technology* 111, 77–82.
7. Anaya-Esparza, L.M., Velázquez-Estrada, R.M., Sayago-Ayerdi, S.G., Sánchez-Burgos, J.A., Ramírez-Mares, M.V., de Lourdes García-Magana, M., Montalvo-González, E., 2017. Effect of thermosonication on polyphenol oxidase inactivation and quality parameters of soursop nectar. *LWT-Food Science and Technology* 75, 545–551.
8. Anderson, J.V., Morris, C.F., 2003. Purification and analysis of wheat grain polyphenol oxidase (PPO) protein. *Cereal Chemistry* 80, 135–143.
9. Anderson, J.W., 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* 7, 1973–1988.
10. Angleton, E.L., Flurkey, W.H., 1984. Activation and alteration of plant and fungal polyphenoloxidase isoenzymes in sodium dodecylsulfate electrophoresis. *Phytochemistry* 23, 2723–2725.
11. Anusha, R., Singh, M.K., Bindhu, O.S., 2014. Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. *European Food Research and Technology* 238, 997–1006.
12. Araji, S., Grammer, T.A., Gertzen, R., Anderson, S.D., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Phu, M.L., Solar, A., Leslie, C.A., Dandekar, A.M., 2014. Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut. *Plant physiology* 164, 1191–1203.
13. Arias, E., González, J., Oria, R., Lopez-Buesa, P., 2007. Ascorbic acid and 4-hexylresorcinol effects on pear PPO and PPO catalyzed browning reaction. *Journal of Food Science* 72, 422–429.
14. Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S., Ozensoy, O., 2004. Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry* 88, 479–484.

15. Arslan, O., Temur, A., Tozlu, İ., 1998. Polyphenol Oxidase from Malatya Apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1239–1241.
16. Ashie, I.N.A., Simpson, B.K., Smith, J.P., 1996. Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 36, 1–30.
17. Audergon, J.M., Duffillol, J.M., Souty, M., Breuils, L., Reich, M., 1989. Biochemical and physicochemical characterisation of 400 apricot varieties. Consequences in the apricot selection and improvement process, *Acta horticulturae* 293, 111–120.
18. Augusto, P.E., Ibarz, R., Garvín, A., Ibarz, A., 2015. Peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) photo-inactivation in a coconut water model solution using ultraviolet (UV). *Food Research International* 74, 151–159.
19. Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A., 2011. Use of additives to preserve the quality of fresh-cut fruits and vegetables. In: Martín-Belloso, O and Soliva-Fortuny, R (.ed), *Advances in Fresh-cut Fruits and Vegetables Processing*, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, pp. 231–254.
20. Ayaz, F.A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y., Colak, A., 2008. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry* 106, 291–298.
21. Aydin, B., Gulcin, I., Alwasel, S.H., 2015. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Hemşin apple (*Malus communis* L.). *International Journal of Food Properties* 18, 2735–2745.
22. Baeyens-Volant, D., Matagne, A., El Mahyaoui, R., Wattiez, R., Azarkan, M., 2015. A novel form of ficin from *Ficus carica* latex: Purification and characterization. *Phytochemistry* 117, 154–167.
23. Bajorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.-C., Pinkas, M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung* 46, 1086–1089.
24. Bailey, A.J., Light, N.D., 1989. *Connective tissue in meat and meat products*. Elsevier applied science, London, 355p.
25. Baines, B.S., Brocklehurst, K., 1979. A necessary modification to the preparation of papain from any high-quality latex of *Carica papaya* and evidence for the structural integrity of the enzyme produced by traditional methods. *Biochemical Journal* 177, 541–548.
26. Baldwin, E.A., Bai, J., 2011. Physiology of fresh-cut fruits and vegetables. In: Martín-Belloso, O and Soliva-Fortuny, R (.ed), *Advances in Fresh-cut Fruits and Vegetables Processing*, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, pp. 87–104.
27. Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Baker, R.A., 1995. Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 35, 509–524.
28. Barrett, A.J., 1999. Peptidases: a view of classification and nomenclature. In: Turk, V. (ed.), *Proteases New Perspectives*, MCBU Molecular and Cell Biology Updates. Birkhäuser, Basel, pp. 1–12.

29. Barrett, A.J., 2000. Proteases. *Current protocols in protein science* 21, 1–12.
30. Barrett, D.M., Lee, C.Y., Liu, F.W., 1991. Changes in the activity and subcellular distribution of PPO in ‘delicious’ apples during controlled atmosphere storage. *Journal of Food Biochemistry* 15, 185–199.
31. Batista, K.A., Batista, G.L., Alves, G.L., Fernandes, K.F., 2014. Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 102, 211–217.
32. Bayındırlı, A., Alpas, H., Bozoğlu, F., Hızal, M., 2006. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control* 17, 52–58.
33. Beers, E.P., Woffenden, B.J., Zhao, C., 2000. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* 44, 399–415.
34. Beynon, R.J., Bond, J.S., 2001. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University, Press Oxford, 220p.
35. Bisswanger, H., 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science* 1, 41–55.
36. Bittner, S., 2006. When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* 30, 205–224.
37. Bond, J.S., Butler, P.E., 1987. Intracellular proteases. *Annual Review of Biochemistry* 56, 333–364.
38. Boss, P.K., Gardner, R.C., Janssen, B.-J., Ross, G.S., 1995. An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Molecular Biology* 27, 429–433.
39. Botondi, R., DeSantis, D., Bellincontro, A., Vizovitis, K., Mencarelli, F., 2003. Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low-and high-aroma varieties of apricots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1189–1200.
40. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
41. Brown, M.S., 1977. Texture of Frozen Fruits and Vegetables. *Journal of Texture Studies* 7, 391–404.
42. Butz, P., García, A.F., Lindauer, R., Dieterich, S., Bogner, A., Tauscher, B., 2003. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *Journal of Food Engineering* 56, 233–236.
43. Byrne, K.T., Turk, M.J., 2011. New Perspectives on the Role of Vitiligo in Immune Responses to Melanoma. *Oncotarget* 2, 684–694.
44. Cabanes, J., Escribano, J., Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., Jiménez-Atiénzar, M., 2007. Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina). Molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane-bound forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 10446–10451.

45. Cabezas-Serrano, A.B., Amodio, M.L., Colelli, G., 2013. Effect of solution pH of cysteine-based pre-treatments to prevent browning of fresh-cut artichokes. *Postharvest Biology and Technology* 75, 17–23.
46. Campbell, O.E., Padilla-Zakour, O.I., 2013. Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling. *Food Research International* 54, 448–455.
47. Ceballos, A.M., Giraldo, G.I., Orrego, C.E., 2012. Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *Journal of Food Engineering* 111, 360–365.
48. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis* 10 (3), 178–182.
49. Cheema, S., Sommerhalter, M., 2015. Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango. *Food Chemistry* 171, 382–387.
50. Chevalier, T., de Rigal, D., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Gaillard, F., Richard-Forget, F., Fils-Lycaon, B.R., 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiology* 119, 1261–1270.
51. Cheynier, V., Moutounet, M., 1992. Oxidative reactions of caffeic acid in model systems containing polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 2038–2044.
52. Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J.M., Barillere, J.M., Moutounet, M., 1989. Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 40, 36–42.
53. Chian, L.T.Y., Wilgram, G.F., 1967. Tyrosinase Inhibition: Its Role in Sun tanning and in Albinism. *Science* 155, 198–200.
54. Cho, M.H., Moinuddin, S.G., Helms, G.L., Hishiyama, S., Eichinger, D., Davin, L.B., Lewis, N.G., 2003. (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantio-specific polyphenol oxidase from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 10641–10646.
55. Cho, Y.K., Ahn, H.K., 1999. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry* 23, 577–592.
56. Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S., Ayaz, F.A., 2005. Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits at an early stage of maturation. *Food Chemistry* 90, 801–807.
57. Constabel, C.P., Bergey, D.R., Ryan, C.A., 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 407–411.
58. Corwin, H., Shellhammer, T.H., 2002. Combined carbon dioxide and high pressure inactivation of pectin methylesterase, polyphenol oxidase, *Lactobacillus plantarum* and *Escherichia coli*. *Journal of Food Science* 67, 697–701.
59. Corzo-Martinez, M., Corzo, N., Villamiel, M., Del Castillo, M.D., 2012. Browning reactions. In: Benjamin, K (ed.), *Food biochemistry and food processing*, John Wiley & Sons, pp. 56–83.

60. Coseteng, M.Y., Lee, C.Y., 1987. Changes in Apple Polyphenoloxidase and Polyphenol Concentrations in Relation to Degree of Browning. *Journal of Food Science* 52, 985–989.
61. Coşkun, A.L., Türkyılmaz, M., Aksu, Ö.T., Koç, B.E., Yemiş, O., Özkan, M., 2013. Effects of various sulphuring methods and storage temperatures on the physical and chemical quality of dried apricots. *Food Chemistry* 141, 3670–3680.
62. Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26, 1001–1043.
63. Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, A., Tóth-Markus, M., Lechner, N., 2006. Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 7, 49–54.
64. Das, J.R., Bhat, S.G., Gowda, L.R., 1997. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the Kew cultivar of Indian pineapple fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2031–2035.
65. De Ancos, B., Ibañez, E., Reglero, G., Cano, M.P., 2000. Frozen Storage Effects on Anthocyanins and Volatile Compounds of Raspberry Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 873–879.
66. De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Cano, M.P., 2011. Nutritional and health aspects of fresh-cut vegetables. In: Martín-Belloso, O and Soliva-Fortuny, R (.ed), *Advances in Fresh-cut Fruits and Vegetables Processing*, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, pp. 145–184.
67. Degl’Innocenti, E., Guidi, L., Pardossi, A., Tognoni, F., 2005. Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *Acephala*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9980–9984.
68. Devaraj, K.B., Kumar, P.R., Prakash, V., 2008. Purification, Characterization, and Solvent-Induced Thermal Stabilization of Ficin from *Ficus carica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11417–11423.
69. Deylami, M.Z., Rahman, R.A., Tan, C.P., Bakar, J., Olusegun, L., 2016. Effect of blanching on enzyme activity, color changes, anthocyanin stability and extractability of mangosteen pericarp: A kinetic study. *Journal of Food Engineering* 178, 12–19.
70. Dijkstra, L., Walker, J.R., 1991. Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54, 229–234.
71. Dincer, B., Colak, A., Aydın, N., Kadioglu, A., Güner, S., 2002. Characterization of polyphenol-oxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., *Rosaceae*). *Food Chemistry* 77, 1–7.
72. Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., Alkan, M., 2005. Purification and characterization of *Ocimum basilicum* L. polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 10224–10230.
73. Domingos, A., Cardoso, P.C., Xue, Z., Clemente, A., Brodelius, P.E., Pais, M.S., 2000. Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *European Journal of Biochemistry* 267, 6824–6831.
74. Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., Boras, M., 2007. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chemistry* 102, 966–975.

75. Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M., Wolthers, B.G., 1968. Structure of papain. *Nature* 218, 929.
76. Dry, I.B., Robinson, S.P., 1994. Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology* 26, 495–502.
77. Duan, X., Liu, W.C., Ren, G.Y., Liu, L.L., Liu, Y.H., 2016. Browning behavior of button mushrooms during microwave freeze-drying. *Drying Technology* 34, 1373–1379.
78. Duangmal, K., Apenten, R.K.O., 1999. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry* 64, 351–359.
79. Dubey, V.K., Jagannadham, M.V., 2003. Differences in the unfolding of procerain induced by pH, guanidine hydrochloride, urea, and temperature. *Biochemistry* 42, 12287–12297.
80. Dunn, B.M., Beynon, R.J., Bond, J.S., 1989. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University, Press Oxford, 337p.
81. Edwin, F., Jagannadham, M.V., 2000. Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1479, 69–82.
82. El Gharras, H., 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *International Journal of Food Science & Technology* 44, 2512–2518.
83. Englund, P.T., King, T.P., Craig, L.C., Walti, A., 1968. Ficin. I. Its isolation and characterization. *Biochemistry* 7, 163–175.
84. Eskin, N.A.M., 1990. Biochemistry of food spoilage: enzymatic browning. *Biochemistry of Foods* 2, 401–432.
85. Eskin, N.M., Ho, C.T., Shahidi, F., 2013. Browning reactions in foods. In: Eskin, N. M and Shahidi, F (ed.), *Biochemistry of Foods*, Elsevier, London, pp. 245–289.
86. Espín, J.C., Wichers, H.J., 1999. Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3503–3508.
87. Estelle, M., 2001. Proteases and cellular regulation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 254–260.
88. Faust, M., Suranyi, D., Nyujto, F., 1998. Origin and dissemination of apricot. *Horticultural Reviews* 22, 225–260.
89. Feillet, P., Autran, J.C., Icard-Verniere, C., 2000. Mini review pasta brownness: an assessment. *Journal of Cereal Science* 32, 215–233.
90. Felton, G.W., Donato, K., Del Vecchio, R.J., Duffey, S.S., 1989. Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 15, 2667–2694.
91. Felton, G.W., Donato, K.K., Broadway, R.M., Duffey, S.S., 1992. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dieter protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology* 38, 277–285.

92. Ferrar, P.H., Walker, J.R., 1996. Inhibition of diphenol oxidases: A comparative study. *Journal of Food Biochemistry* 20, 15–30.
93. Feumba Dibanda, R., Panyoo Akdowa, E., Rani P., A., Metsatedem Tongwa, Q., Mbofung F., C.M., 2020. Effect of microwave blanching on antioxidant activity, phenolic compounds and browning behaviour of some fruit peelings. *Food Chemistry* 302, 125308.
94. Finkle, B.J., Nelson, R.F., 1963. Enzyme Reactions with Phenolic Compounds¹: Effect of O-Methyltransferase on a Natural Substrate of Fruit Polyphenol Oxidase². *Nature* 197, 902–903.
95. Flinn, B.S., 2009. Plant extracellular matrix metalloproteinases. *Functional Plant Biology* 35, 1183–1193.
96. Flurkey, W.H., Jen, J.J., 1980. Purification of peach polyphenol oxidase in the presence of added protease inhibitors¹. *Journal of Food Biochemistry* 4, 29–41.
97. Food and Agriculture Organization (FAO), 2019. Data, corps. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (consulté le 20-12-2019).
98. Food and Drug Administration (FDA), 2003. Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption, Olestra. *Fed. Regist.* 68, 46363–46402.
99. Fraignier, M.P., Marques, L., Fleuriet, A., Macheix, J.J., 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2375–2380.
100. Freitas, C.D.T., Oliveira, J.S., Miranda, M.R.A., Macedo, N.M.R., Sales, M.P., Villas-Boas, L.A., Ramos, M.V., 2007. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 781–789.
101. Friedenson, B., Liener, I.E., 1972. The active site sequence of multiple forms of ficin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 149, 169–174.
102. Fujita, S., Saari, N. bin, Maegawa, M., Samura, N., Hayashi, N., Tono, T., 1997. Isolation and characterization of two phloroglucinol oxidases from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 59–63.
103. Galeazzi, M.A., Sgarbieri, V.C., Constantinides, S.M., 1981. Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidases (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii*, L.). *Journal of Food Science* 46, 150–155.
104. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., 2013. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science* 18, 334–343.
105. Ganesa, C., Fox, M.T., Flurkey, W.H., 1992. Microheterogeneity in purified broad bean polyphenol oxidase. *Plant Physiology* 98, 472–479.
106. Garcia-Carreno, F.L., Dimes, L.E., Haard, N.F., 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214, 65–69.
107. García-Martínez, E., Igual, M., Martín-Esparza, M.E., Martínez-Navarrete, N., 2013. Assessment of the bioactive compounds, color, and mechanical properties of apricots as affected by drying treatment. *Food and Bioprocess Technology* 6, 3247–3255.

108. Garcia-Viguera, C., Bridle, P., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A., 1994. Influence of variety, maturity and processing on phenolic compounds of apricot juices and jams. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 199, 433–436.
109. Gerdemann, C., Eicken, C., Galla, H.-J., Krebs, B., 2002. Comparative modeling of the latent form of a plant catechol oxidase using a molluscan hemocyanin structure. *Journal of Inorganic Biochemistry* 89, 155–158.
110. Gil, M.I., Gorny, J.R., Kader, A.A., 1998. Responses of “Fuji” apple slices to ascorbic acid treatments and low-oxygen atmospheres. *HortScience* 33(9), 305–309.
111. Golan-Goldhirsh, A., Whitaker, J.R., 1984. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32, 1003–1009.
112. Golbeck, J.H., Cammarata, K.V., 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase: isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiology* 67, 977–984.
113. Gómez, P.L., Alzamora, S.M., Castro, M.A., Salvatori, D.M., 2010. Effect of ultraviolet-C light dose on quality of cut-apple: Microorganism, color and compression behavior. *Journal of Food Engineering* 98, 60–70.
114. Gonzalez-Rabade, N., Badillo-Corona, J.A., Aranda-Barradas, J.S., del Carmen Oliver-Salvador, M., 2011. Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro*—a review. *Biotechnology Advances* 29, 983–996.
115. Gooding, P.S., Bird, C., Robinson, S.P., 2001. Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta* 213, 748–757.
116. Goyeneche, R., Di Scala, K., Roura, S., 2013. Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish (*Raphanus sativus* var. *sativus*). *LWT-Food Science and Technology* 54, 57–62.
117. Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., Wiczak, W., 2007. Cysteine proteases. In: Polaina, J and MacCabe, A.P (ed.), *Industrial Enzymes*. Springer, pp. 181–195.
118. Guerrero-Beltrán, J.A., Swanson, B.G., Barbosa-Cánovas, G.V., 2005. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. *LWT-Food Science and Technology* 38, 625–630.
119. Gui, F., Wu, J., Chen, F., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., Wang, Z., 2007. Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry* 100, 1678–1685.
120. Gurrieri, F., Audergon, J.M., Albagnac, G., Reich, M., 2001. Soluble sugars and carboxylic acids in ripe apricot fruit as parameters for distinguishing different cultivars. *Euphytica* 117, 183–189.
121. Haddouche, L., Phalak, A., Tikekar, R.V., 2015. Inactivation of polyphenol oxidase using 254 nm ultraviolet light in a model system. *LWT-Food Science and Technology* 62, 97–103.
122. Hadidi, M., Ibarz, A., Conde, J., Pagan, J., 2019. Optimisation of steam blanching on enzymatic activity, color and protein degradation of alfalfa (*Medicago sativa*) to improve some quality characteristics of its edible protein. *Food Chemistry* 276, 591–598.

123. Han, Q.Y., Liu, F., Li, M., Wang, K.L., Ni, Y.Y., 2019. Comparison of biochemical properties of membrane-bound and soluble polyphenol oxidase from Granny Smith apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Food Chemistry* 289, 657–663.
124. Harel, E., Mayer, A.M., Lehman, E., 1973. Multiple forms of *Vitis vinifera* catechol oxidase. *Phytochemistry* 12, 2649–2654.
125. Harrach, T., Eckert, K., Maurer, H.R., Machleidt, I., Machleidt, W., Nuck, R., 1998. Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase. *Journal of Protein Chemistry* 17, 351–361.
126. Haruta, M., Murata, M., Kadokura, H., Homma, S., 1999. Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in *Rosaceae* fruit trees. *Phytochemistry* 50, 1021–1025.
127. Heddleson, R.A., Doores, S., 1994. Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens—a review. *Journal of Food Protection* 57, 1025–1037.
128. Heinemann, U., Pal, G.P., Hilgenfeld, R., Saenger, W., 1982. Crystal and molecular structure of the sulfhydryl protease calotropin DI. *Journal of Molecular Biology* 161, 591–606.
129. Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Weemaes, C., 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology* 9, 197–203.
130. Hill, H.Z., 1992. The function of melanin or six blind people examine an elephant. *Bioessays* 14, 49–56.
131. Himmelwright, R.S., Eickman, N.C., LuBien, C.D., Solomon, E.I., Lerch, K., 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *Journal of the American Chemical Society* 102, 7339–7344.
132. Homaei, A., Stevanato, R., Etemadipour, R., Hemmati, R., 2017. Purification, catalytic, kinetic and thermodynamic characteristics of a novel ficin from *Ficus johannis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 10, 360–366.
133. Homaei, A.A., Sajedi, R.H., Sariri, R., Seyfzadeh, S., Stevanato, R., 2010. Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino Acids* 38, 937–942.
134. Huang, M.T., Lee, C.Y., Ho, C.T., 1992. *Phenolic compounds in food and their effects on health*, ACS Symposium Series, USA, 338p.
135. Hunt, M.D., Eannetta, N.T., Yu, H., Newman, S.M., Steffens, J.C., 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology* 21, 59–68.
136. Husain, S.S., Lowe, G., 1970. The amino acid sequence around the active-site cysteine and histidine residues, and the buried cysteine residues in ficin. *Biochemical Journal* 117, 333–340.
137. Hussain, P.R., Chatterjee, S., Variyar, P.S., Sharma, A., Dar, M.A., Wani, A.M., 2013. Bioactive compounds and antioxidant activity of gamma irradiated sun dried apricots (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* 30, 59–66.
138. Hutcheson, S.W., Buchanan, B.B., Montalbini, P., 1980. Polyphenol oxidation by *Vicia faba* chloroplast membranes: studies on the latent membrane-bound polyphenol oxidase and on the mechanism of photochemical polyphenol oxidation. *Plant Physiology* 66, 1150–1154.

139. Iozumi, K., Hoganson, G.E., Pennella, R., Everett, M.A., Fuller, B.B., 1993. Role of Tyrosinase as the Determinant of Pigmentation in Cultured Human Melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 100, 806–811.
140. 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-oligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydrate Research* 256, 13–27.
141. Irwin, S.V., Fisher, P., Graham, E., Malek, A., Robidoux, A., 2017. Sulfites inhibit the growth of four species of beneficial gut bacteria at concentrations regarded as safe for food. *PLOS One* 12 (10), e0186629.
142. İyidoğan, N.F., Bayındırlı, A., 2004. Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. *Journal of Food Engineering* 62, 299–304.
143. Jang, J.H., Kim, S.T., Moon, K.D., 2009. Inhibitory effects of ultrasound in combination with ascorbic acid on browning and polyphenol oxidase activity of fresh-cut apples. *Food Science and Biotechnology* 18, 1417–1422.
144. Jang, J.H., Moon, K.D., 2011. Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry* 124, 444–449.
145. Janovitz-Klapp, A., Richard, F., Nicolas, J., 1989. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry* 28, 2903–2907.
146. Janson, J.C., 2012. *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*. John Wiley & Sons, New Jersey, 517p.
147. Jiménez, M., García-Carmona, F., 1996. The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 42, 1503–1509.
148. Jukanti, A., 2017a. Polyphenol Oxidase (s): Importance in Food Industry. In: Jukanti, A. (ed.), *Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants*. Springer, Singapore, pp. 93–106.
149. Jukanti, A., 2017b. Physicochemical Properties of Polyphenol Oxidases. In: Jukanti, A. (ed.), *Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants*. Springer, Singapore, pp. 33–56.
150. Jukanti, A.K., Bhatt, R., 2015. Eggplant (*Solanum melongena* L.) polyphenol oxidase multi-gene family: a phylogenetic evaluation. *3 Biotech* 5, 93–99.
151. Kader, A.A., 1985. Ethylene-induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. *HortScience* 20, 54–57.
152. Kampatsikas, I., Bijelic, A., Pretzler, M., Rompel, A., 2017. Three recombinantly expressed apple tyrosinases suggest the amino acids responsible for mono-versus diphenolase activity in plant polyphenol oxidases. *Scientific Reports* 7, 1–13.
153. Kampatsikas, I., Bijelic, A., Pretzler, M., Rompel, A., 2019. A peptide inducing self-cleavage reaction initiates the activation of tyrosinase. *Angewandte Chemie International Edition*, 58 (28), 7475–7479.

154. Kamphuis, I.G., Kalk, K.H., Swarte, M.B.A., Drenth, J., 1984. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 179, 233–256.
155. Kanade, S.R., Rao, D.H., Hegde, R.N., Gowda, L.R., 2009. The unique enzymatic function of field bean (*Dolichos lablab*) D-galactose specific lectin: a polyphenol oxidase. *Glycoconjugate Journal* 26, 535.
156. Kankanamge, R., Jeewanthi, C., Lee, N.-K., Lee, S.-K., Yoon, Y.C., Paik, H.-D., 2015. Physicochemical characterization of hydrolysates of whey protein concentrates for their use in nutritional beverages. *Food Science and Biotechnology* 24, 1335–1340.
157. Kenten, R.H., 1957. Latent phenolase in extracts of broad-bean (*Vicia faba* L.) leaves. Activation by acid and alkali. *Biochemical Journal* 67, 300.
158. Kermasha, S., Goetghebeur, M., Monfette, A., Metche, M., Rovel, B., 1993. Inhibitory effects of cysteine and aromatic acids on tyrosinase activity. *Phytochemistry* 34, 349–353.
159. Khan, A.R., James, M.N., 1998. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science* 7, 815–836.
160. King, R.S., Flurkey, W.H., 1987. Effects of limited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 41, 231–240.
161. Kortt, A.A., Hinds, J.A., Zerner, B., 1974. Specificity and pH dependence of ficin-catalyzed hydrolyses. Comparisons with bromelain specificity. *Biochemistry* 13, 2029–2037.
162. Koussevitzky, S., Ne'eman, E., Sommer, A., Steffens, J.C., Harel, E., 1998. Purification and properties of a novel chloroplast stromal Peptidase processing of polyphenol oxidase and other imported precursors. *Journal of Biological Chemistry* 273, 27064–27069.
163. Kowalski, S.P., Eannetta, N.T., Hirzel, A.T., Steffens, J.C., 1992. Purification and characterization of polyphenol oxidase from glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *Plant Physiology* 100, 677–684.
164. Kraut, J., 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annual Review of Biochemistry* 46, 331–358.
165. Kwon, D.-Y., Kim, W.-Y., 1996. Purification of the glycosylated polyphenol oxidase from potato tuber. *BMB Reports* 29, 163–168.
166. Labuza, T., Lillemo, J.H., Taoukis, P.S., 1992. Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes. *Fluessiges Obst* 59, 15–20.
167. Lacroix, M., Ouattara, B., 2000. Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products -a review. *Food Research International* 33, 719–724.
168. Lado, B.H., Yousef, A.E., 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection* 4, 433–440.
169. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.
170. Lamikanra, O., 2002. Enzymatic effects on flavor and texture of fresh-cut fruits and vegetables. In: Lamikanra, O (ed.), *Fresh-Cut Fruits and Vegetables*. CRC Press, Washington, pp. 132–192.

171. Lantz, M.S., Ciborowski, P., 1994. Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods in Enzymology* 235, 563–594.
172. Latorre, M.E., Narvaiz, P., Rojas, A.M., Gerschenson, L.N., 2010. Effects of gamma irradiation on bio-chemical and physico-chemical parameters of fresh-cut red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) root. *Journal of Food Engineering* 98, 178–191.
173. Laveda, F., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A., 2001. Proteolytic Activation of Latent Paraguaya Peach PPO. Characterization of Monophenolase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1003–1008.
174. Leary, D., Vierros, M., Hamon, G., Arico, S., Monagle, C., 2009. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. *Marine Policy* 33, 183–194.
175. Leccese, A., Bartolini, S., Viti, R., 2007. Total antioxidant capacity and phenolics content in apricot fruits. *International Journal of Fruit Science* 7, 3–16.
176. Leccese, A., Bartolini, S., Viti, R., 2012. From genotype to apricot fruit quality: the antioxidant properties contribution. *Plant Foods for Human Nutrition* 67, 317–325.
177. Lee, C.Y., 1992. Enzymatic oxidation of phenolic compounds in fruits. In: Huang, M.T., Lee, C.Y and Ho, C.T (ed.), *Phenolic compounds in food and their effects on health*, ACS Symposium Series (USA), pp 305-317.
178. Lee, C.Y., Jaworski, A.W., 1988. Phenolics and browning potential of white grapes grown in New York. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 337–340.
179. Lee, C.Y., Smith, N.L., Pennesi, A.P., 1983. Polyphenoloxidase from DeChaunac grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34, 987–991.
180. Lee, M.-K., 2007. Inhibitory effect of banana polyphenol oxidase during ripening of banana by onion extract and Maillard reaction products. *Food Chemistry* 102, 146–149.
181. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., Cox, M.M., 2005. *Principles of biochemistry*. Macmillan, New York, 1216p.
182. 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. *Journal of Biological Chemistry* 257, 6414–6419.
183. Lerch, K., 1995. Tyrosinase: Molecular and active-site structure. In: Lee, C.Y and Whitaker, J.R (ed.), *Enzymatic browning and its prevention*, ACS Symposium Series (USA), pp 64-80.
184. Li, Q., Yi, L., Marek, P., Iverson, B.L., 2013. Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters* 587, 1155–1163.
185. Lichou, J., 1998. *Abricot. Les variétés, mode d'emploi*. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL), Paris, 254p.
186. Lichou, J., 2012. *Monographie abricot*. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (CTIFL), Paris, 567p.

187. Limbo, S., Piergiovanni, L., 2006. Shelf life of minimally processed potatoes: Part 1. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acids on enzymatic browning. *Postharvest Biology and Technology* 39, 254–264.
188. Lin, H., Wang, H., Xue, C., Ye, M., 2002. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 588–592.
189. Li-Qin, Z., Jie, Z., Shu-Hua, Z., Lai-Hui, G., 2009. Inhibition of browning on the surface of peach slices by short-term exposure to nitric oxide and ascorbic acid. *Food Chemistry* 114, 174–179.
190. Liu, F., Zhao, J.H., Wen, X., Ni, Y.Y., 2015. Purification and structural analysis of membrane-bound polyphenol oxidase from Fuji apple. *Food Chemistry* 183, 72–77.
191. Liu, L., Cao, S., Qi, X., Yang, Z., 2015. The effect of pH on the activity, thermokinetics and inhibition of polyphenol oxidase from peach. *Journal of Food Science and Technology* 52, 7465–7471.
192. Liu, L., Cao, S., Xie, B., Sun, Z., Li, X., Miao, W., 2007. Characterization of polyphenol oxidase from litchi pericarp using (-)-epicatechin as substrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7140–7143.
193. Loomis, W.D., Battaile, J., 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 5, 423–438.
194. Lopes, F.L.G., Júnior, S., Baptista, J., Souza, R.R. de, Ehrhardt, D.D., Santana, J.C.C., Tambourgi, E.B., 2009. Concentration by membrane separation processes of a medicinal product obtained from pineapple pulp. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52, 457–464.
195. López-Otín, C., Bond, J.S., 2008. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry* 283, 30433–30437.
196. Lozano-de-Gonzalez, P.G., Barrett, D.M., Wrolstad, R.E., Durst, R.W., 1993. Enzymatic browning inhibited in fresh and dried apple rings by pineapple juice. *Journal of Food Science* 58, 399–404.
197. Lu, Z., Yu, Z., Gao, X., Lu, F., Zhang, L., 2005. Preservation effects of gamma irradiation on fresh-cut celery. *Journal of Food Engineering* 67, 347–351.
198. Lurol, S., 2012. *Maitriser la maturation des fruits pêche- poire- abricot-kiwi*. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (CTIFL), Paris, 175p.
199. Ma, S., Silva, J.L., Hearnberger, J.O., Garner, J.O., 1992. Prevention of enzymic darkening in frozen sweet potatoes [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by water blanching: Relationship among darkening, phenols, and polyphenol oxidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 864–867.
200. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J., 1990. Phenolic compounds in fruit processing. In: Macheix, J.J. (ed.), *Fruit phenolics*, CRC Press, Boca Raton, pp. 295–358.
201. Maki, H., Morohashi, Y., 2006. Development of polyphenol oxidase activity in the micropylar endosperm of tomato seeds. *Journal of Plant Physiology* 163, 1–10.
202. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727–747.

203. Maqsood, S., Manheem, K., Gani, A., Abushelaibi, A., 2018. Degradation of myofibrillar, sarcoplasmic and connective tissue proteins by plant proteolytic enzymes and their impact on camel meat tenderness. *Journal of Food Science and Technology* 55, 3427–3438.
204. Mari, S., Marquès, L., Breton, F., Karamanos, Y., Macheix, J.J., 1998. Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 49, 1213–1217.
205. Marino, G., Funk, C., 2012. Matrix metalloproteinases in plants: a brief overview. *Physiologia Plantarum* 145, 196–202.
206. Marques, L., Fleuriet, A., Macheix, J.J., 1995. Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* 33, 193–200.
207. Marrufo-Hernández, N.A., Palma-Orozco, G., Beltrán, H.I., Nájera, H., 2017. Purification, partial biochemical characterization and inactivation of polyphenol oxidase from Mexican Golden Delicious apple (*Malus domestica*). *Journal of Food Biochemistry* 41, e12356.
208. Marshall, M.R., Kim, J., Wei, C.I., 2000. *Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods*. FAO, Rome, 49p.
209. Martín-Belloso, O., Elez-Martínez, P., 2005. Enzymatic inactivation by pulsed electric fields. In: Sun, D.W (ed.), *Emerging Technologies for Food Processing*. Academic Press, Elsevier, pp. 155–181.
210. Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., Inlow, J.K., 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100, 108–123.
211. Mason, H.S., 1956. Structures and functions of the phenolase complex. *Nature* 177, 79–81.
212. Mason, H.S., 1957. Mechanisms of oxygen metabolism. *Science* 125, 1185–1188.
213. Mason, H.S., Peterson, E.W., 1965. Melanoproteins I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 111, 134–146.
214. Matagne, A., Bolle, L., El Mahyaoui, R., Baeyens-Volant, D., Azarkan, M., 2017. The proteolytic system of pineapple stems revisited: Purification and characterization of multiple catalytically active forms. *Phytochemistry* 138, 29–51.
215. Matheis, G., Whitaker, J.R., 1984. Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *Journal of Food Biochemistry* 8, 137–162.
216. Mathew, A.G., Parpia, H.A.B., 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in Food Research* 19, 75–145.
217. Mathew, D.S., Juang, R.-S., 2005. Improved back extraction of papain from AOT reverse micelles using alcohols and a counter-ionic surfactant. *Biochemical Engineering Journal* 25, 219–225.
218. Mayer, A.M., 1986. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry* 26, 11–20.
219. Mayer, A.M., 2004. Resistance to herbivores and fungal pathogens: variations on a common theme? A review comparing the effect of secondary metabolites, induced and constitutive, on herbivores and fungal pathogens. *Journal of Plant Sciences* 52, 279–292.

220. Mayer, A.M., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* 67, 2318–2331.
221. Mayer, A.M., Harel, E., Ben-Shaul, R., 1966. Assay of catechol oxidase—a critical comparison of methods. *Phytochemistry* 5, 783–789.
222. Mazorra-Manzano, M.A., Moreno-Hernández, J.M., Ramírez-Suarez, J.C., 2018. Milk-Clotting Plant Proteases for Cheesemaking. In: Guevara, M.G and Daleo, G.R (ed.), *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*. Springer, Cham, pp. 21–41.
223. Mazzafera, P., Robinson, S.P., 2000. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 55, 285–296.
224. McEvily, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S., 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 32, 253–273.
225. Mellidou, I., Koukounaras, A., Chatzopoulou, F., Kostas, S., Kanellis, A.K., 2017. Plant Vitamin C: One Single Molecule with a Plethora of Roles, in: Yahia, E.M (ed.), *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 463–498.
226. Menard, R., Khouri, H.E., Plouffe, C., Dupras, R., Ripoll, D., Vernet, T., Tessier, D.C., Laliberte, F., Thomas, D.Y., Storer, A.C., 1990. A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain. *Biochemistry* 29, 6706–6713.
227. Mesquita, V.L.V., Queiroz, C., 2013. Enzymatic browning, in: Eskin, N.A.M and Shahidi, F (ed.), *Biochemistry of Foods*. Elsevier, London, pp. 387–418.
228. Milošević, T., Milošević, N., Glišić, I., 2013. Tree growth, yield, fruit quality attributes and leaf nutrient content of ‘Roxana’ apricot as influenced by natural zeolite, organic and inorganic fertilisers. *Scientia Horticulturae* 156, 131–139.
229. Mitchel, R.E., Chaiken, I.M., Smith, E.L., 1970. The complete amino acid sequence of papain additions and corrections. *Journal of Biological Chemistry* 245, 3485–3492.
230. Mohammad, A.W., Ng, C.Y., Lim, Y.P., Ng, G.H., 2012. Ultrafiltration in food processing industry: review on application, membrane fouling, and fouling control. *Food and Bioprocess Technology* 5, 1143–1156.
231. Molitor, C., Mauracher, S.G., Pargan, S., Mayer, R.L., Halbwirth, H., Rompel, A., 2015. Latent and active aurone synthase from petals of *C. grandiflora*: a polyphenol oxidase with unique characteristics. *Planta* 242, 519–537.
232. Molitor, C., Mauracher, S.G., Rompel, A., 2016. Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E1806–E1815.
233. Moore, B.M., Flurkey, W.H., 1990. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *Journal of Biological Chemistry* 265, 4982–4988.
234. Morris, C., Brody, A.L., Wicker, L., 2007. Non-thermal food processing/preservation technologies: a review with packaging implications. *Packaging Technology and Science: An International Journal* 20, 275–286.

235. Munoz, J.L., Garcia-Molina, F., Varon, R., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., 2006. Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity. *Analytical Biochemistry* 351, 128–138.
236. Munoz-Munoz, J.L., Garcia-Molina, F., Molina-Alarcon, M., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., Rodriguez-Lopez, J.N., 2008. Kinetic characterization of the enzymatic and chemical oxidation of the catechins in green tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9215–9224.
237. Murachi, T., Neurath, H., 1960. Fractionation and specificity studies on stem bromelain. *Journal of Biological Chemistry* 235, 99–107.
238. Murata, M., Tsurutani, M., Tomita, M., Homma, S., Kaneko, K., 1995. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 1115–1121.
239. Nagai, T., Suzuki, N., 2001. Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3922–3926.
240. Nath, L.K., Dutta, S.K., 1991. Extraction and purification of curcain, a protease from the latex of *Jatropha curcas* Linn. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43, 111–114.
241. Navarro, J.L., Tárrega, A., Sentandreu, M.A., Sentandreu, E., 2014. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. *Food Chemistry* 157, 283–289.
242. Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.-J., Aubert, S.Y., 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 34, 109–157.
243. Nirmal, N.P., Benjakul, S., 2009. Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Food Chemistry* 116, 323–331.
244. Niu, S., Xu, Z., Fang, Y., Zhang, L., Yang, Y., Liao, X., Hu, X., 2010. Comparative study on cloudy apple juice qualities from apple slices treated by high pressure carbon dioxide and mild heat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11, 91–97.
245. Ôba, K., Iwatsuki, N., Uritani, I., Alvarez, A.M., Garcia, V.V., 1992. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase isozymes in banana bud. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56, 1027–1030.
246. Ojeda, G.A., Sgroppo, S.C., Zaritzky, N.E., 2014. Application of edible coatings in minimally processed sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) to prevent enzymatic browning. *International Journal of Food Science & Technology* 49, 876–883.
247. Oliveira, C.M., Barros, A.S., Ferreira, A.C.S., Silva, A.M.S., 2016. Study of quinones reactions with wine nucleophiles by cyclic voltammetry. *Food Chemistry* 211, 1–7.
248. Onsa, G.H., bin Saari, N., Selamat, J., Bakar, J., 2000. Latent polyphenol oxidases from sago log (*Metroxylon sagu*): partial purification, activation, and some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5041–5045.
249. Osuga, D., Van der Schaaf, A., Whitaker, J.R., 1994. Control of polyphenol oxidase activity using a catalytic mechanism. In: Yada, R.Y., Jackman, R.L and Smith, J.L (ed.), *Protein Structure-Function Relationships in Foods*. Springer, Boston, pp. 62–88.

250. Özoğlu, H., Bayındırlı, A., 2002. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control* 13, 213–221.
251. Pal, G., Sinha, N.K., 1980. Isolation, crystallization, and properties of calotropins DI and DII from *Calotropis gigantea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 202, 321–329.
252. Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., Luis, A., 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 521–530.
253. Palma-Orozco, G., Marrufo-Hernández, N.A., Sampedro, J.G., Nájera, H., 2014. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mango (*Mangifera indica* cv. Manila). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 9832–9840.
254. Palma-Orozco, G., Ortiz-Moreno, A., Dorantes-Álvarez, L., Sampedro, J.G., Nájera, H., 2011. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). *Phytochemistry* 72, 82–88.
255. Pappin, D.J., Hojrup, P., Bleasby, A.J., 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology* 3, 327–332.
256. Park, E.Y., Luh, B.S., 1985. Polyphenol oxidase of kiwi fruit. *Food Science* 50, 678–684.
257. Paul, B., Gowda, L.R., 2000. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3839–3846.
258. Perez-Gilabert, M., García Carmona, F., 2000. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 695–700.
259. Pierpoint, W.S., 2004. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. In: Cutler, P (ed.), *Protein Purification Protocols*. Springer, Humana Press, pp. 65–74.
260. Plaxton, W.C., 2019. Avoiding Proteolysis during the Extraction and Purification of Active Plant Enzymes. *Plant and Cell Physiology* 60, 715–724.
261. Post, A.E., Arnold, B., Weiss, J., Hinrichs, J., 2012. Effect of temperature and pH on the solubility of caseins: Environmental influences on the dissociation of α_s - and β -casein. *Journal of Dairy Science* 95, 1603–1616.
262. Purich, D.L., 1983. *Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism: Selected Methods in Enzymology*. Academic Press, 566p.
263. Queiroz, C., Mendes Lopes, M.L., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., 2008. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International* 24, 361–375.
264. Queiroz, C., Moreira, C.F.F., Lavinhas, F.C., Lopes, M.L.M., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., 2010. Effect of high hydrostatic pressure on phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity in cashew apple juice. *High Pressure Research* 30, 507–513.
265. Radi, M., Mahrouz, M., Jaouad, A., Tacchini, M., Aubert, S., Hugues, M., Amiot, M.J., 1997. Phenolic composition, browning susceptibility, and carotenoid content of several apricot cultivars at maturity. *HortScience* 32, 1087–1091.

266. Raffert, G., Flurkey, W.H., 1995. Carbohydrate associated with broad bean polyphenol oxidase is resistant to enzymatic and chemical deglycosylation. *Phytochemistry* 38, 1355–1360.
267. Ramos, M.V., Araújo, E.S., Jucá, T.L., Monteiro-Moreira, A.C.O., Vasconcelos, I.M., Moreira, R.A., Viana, C.A., Beltramini, L.M., Pereira, D.A., Moreno, F.B., 2013. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. *International Journal of Biological Macromolecules* 58, 211–219.
268. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 597–635.
269. Rathjen, A.H., Robinson, S.P., 1992. Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant Physiology* 99, 1619–1625.
270. Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Finn, R., 2016. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 44, D343–D350.
271. Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B.K., Noci, F., Koutchma, T., Brunton, N., 2011. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International* 44, 1875–1887.
272. Rehder, A., 1949. *Bibliography of cultivated trees and shrubs hardy in the cooler temperate regions of the northern hemisphere*. Jamaica Plain, Massachusetts, Arnold Arboretum, 825p.
273. Richard-Forget, F.C., Gauillard, F.A., 1997. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2472–2476.
274. Robinson, S.P., Dry, I.B., 1992. Broad Bean Leaf Polyphenol Oxidase Is a 60-Kilodalton Protein Susceptible to Proteolytic Cleavage. *Plant Physiology* 99, 317–323.
275. Robinson, S.P., Loveys, B.R., Chacko, E.K., 1993. Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Functional Plant Biology* 20, 99–107.
276. Rojas-Graü, M.A., Garner, E., Martín-Belloso, O., 2010. The fresh-cut fruit and vegetables industry: current situation and market trends. In: Martín-Belloso, O and Soliva-Fortuny, R (ed), *Advances in Fresh-cut Fruits and Vegetables Processing*, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, pp. 9–19.
277. Rouet-Mayer, M.A., Ralambosoa, J., Philippon, J., 1990. Roles of *o*-quinones and their polymers in the enzymic browning of apples. *Phytochemistry* 29, 435–440.
278. Roussos, P.A., Sefferou, V., Denaxa, N.-K., Tsantili, E., Stathis, V., 2011. Apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit quality attributes and phytochemicals under different crop load. *Scientia Horticulturae* 129, 472–478.
279. Sachde, A.G., Al-Bakir, A.Y., Abdul-Raheem, J.A., 1988. Polyphenol oxidase from Barhee and Zahdi dates. II. Characterization. *Journal of Food Biochemistry* 12, 241–252.
280. Sahari, M.A., Mohsen Boostani, F., Zohreh Hamidi, E., 2004. Effect of low temperature on the ascorbic acid content and quality characteristics of frozen strawberry. *Food Chemistry* 86, 357–363.

281. Saluja, D., Sachar, R.C., 1982. GA3-Modulated multiple forms of monophenolase in wheat seed. *Phytochemistry* 21, 2625–2631.
282. Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., Garcia-Carmona, F., 1989. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiology* 91, 1481–1487.
283. Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., Garcia-Carmona, F., 1990. Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature-induced phase partitioning. *Analytical Biochemistry* 184, 279–282.
284. Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F., Garcia-Carmona, F., 1993. Substrate-dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1583–1586.
285. Saraswathy, N., Ramalingam, P., 2011. Protein Identification by Peptide Mass Fingerprinting (PMF). In: Saraswathy, N and Ramalingam, P. (ed.), *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*, Woodhead Publishing, pp. 185–192.
286. Sapers, G.M., 1993. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. *Food technology* 47, 75–84.
287. Sapers, G.M., Miller, R.L., 1992. Enzymatic browning control in potato with ascorbic acid-2-phosphates. *Journal of Food Science* 57, 1132–1135.
288. Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M.M., Toth-Markus, M., 2005. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International* 38, 1023–1029.
289. Sato, T., Nakayama, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Ueda, T., Nishino, T., Tanaka, Y., Kusumi, T., 2001. Enzymatic formation of auronones in the extracts of yellow snapdragon flowers. *Plant Science* 160, 229–236.
290. Schaller, A., 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220, 183–197.
291. Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M., Chretien, M., 1998. Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 839, 9–24.
292. Selkirk, C., 2004. Ion-exchange chromatography. In: Cutler, P (ed.), *Protein Purification Protocols*. Springer, Humana Press, pp. 125–131.
293. Sellés-Marchart, S., Casado-Vela, J., Bru-Martínez, R., 2006. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Kinetic characterization and comparison with the active form. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 446, 175–185.
294. Şener, A., Ünal, M.Ü., 2011. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Akko XIII Loquat (*Eriobotrya japonica* cv Akko XIII). *Food Biotechnology* 25, 30–42.
295. Sengupta, A., Bhattacharya, D., Pal, G., Sinha, N.K., 1984. Comparative studies on calotropins DI and DII from the latex of *Calotropis gigantea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 232, 17–25.

296. Serradell, M. de los A., Rozenfeld, P.A., Martínez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.R., Añón, M.C., 2000. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa*, Duch., cv Selva): characterisation and partial purification. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1421–1427.
297. Shama, G., Alderson, P., 2005. UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialisation. *Trends in Food Science & Technology* 16, 128–136.
298. Sheptovitsky, Y.G., Brudvig, G.W., 1996. Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry* 35, 16255–16263.
299. Sherman, T.D., Vaughn, K.C., Duke, S.O., 1991. A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 30, 2499–2506.
300. Shetty, S.M., Chandrashekar, A., Venkatesh, Y.P., 2011. Eggplant polyphenol oxidase multigene family: cloning, phylogeny, expression analyses and immunolocalization in response to wounding. *Phytochemistry* 72, 2275–2287.
301. Siddiq, M., 2006. Apricots. In: Hui, Y.H (ed.), *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, Blackwell Publishing, Iowa, USA, pp. 279–291.
302. Siddiq, M., Cash, J.N., Sinha, N.K., Akhter, P., 1994. Characterization and inhibition of PPO from pears (*Pyrus communis* L. cv Bose and Red). *Journal of Food Biochemistry* 17, 327–337.
303. Siddiq, M., Dolan, K.D., 2017. Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food chemistry* 218, 216–220.
304. Siddiq, M., Sinha, N.K., Cash, J.N., Hanum, T., 1996. Partial purification of polyphenol oxidase from plums (*Prunus domestica* L., cv. Stanley). *Journal of Food Biochemistry* 20, 111–123.
305. Silva, E.K., Meireles, M.A.A., Saldaña, M.D., 2020. Supercritical carbon dioxide technology: A promising technique for the non-thermal processing of freshly fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology* 97, 381–390.
306. Silvestre, M.P.C., Carreira, R.L., Silva, M.R., Corgosinho, F.C., Monteiro, M.R.P., Morais, H.A., 2012. Effect of pH and temperature on the activity of enzymatic extracts from pineapple peel. *Food and Bioprocess Technology* 5, 1824–1831.
307. Simões, I., Faro, C., 2004. Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry* 271, 2067–2075.
308. Singh, B., Suri, K., Shevkani, K., Kaur, Amritpal, Kaur, Amarbir, Singh, N., 2018. Enzymatic Browning of Fruit and Vegetables: A Review. In: Kuddus, M (ed.), *Enzymes in Food Technology*. Springer, Singapore, pp. 63–78.
309. Singh, H.P., Ravindranath, S.D., 1994. Occurrence and distribution of PPO activity in floral organs of some standard and local cultivars of tea. *Science of Food and Agriculture* 64, 117–120.
310. Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U.C., 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances* 20, 341–359.
311. Singleton Vernon, L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152–78.

312. Singleton, A., Buttle, D.J., 2013. Ficin. In: Rawlings, N.D and Salvesen, G (ed.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier, Academic Press, pp. 1877–1879.
313. Singleton, V.L., 1987. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 69–77.
314. Sochor, J., Zitka, O., Skutkova, H., Pavlik, D., Babula, P., Krska, B., Horna, A., Adam, V., Provaznik, I., Kizek, R., 2010. Content of phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of apricot genotypes. *Molecules* 15, 6285–6305.
315. Sojo, M.M., Nunez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A., 1998. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4924–4930.
316. Soler-Rivas, C., Arpin, N., Olivier, J.M., Wichers, H.J., 1997. Activation of tyrosinase in *Agaricus bisporus* strains following infection by *Pseudomonas tolaasii* or treatment with a tolaasin-containing preparation. *Mycological Research* 101, 375–382.
317. Soliva-Fortuny, R.C., Grigelmo-Miguel, N., Odriozola-Serrano, I., Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., 2001. Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3685–3690.
318. Solomon, E.I., Baldwin, M.J., Lowery, M.D., 1992. Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chemical Reviews* 92, 521–542.
319. Sommer, A., Ne'eman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M., Harel, E., 1994. Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiology* 105, 1301–1311.
320. Song, Y.-H., Connor, E., Li, Y., Zorovich, B., Balducci, P., Maclaren, N., 1994. The role of tyrosinase in autoimmune vitiligo. *The Lancet* 344 (8929), 1049–1052.
321. Srinivas, P.R., 2019. Introduction to Protein Electrophoresis. In: Kurien, B.T and Scofield, R.H (ed.), *Electrophoretic Separation of Proteins*. Springer, Humana Press, New York, pp. 23–29.
322. Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H., Strack, D., 1999. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* 208, 114–124.
323. Sun, H.-J., Wang, J., Tao, X.-M., Shi, J., Huang, M.-Y., Chen, Z., 2012. Purification and characterization of polyphenol oxidase from rape flower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 823–829.
324. Tanabe, S., Arai, S., Watanabe, M., 1996. Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60, 1269–1272.
325. Taylor, A.J., Clydesdale, F.M., 1987. Potential of oxidised phenolics as food colourants. *Food Chemistry* 24, 301–313.
326. Thiede, B., Höhenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F., Jungblut, P.R., 2005. Peptide mass fingerprinting. *Methods* 35, 237–247.
327. Thipyapong, P., Steffens, J.C., 1997. Tomato polyphenol oxidase (differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals). *Plant Physiology* 115, 409–418.

328. Tolbert, N.E., 1973. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiology* 51, 234–244.
329. Turk, V., 1999. *Proteases: new perspectives*. Springer, Birkhäuser Basel, 238p.
330. Uhlig, H., 1998. *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons, 472p.
331. Ünal, M.Ü., 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry* 100, 909–913.
332. Ünal, M.Ü., Şener, A., 2006. Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2374–2379.
333. Ünal, M.Ü., Şener, A., 2016. Two-year comparison of the biochemical properties of polyphenol oxidase from Turkish Alyanak apricot (*Prunus armenica* L.). *Food Chemistry* 190, 741–747.
334. Valero, E., García-Carmona, F., 1998. pH-dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2447–2451.
335. Van Gelder, C.W., Flurkey, W.H., Wichers, H.J., 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45, 1309–1323.
336. Van Leeuwen, J., Wichers, H.J., 1999. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycological Research* 103, 413–418.
337. Vandooren, J., Geurts, N., Martens, E., Van den Steen, P.E., Opdenakker, G., 2013. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods* 10, 211.
338. Vaughan, P.F.T., Butt, V.S., 1969. The hydroxylation of *p*-coumaric acid by an enzyme from leaves of spinach beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochemical Journal* 113, 109–115.
339. Vaughn, K.C., Duke, S.O., 1981. Tissue localization of polyphenol oxidase in Sorghum. *Protoplasma* 108, 319–327.
340. Vaughn, K.C., Lax, A.R., Duke, S.O., 1988. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiologia Plantarum* 72, 659–665.
341. Vela, G., León, D., García, H., La Cruz, J.D., 2003. Polyphenoloxidase activity during ripening and chilling stress in ‘Manila’ mangoes. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78, 104–107.
342. Vomas-Vigyazo, L., 1981. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 14, 44.
343. Walker, J.R., 1976. The control of enzymic browning in fruit juices by cinnamic acids. *International Journal of Food Science & Technology* 11, 341–345.
344. Walker, J.R., Ferrar, P.H., 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 15, 457–498.
345. Walker, J.R.L., 1995. Enzymatic Browning in Fruits. In: Lee, C.Y and Whitaker, J.R (ed.), *enzymatic browning and its prevention*, ACS Symposium Series (USA), pp. 8–22.

346. Wang, W., Tai, F., Chen, S., 2008. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of Separation Science* 31, 2032–2039.
347. Watada, A.E., 1986. Effects of ethylene on the quality of fruits and vegetables. *Food Technology* 40, 82–85.
348. Whitaker, J.R., 1994. *Principles of enzymology for the food sciences*. CRC Press, Routledge, 648p.
349. Whitaker, J.R., Lee, C.Y., 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In: Lee, C.Y and Whitaker, J.R (ed.), *enzymatic browning and its prevention*, ACS Symposium Series (USA), pp. 2–7.
350. Winters, A.L., Minchin, F.R., Michaelson-Yeates, T.P.T., Lee, M.R.F., Morris, P., 2008. Latent and Active Polyphenol Oxidase (PPO) in Red Clover (*Trifolium pratense*) and Use of a Low PPO Mutant To Study the Role of PPO in Proteolysis Reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2817–2824.
351. Witherspoon, J.M., Jackson, J.F., 1996. Analysis of fresh and dried apricot, in: Linskens, H.F and Jackson, J.F (ed.), *Fruit Analysis*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 111–131.
352. Wong, T.C., Luh, B.S., Whitaker, J.R., 1971. Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of clingstone peach. *Plant Physiology* 48, 19–23.
353. Yamagata, H., Masuzawa, T., Nagaoka, Y., Ohnishi, T., Iwasaki, T., 1994. Cucumisin, a serine protease from melon fruits, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *Journal of Biological Chemistry* 269, 32725–32731.
354. Yang, C., Ma, C., Hua, W., Xu, C., 2002. The Distribution of PPO in Wheat Plant. *Journal of Anhui Agricultural College* 29, 366–368.
355. Yang, C.-P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M.D., Nakamura, N., Hayashi, N., 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2732–2735.
356. Yasuda, Y., Takahashi, N., Murachi, T., 1970. Composition and structure of carbohydrate moiety of stem bromelain. *Biochemistry* 9, 25–32.
357. Yemenicioğlu, A., Cemeroğlu, B., 2003. Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2371–2379.
358. Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Cemeroğlu, B., 1997. Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation of its latent form. *Journal of Food Science* 62, 508–510.
359. Yoruk, R., Marshall, M.R., 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review I. *Journal of Food Biochemistry* 27, 361–422.
360. Yue-Ming, J., Zauberman, G., Fuchs, Y., 1997. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biology and Technology* 10, 221–228.

361. Zaini, N.A.M., Osman, A., Hamid, A.A., Ebrahimpour, A., Saari, N., 2013. Purification and characterization of membrane-bound polyphenoloxidase (mPPO) from Snake fruit [*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss]. *Food Chemistry* 136, 407–414.
362. Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., Eskin, N.A.M., 1991. Polyphenol Oxidase. In: Robinson, D.S and Eskin, N.A.M (ed.), *Oxidative enzymes in foods*. Elsevier Applied Science; New York, pp 217–273.
363. Zekiri, F., Molitor, C., Mauracher, S.G., Michael, C., Mayer, R.L., Gerner, C., Rompel, A., 2014. Purification and characterization of tyrosinase from walnut leaves (*Juglans regia*). *Phytochemistry* 101, 5–15.
364. Zhan, L., Li, Y., Hu, J., Pang, L., Fan, H., 2012. Browning inhibition and quality preservation of fresh-cut romaine lettuce exposed to high intensity light. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 14, 70–76.
365. Zhang, J.B., Zhang, H., Wang, H.L., Zhang, J.Y., Luo, P.J., Zhu, L., Wang, Z.T., 2014. Risk analysis of sulfites used as food additives in China. *Biomedical and Environmental Sciences* 27, 147–54.
366. Zhang, Z., Wang, J., Zhang, X., Shi, Q., Xin, L., Fu, H., Wang, Y., 2018. Effects of radio frequency assisted blanching on polyphenol oxidase, weight loss, texture, color and microstructure of potato. *Food Chemistry* 248, 173–182.
367. Zhong, K., Wu, J., Wang, Z., Chen, F., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., 2007. Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chemistry* 100, 115–123.
368. Zhong, K.U.I., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., 2005. Kinetics of inactivation of *Escherichia coli* in carrot juice by pulsed electric field. *Journal of Food Process Engineering* 28, 595–609.
369. Zhou, H.-W., Feng, X., 1991. Polyphenol oxidase from Yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 57, 307–313.
370. Zhou, L., Liao, T., Liu, W., Zou, L., Liu, C., Terefe, N.S., 2019. Inhibitory effects of organic acids on polyphenol oxidase: From model systems to food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 0, 1–28.
371. Zhou, L., Ling, B., Zheng, A., Zhang, B., Wang, S., 2015. Developing radio frequency technology for postharvest insect control in milled rice. *Journal of Stored Products Research* 62, 22–31.
372. Zhou, L., Liu, W., Terefe, N.S., 2018. The inactivation kinetics of soluble and membrane-bound polyphenol oxidase in pear during thermal and high-pressure processing. *Food and Bioprocess Technology* 11, 1039–1049.

Annexes

■ Annexe I

Courbes d'étalonnage pour le dosage des polyphénols

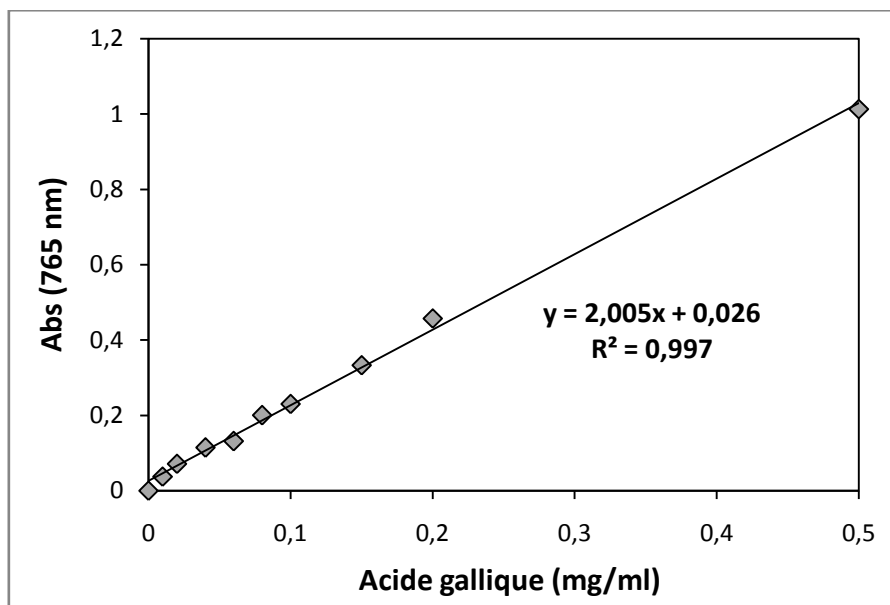


Figure A.I.1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

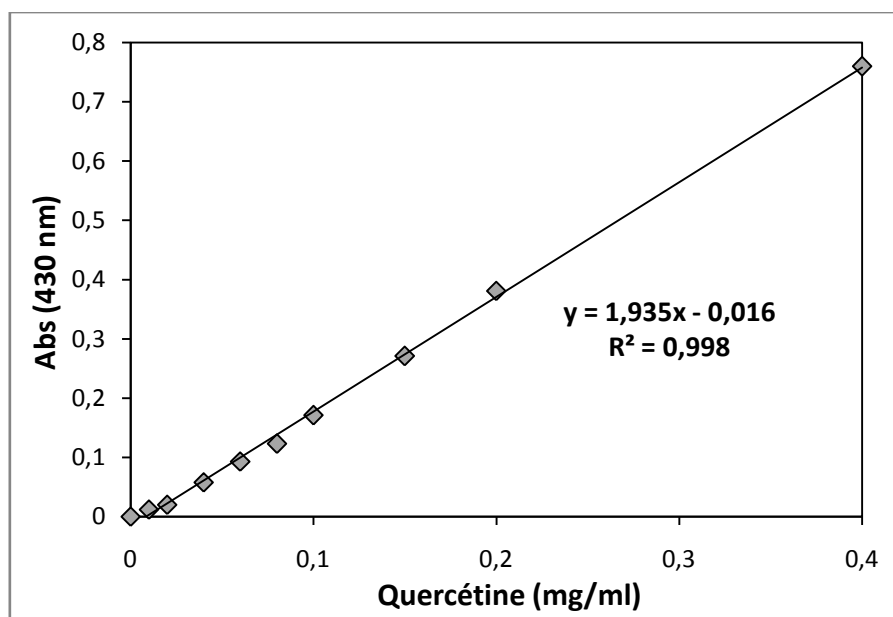


Figure A.I.2. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

■ Annexe II

Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines (Bradford, 1976)

Préparation du réactif de Bradford

- Bleu de Coomassie G-250 (100 mg).
- Ethanol (50 m).
- Acide phosphorique à 85% (100 ml).
- Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée.
- Filtrer la solution avec du papier Whatman N°1.

Elaboration de la courbe d'étalonnage

Une gamme étalon (0,002-1,5 mg/l) est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) (2mg/1ml). Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées en présence de l'eau distillée (10 µl). Après 20 minutes de l'addition du réactif de Bradford (200 µl), l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc. Les concentrations protéiques des extraits seront déduites à partir de cette courbe d'étalonnage de forme $y = ax^2 + bx + c$.

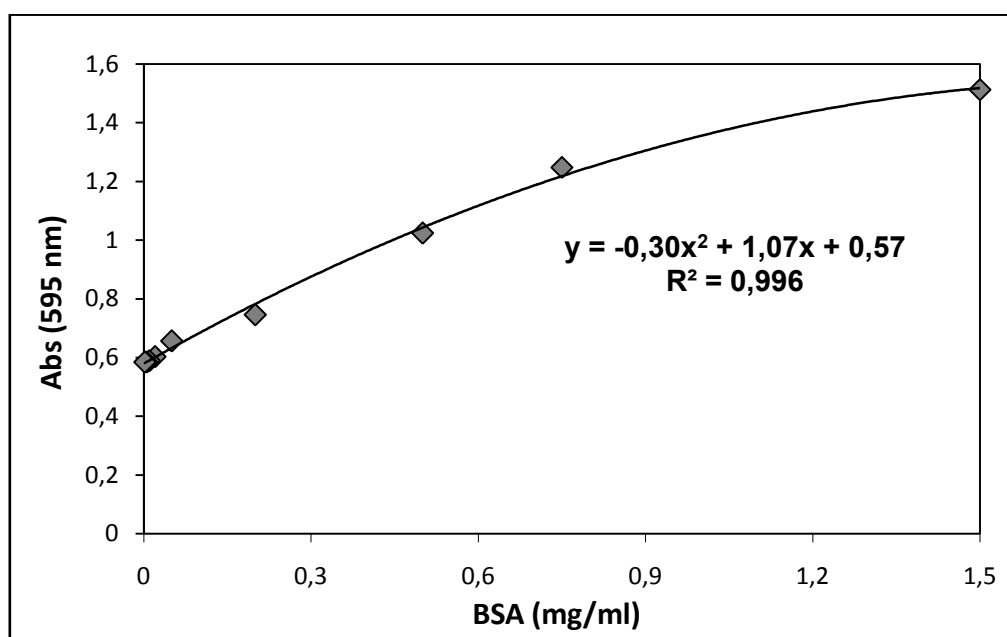


Figure A.II.1. Courbe d'étalonnage de la BSA pour le dosage des protéines.

■ Annexe III

Electrophorèse des protéines (SDS-PAGE) (Lammeli, 1970)

Tableau A.III.1. Préparation de gel de concentration (2 ml).

Solutions	5 %
Acrylamide 30%	334 µl
Tampon Tris-HCl (1 M ; pH 6.8)	250 µl
SDS (10%, P/V)	20 µl
H ₂ O	1374 µl
APS (10%, P/V)	15 µl
TEMED	7 µl

Tableau A.III.2. Préparation des gels de migration (5 ml).

Solutions	9%	gel à gradient (10-15%)	
		10%	15%
Acrylamide 30%	1500 µl	1670 µl	2500 µl
Tampon Tris-HCl (1,5M ; pH 8.8)	1250 µl	1250 µl	1250 µl
SDS (10%, P/V)	5 µl	50 µl	50 µl
H ₂ O	2180 µl	2000 µl	650 µl
Glycérol	/	/	500 µl
APS (10%, P/V)	25 µl	25 µl	25 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl

Tableau A.III.3. Préparation des solutions pour électrophorèse.

Tampon d'échantillon	Tampon de migration x10	Solution de coloration	Solution de décoloration
Tris-Hcl (0,25M, pH 6,8)	Tris (30g)	G250 (1,5 g)	Ethanol (1000 ml)
B-Mercaptoéthanol (10%)	HEPES (100 mM)	Ethanol (455 ml)	Acide acétique glaciale (200 ml)
SDS (4%)	SDS (10g)	Eau distillée (480 ml)	
Glycérol (20%)	Glycine (144g).	Acide acétique glaciale (75 ml)	Eau distillée (800 ml)
Bleu de bromophénol (0,2%)	Eau distillée (1000 ml)		

■ Annexe IV

Codage des acides aminés







Tableau A.IV.1. Codage à 1 lettre et à 3 lettres des acides aminés.

Acide aminé	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres
Acide glutamique	E	Glu
Acide aspartique	D	Asp
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Cystéine	C	Cys
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

■ Annexe V

Purées d'abricots traitées après 10 jours de stockage

Tableau A.V.1. Aspect des purées d'abricot traitées avec les combinaisons « AA 500 mg/P 100 mg », après 10 jours de stockage.

		
Abricot Frais	AA 500 mg/Papaine 100 mg	AA 500 mg/Calotropaine 100 mg
		
AA 500 mg	AA 500 mg/Ficine 100 mg	AA 500 mg/Bromélaïne 100 mg

■ **Annexe VI**

Publications scientifiques

Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase from Apricot (*Prunus armeniaca* L.)

Ala eddine Derardja,^{†,‡} Matthias Pretzler,[†] Ioannis Kampatsikas,[†] Malika Barkat,[‡] and Annette Rompel^{*,†,§}

[†]Universität Wien, Fakultät für Chemie, Institut für Biophysikalische Chemie, Althanstraße 14, 1090 Wien, Austria

[‡]Laboratoire Bioqual, INATAA, Université des Frères Mentouri, Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

Supporting Information

ABSTRACT: Polyphenol oxidase from apricot (*Prunus armeniaca*) (PaPPO) was purified in its latent form (L-PaPPO), and the molecular weight was determined to be 63 kDa by SDS-PAGE. L-PaPPO was activated in the presence of substrate at low pH. The activity was enhanced by CuSO₄ and low concentrations (≤ 2 mM) of SDS. PaPPO has its pH and temperature optimum at pH 4.5 and 45 °C for catechol as substrate. It showed diphenolase activity and highest affinity toward 4-methylcatechol ($K_M = 2.0$ mM) and chlorogenic acid ($K_M = 2.7$ mM). L-PaPPO was found to be spontaneously activated during storage at 4 °C, creating a new band at 38 kDa representing the activated form (A-PaPPO). The mass of A-PaPPO was determined by mass spectrometry as 37 455.6 Da (Asp102 → Leu429). Both L-PaPPO and A-PaPPO were identified as polyphenol oxidase corresponding to the known PaPPO sequence (UniProt O81103) by means of peptide mass fingerprinting.

KEYWORDS: apricot, tyrosinase, polyphenol oxidase, protein purification, characterization, activation

INTRODUCTION

Apricot (*Prunus armeniaca* L.) is one of the most delicious and important crops in the Mediterranean region and is consumed worldwide. Algeria is the leading apricot producer of Africa and the fifth largest producer in the world with an annual production of 286 000 tons (FAO, 2017). Apricot is considered as an excellent source of phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C.¹ Apricot conservation is a challenge resulting in a limited period of storage (2 weeks), during which the fruit rapidly loses its attractive and pleasant orange color and becomes brownish,² a color which is not accepted by the market. This loss is mainly caused by enzymatic reactions that lead to browning.³ Different preservation methods such as freezing, canning and drying are commonly applied to extend the availability of the fruits.⁴ However, browning remains a problem in apricot handling and preservation and is believed to be a major factor of quality loss during processing.⁵

Most browning reactions in fruits are assumed to be a direct consequence of polyphenol oxidase (PPO) action on phenolic compounds. This reaction produces quinones, highly reactive compounds that can polymerize spontaneously to form brown pigments, which are responsible for the loss of quality of fresh-cut fruit and vegetable products.⁵

Polyphenol oxidases (catechol oxidases (EC 1.10.3.1) and tyrosinases (EC 1.14.18.1)) are oxidoreductases that activate molecular oxygen and catalyze the hydroxylation (tyrosinases only) and/or oxidation (both tyrosinases and catechol oxidases) of phenolic compounds. Although PPOs have been investigated intensively for many years (biochemically as well as structurally), the reasons for their divergent substrate specificity is still under debate^{6,7} and the natural substrates of nearly all PPOs are still unknown. PPOs are widely distributed in plants, fungi, and bacteria.⁸ Plant PPOs are mainly associated with enzymatic browning reactions and with the protection of organisms against biotic and abiotic stress.⁸ Plant PPOs consist

of three domains: a signal peptide (minority of plant PPOs) or a transit peptide containing a thylakoid transfer domain (majority of plant PPOs) (~4–9 kDa), a catalytically active domain (~40 kDa), and a C-terminal domain (~19 kDa). PPOs are expressed as ~64–68 kDa pro-enzymes (latent form) *in vivo*.⁹ Apricot contains a gene coding for a PPO precursor polypeptide of 597 amino acids with a calculated molecular weight of 67.1 kDa; the mature protein (latent form) has 496 amino acids (Asp102 → Ser597) with a calculated molecular weight of 56.2 kDa.¹⁰ The C-terminal domain shields the PPO's active site,^{7,11,12} wherefore the enzymes possess either only very weak or even no enzymatic activity *in vitro*, unless the enzymes are activated artificially, for example, by proteases, acidic pH, fatty acids, or detergents (e.g., SDS).¹³

PPOs are members of the type-3 copper enzyme family that contain a dinuclear copper site, in which both copper atoms are coordinated by three histidines each and can bind either molecular oxygen (side-on in a $\mu-\eta^2:\eta^2$ -peroxo geometry), hydroxide, or water molecules in a bridging mode as reviewed in ref 14. The distance between the copper atoms ranges from 2.8–4.6 Å, depending on the state of the active site.¹⁴

The characterization of PPO activity in apricot is of great interest to the food industry. Chevalier et al. (1999) reported the purification of (latent) apricot PPO to homogeneity, even if the biochemical characterization done was minimal.¹⁰ Partial purification of a latent PPO from peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina) has been reported.¹⁵ A better inhibition method against enzymatic browning may be developed through the understanding of the chemistry, structure, and mechanism of action of PPOs.³ Thus, in this paper, we investigate both the

Received: July 12, 2017

Revised: August 16, 2017

Accepted: August 16, 2017

Published: August 16, 2017

molecular and kinetic properties of latent and active apricot (*Prunus armeniaca* L.) PPO.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. Fruits of *Prunus armeniaca* L. cv. Bulida were harvested from a local farm in the M'sila region of Algeria at commercial maturity in June 2016. The fruits were immediately transported to the laboratory and stored at 4 °C, where they were processed the same day. Apricots were rinsed with tap water, deseeded, frozen in liquid nitrogen, immediately broken into small pieces with mortar and pestle, lyophilized, and stored at -25 °C until use.

Extraction of Apricot PPO. Apricot PPO (*PaPPO*) was extracted as described by Ůnal and Şener¹⁶ with some modifications. Using a prechilled blender, the lyophilized apricots (100 g) were homogenized for 2 min in 500 mL of cold acetone (-25 °C) containing 4 g of poly(ethylene glycol) (PEG 4000). The slurry was filtered through filter paper, and the residue was re-extracted several times with 300 mL of cold acetone until a white powder was obtained. The resultant acetone powder was dried overnight at room temperature and was homogenized in 1 L of cold sodium phosphate buffer (0.1 M) at pH 6.8 containing 30 mM sodium ascorbate, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVPP), 0.5% (v/v) Triton X-100 and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The homogenate was stirred for 45 min at 4 °C, then centrifuged at 30000 × g for 30 min at 4 °C. The supernatant was subjected to (NH₄)₂SO₄ precipitation (85% saturation). The precipitated fraction was separated from the supernatant by centrifugation at 30000 × g for 30 min at 4 °C. The precipitate was dissolved in 250 mL of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) to obtain the crude extract.

Purification by Fast Protein Liquid Chromatography. The crude extract was dialyzed overnight at 4 °C against three changes of Tris-HCl buffer (10 mM, pH 8). The dialyzed suspension was centrifuged at 30000 × g for 30 min at 4 °C and filtered (through a 0.45 μm poly(ether sulfone) membrane) before being applied to an ÄKTA fast protein liquid chromatography system (FPLC). The protein solution was loaded onto an anion exchange column (Q-Sepharose FF, 20 mL) pre-equilibrated with 10 mM Tris-HCl, pH 8. Bound proteins were eluted with a linear gradient of sodium chloride (0 to 1 M) at a flow rate of 5 mL/min (Figure 1A). The fractions were monitored for protein content (280 nm) as well as for enzymatic activity (diphenolase activity). Fractions containing activity were pooled and concentrated by ultrafiltration (30 kDa molecular weight cutoff) driven by centrifugal force (3200 × g, 4 °C). The protein solution was then applied to a Mono S HR 5/50 GL column for cation exchange chromatography. The column was pre-equilibrated with 10 mM sodium acetate buffer, pH 5, and eluted with a linear gradient of sodium chloride (0 to 1 M) at a flow rate of 1 mL/min (Figure 1B). The active fractions were pooled, washed with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8, and concentrated by ultrafiltration. Enzyme activity during the purification was monitored as described below, using catechol as substrate, in 50 mM sodium citrate buffer (pH 6.5) containing 2 mM SDS as activator.

Enzyme Activity and Protein Concentration. *PaPPO* activity measurements were performed at 25 °C in 200 μL of assay mixture by measuring the increase in absorbance at 410 nm using a microplate reader (Infinite M200, Tecan). The standard reaction mixture consisted of 0.5 μg of enzyme and 10 mM catechol in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.5). *PaPPO* activity was determined from the slope of the initial linear part of the experimental curves (absorbance vs time) and expressed as U/mL. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme that catalyzed the formation of 1 μmol of quinones per minute (1 U = 1 μmol/min). The purified enzyme (*L-PaPPO*) of 63 kDa was found to be activated in the reaction media with the tested diphenol without the addition of an external activator (e.g., SDS). All assays were performed in triplicate. Protein contents of the enzyme solutions were determined according to the Bradford method¹⁷ using bovine serum albumin as standard.

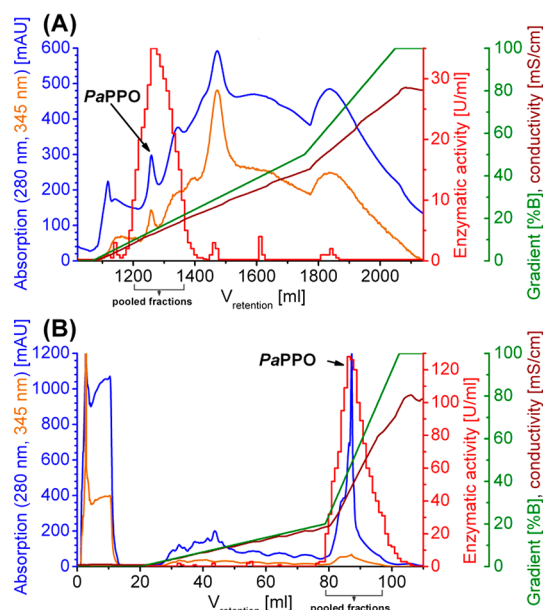


Figure 1. Chromatographic separation steps. (A) AEX chromatography using Q-Sepharose as the stationary phase. (B) CEX chromatography on MonoS. Legend: (blue) UV absorbance at 280 nm (mAU), (orange) UV absorbance at 345 nm (mAU), (red) PPO activity (U/mL), (green) elution gradient (% buffer B), (brown) conductivity (mS/cm).

Gel Electrophoresis. Denaturing SDS-PAGE was performed as described by Laemmli¹⁸ in a mini gel apparatus (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad). Enzyme solutions were denatured by heating at 99 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf) for 5 min; the samples were applied under reducing conditions to 5% stacking and 9% resolving polyacrylamide gels, which were subsequently run at 120 V. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. Molecular weight was estimated by comparison to molecular weight markers (Precision Plus Protein Standard Dual Color, Bio-Rad). Target proteins (bands at 63 kDa (*L-PaPPO*) and 38 kDa (*A-PaPPO*)) were cut out and used for protein identification. To permit substrate staining, 9% partially denaturing SDS-PAGE was performed as described above with the two sole modifications of omitting the β-mercaptoethanol in the loading buffer and the skipping of the heating step prior to loading the samples on the gel. Activity staining for *PaPPO* was done by immersing the gel in 50 mM sodium citrate buffer (pH 6.5) containing 0.2 M catechol at 25 °C. The in-gel activity staining was performed at pH 6.5 to avoid *L-PaPPO* activation at low pH (optimum pH 4.5). Photographs of the gels were taken after 20 min of incubation on an orbital shaker.

Effect of pH. The *PaPPO* activity as a function of pH was determined under the same assay conditions as described above, over the pH range from 2.0 to 9.5 with two kinds of buffer solutions: 50 mM sodium citrate buffer for the pH range of 2.0 to 7.0 and 50 mM Tris-HCl buffer for the pH range of 7.0 to 9.5. *PaPPO* activity was calculated in the form of percent residual *PaPPO* activity at the optimum pH. The optimum pH obtained was used in all other studies (except for in-gel activity staining).

Effect of Temperature. The effect of temperature on purified *PaPPO* activity was estimated over a temperature range of 5 to 90 °C, using a Shimadzu UV spectrophotometer (UV-1800) connected to a thermostat (Julabo F25) through a circulating water bath in order to control and maintain the desired temperature. The optimum temperature for *PaPPO* activity was determined in 600 μL of assay mixture, containing 1.5 μg of enzyme and 10 mM catechol in 50 mM citrate buffer (pH 4.5). The substrate and buffer were incubated for 10 min at the appropriate temperature using a water bath (Julabo F25), prior to the addition of the enzyme solution. *PaPPO* activity is

presented in the form of percent residual activity relative to the *Pa*PPO activity at the optimum temperature.

Thermal Inactivation. To study the thermal inactivation of *Pa*PPO, the enzyme (0.5 μ g) was incubated in 50 mM citrate buffer (pH 4.5), for various times (2, 5, 10, 20, and 30 min) at temperatures between 50 and 100 °C in a thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf), rapidly cooled in an ice bath for 10 min, and warmed up to 25 °C, and then the residual enzyme activity was analyzed with 10 mM of catechol in 200 μ L of assay mixture. The maximum activity at optimum temperature was set as 100%.

Substrate Specificity and Kinetic Parameters. The substrate specificity of *Pa*PPO was determined with different substrates: monophenols (phenol and tyramine), diphenols (*L*-dopa, caffeic acid, chlorogenic acid, catechol, 4-methylcatechol, dopamine), and a triphenol (pyrogallol) at 10 mM concentration, except for *L*-dopa and caffeic acid (1 mM) due to low substrate water solubility. The results are expressed relative to the activity on catechol (considered as 100%). Substrates that showed high activity were selected to calculate the kinetic parameters. In order to determine the Michaelis constant (K_M) and maximum velocity (V_{max}), *Pa*PPO activities were determined under the assay conditions described above using catechol, 4-methylcatechol, chlorogenic acid, and pyrogallol as substrates at various concentrations (0–160 mM). K_M and V_{max} values of the enzyme were calculated by nonlinear regression. The maximal turnover rate (k_{cat}) was calculated by dividing total substrate converted per min by total molecules of *Pa*PPO in the reaction mixture. Molar absorption coefficients in 50 mM sodium citrate at pH 4.5 were determined by quantitative oxidation of small quantities of the respective diphenol by an excess of sodium periodate as described by Muñoz et al.¹⁹

Effect of SDS, Inhibitors and Metal Ions on Enzyme Activity. The effects of different concentrations of SDS (0–10 mM) on *Pa*PPO activity were studied, as well as the effects of a wide range of inhibitors (4-hexylresorcinol, ascorbic acid, benzoic acid, citric acid, kojic acid, succinic acid, EDTA, glutathione (reduced), *L*-cysteine, and sodium metabisulfite) for inhibitor concentrations of 0.1, 1, 5, and 10 mM. The effects of various metal ions ($MgSO_4$, $CaCl_2$, $FeSO_4$, KCl, NaCl, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $MnCl_2$, $AlCl_3$, and $NiCl_2$) on enzyme activity were also investigated for two concentrations of metal ions, 1 and 10 mM, respectively. The enzymatic activity of the control mixture without SDS, inhibitors, and metal ions was taken as 100%, and then compared to the other treatments. The activity was determined as described above.

Storage Stability of the Purified *Pa*PPO. In order to assess the behavior of *Pa*PPO during storage at 4 °C, enzyme activity, SDS-PAGE, and activity gels were assayed weekly over 4 weeks. The enzyme activity was tested without and with SDS (0.5 mM) and reported relative to the initial *Pa*PPO activity without SDS (set as 100%).

Molecular Mass Determination. Electrospray ionization liquid chromatography mass spectrometry was performed in an ESI-LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific Bremen, Germany) with a mass range of 200–4000 m/z and a mass accuracy close to 3 ppm with external calibration. Prior to MS measurements, the purified *Pa*PPO solution was ultrafiltered by centrifugation, and the buffer system was changed to 5 mM ammonium acetate, pH 5, in order to reduce the concentration of nonvolatile salts to a minimum. Afterward a protein solution with a concentration of approximately 0.53 g/L was diluted 100 times in a mixture of 80% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) formic acid.

Protein Identification and Sequence Confirmation. The gel pieces containing the bands at 63 and 38 kDa obtained by denaturing SDS-PAGE (20 and 4 μ g of protein, respectively) were used. Tryptic digestions of *Pa*PPO were analyzed by nanoUHPLC-ESI-MS/MS using a high-resolution Orbitrap mass spectrometer (Dionex Ultimate 3000 RSLCnano, Q Exactive Orbitrap, Thermo Scientific). The data analysis was performed with Proteome Discoverer 1.4 by searching against the *P. armeniaca* entries from the UniProt database (containing all listed proteins from *P. mume*, *P. persica*, and *P. armeniaca*). Peptide mass tolerance was 5 ppm, and the fragment mass tolerance was 0.5

Da. Variable modifications allowed were oxidation of methionines and carbamidomethylation of cysteines.

Statistical Analysis. All experiments were carried out in triplicate; arithmetic mean and standard deviation are reported.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction and Purification of *L*-*Pa*PPO. To extract *L*-*Pa*PPO, lyophilized apricot was subjected to acetone extraction

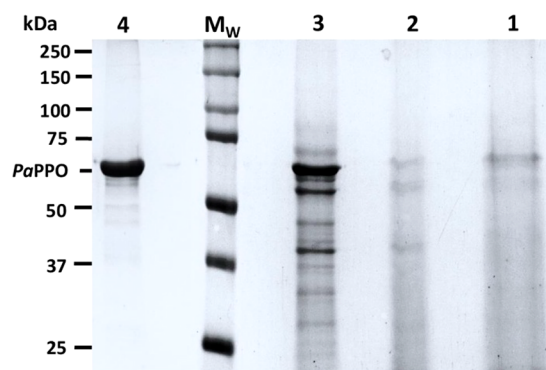


Figure 2. SDS-PAGE of *L*-*Pa*PPO purification steps: (1) crude extract, (2) dialysis, (3) anion exchange on Q-Sepharose, (M_w) molecular weight marker (values are given in kDa), (4) cation exchange on MonoS.

to eliminate most interfering compounds.²⁰ PVPP was used during extraction to avoid interaction of phenolic compounds with PPO.²¹ Triton X-100 is widely used in the recovery of membrane-bound PPOs as it provides a mild, nondenaturing solubilization of proteins.²¹ Ascorbic acid was also included to reduce quinones during PPO extraction and initial purification.²² PMSF was added to the extraction buffer as a serine protease inhibitor.²³ After centrifugation, the supernatant was subjected to ammonium sulfate precipitation at 85% saturation.

After ammonium sulfate precipitation, the *L*-*Pa*PPO was purified by a three-step procedure (SDS page shown in Figure 2 and summarized in Table 1) involving dialysis, anion exchange chromatography (Figure 1a), and cation exchange chromatography (Figure 1b). The crude extract was dialyzed against Tris-HCl-buffer, and the resulting protein solution was applied to an anion-exchange column using a FPLC system (Figure 1A). Five major protein peaks were eluted in which *Pa*PPO activity was found. The highest activity was present in the fractions that were recovered from the second peak eluted at \sim 9 mS/cm (1210–1390 mL) (Figure 1A). Negligible *Pa*PPO activity occurred in some of the other eluting fractions. However, there was a little activity with the unbound proteins present in the flow-through of the column (data not shown), which induced a loss of activity after this step of purification (Table 1). Fractions possessing activity were pooled, concentrated, and then further purified by cation exchange on a MonoS column, which eluted the protein into a single peak of *L*-*Pa*PPO activity at \sim 18.5 mS/cm (78–96 mL) (Figure 1B). *L*-*Pa*PPO was successfully purified 23.2-fold with 51.0% recovery and a specific activity on 10 mM catechol of 459 U/mg (see Figure 2 and Table 1).

Effect of pH on *Pa*PPO Activity. The activity of purified *Pa*PPO was measured at different pH values, ranging from 2.0 to 9.5, using catechol as substrate (Figure 3a). The enzyme remains active from pH 2.5 (38%) to pH 9 (17%) with a pH optimum of maximal activity at pH 4.5 (100%). The enzymatic

Table 1. Purification of Polyphenol Oxidase from Apricot

purification stage	volume (mL)	total protein (mg)	total activity ^a (units)	specific activity ^a (units/mg protein)	purification (fold)	yield (%)
crude extract: 85% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	250	130	2570	19.8	1	100
dialysis against Tris-HCl	300	69.0	2312	33.5	1.7	89.0
anion exchange: Q-Sepharose FF 20 mL column	1.23	12.1	1506	125	6.3	58.6
cation exchange: MonoS 5/50 GL column	1.00	2.9	1311	459	23.2	51.0

^aEnzymatic activity was determined on 10 mM catechol in 50 mM citrate buffer, pH 4.5.

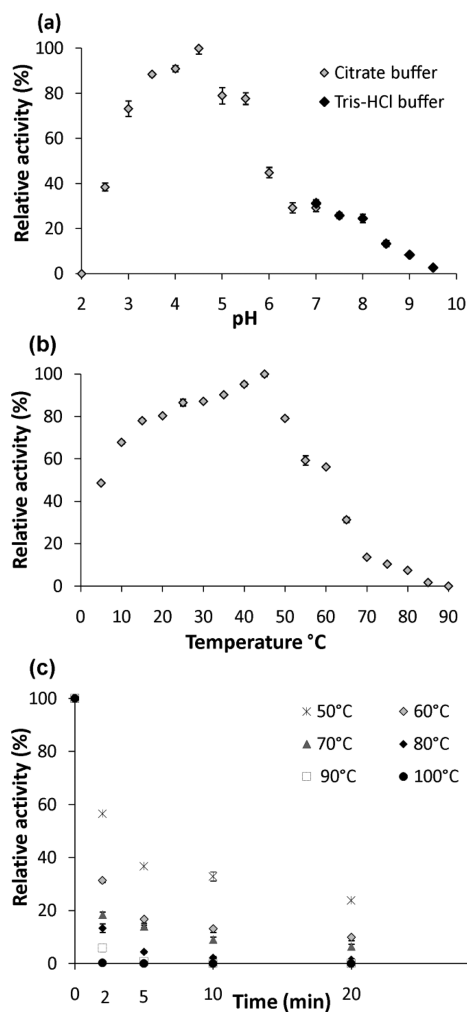


Figure 3. Effects of pH and temperature on the activity of PaPPO. (a) pH optimum of PaPPO activity, (b) optimal temperature for PaPPO activity, (c) thermal inactivation of PaPPO activity. The enzyme activity was measured using 10 mM catechol as substrate. The experiment was repeated three times, and each value is given as the mean value \pm standard deviation.

activity of PaPPO was reduced to $< 50\%$ at $\text{pH} > 6$ and no enzyme activity was detected at $\text{pH} 2$ and below. The pH-optimum reported here for PaPPO is even lower than the one found by Ünal and Şener¹⁶ and Fraignier et al.²⁴ who reported the optimum pH for PaPPO at $\text{pH} 5-5.8$ and $5-5.5$ using catechol and 4-methylcatechol as substrate, respectively. Arslan et al.²⁵ reported an optimum activity at $\text{pH} 8.5$ for PPO from Malatya apricot. Similarly low pH optima around $\text{pH} 4.5$ have been reported for PPOs from peach (cultivar Catherina) using 4-*tert*-butylcatechol as substrate.¹⁵

Table 2. Substrate Specificity of Purified PaPPO^a

substrate	concn (mM)	λ (nm)	$\epsilon(\lambda)$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	relative activity (%)
Monophenols				
phenol	10	426	4300	0.00 ± 0.0
tyramine	10	395	1500	0.00 ± 0.0^b
Diphenols				
chlorogenic acid	10	475	511	738 ± 5.4
4-methylcatechol	10	400	1720	378 ± 12
catechol	10	426	4300	100 ± 0.71
caffeic acid	1	481	591	336 ± 0.65
L-dopa	1	392	1240	5.47 ± 0.33
dopamine	10	395	1500	8.85 ± 0.80
Triphenol				
pyrogallol	10	457	926	181 ± 3.9

^aAll measurements were performed in triplicate. Data is presented as mean \pm standard deviation. ^bAfter storage A-PaPPO showed activity ($0.0724\% \pm 0.0010\%$) on 4 mM tyramine (sodium citrate buffer, $\text{pH} 4.5$; Figure S2).

Table 3. Kinetic Parameters of Purified PaPPO

substrate	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
catechol	5.3 ± 0.60	210 ± 30	40 ± 10
chlorogenic acid	2.7 ± 0.16	1400 ± 210	500 ± 80
4-methylcatechol	2.0 ± 0.26	700 ± 110	340 ± 70
pyrogallol	11 ± 1.5	590 ± 90	50 ± 10

Effect of Temperature on PaPPO Activity. The temperature effect on the PaPPO activity was studied over a range from 5 to 90 °C. The results are depicted in Figure 3b. The enzyme is active from 5 to 85 °C, showing maximum activity at 45 °C. A decrease of PaPPO activity was observed at temperatures ≥ 50 °C, and the enzyme lost 45%, 86% and 92% of its maximal activity at 60, 70, and 80 °C, respectively, until all activity was lost at 90 °C, due to thermal inactivation. Ünal and Şener¹⁶ reported a lower value for the temperature optimum of apricot (cultivar Alyanak) PPO activity (30–40 °C) using catechol as substrate. Thus, PPOs from three apricot cultivars (Kabaasi, Çataloglu and Hacıhaliloglu) showed optimal activity at 35, 40, and 45 °C respectively.²⁶ An identical temperature optimum at 45 °C has been reported for litchi pericarp PPO using (–)-epicatechin as substrate.²⁷ The optimum temperature for PPO activity generally ranged between 30 and 40 °C.^{28,29} A PPOs temperature optimum usually depends on the environmental conditions where the fruit grows, the plant species and variety as well as the substrate used in the assay.¹³

Thermal Inactivation of PaPPO. The thermal inactivation profile of purified PaPPO, presented as the residual activity after preincubation at various temperatures from 50 to 100 °C for 2 to 30 min, is shown in Figure 3c. PaPPO exhibited a

Table 4. Effect of Various Inhibitors on PaPPO Activity^a

inhibitor	relative activity (%)			
	0.1 mM	1 mM	5 mM	10 mM
4-hexylresorcinol	34 ± 1.4	11.0 ± 0.66	0.31 ± 0.05	0.0 ± 0.0
ascorbic acid	89 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
benzoic acid	95 ± 2.2	41 ± 1.2	8.3 ± 0.11	5.4 ± 0.49
citric acid	100 ± 1.5	93 ± 1.5	88 ± 2.1	80.6 ± 0.87
kojic acid	65 ± 2.2	28 ± 1.1	7.3 ± 0.47	4.1 ± 0.52
succinic acid	99 ± 1.6	94 ± 1.6	90.9 ± 0.80	89.1 ± 0.53
EDTA	99.7 ± 0.45	93.7 ± 0.59	90.3 ± 0.43	88 ± 1.5
glutathione, reduced	84.3 ± 0.67	2.5 ± 0.21	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
L-cysteine	89.3 ± 0.45	0.65 ± 0.07	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
sodium metabisulfite	72 ± 2.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

^aAll measurements were performed in triplicate. Data is presented as mean ± standard deviation.

Table 5. Effect of Metal Ions on PaPPO Activity^a

salt	relative activity (%)	
	1 mM	10 mM
MgSO ₄	102 ± 1.7	107 ± 1.8
FeSO ₄	50 ± 2.6	34 ± 1.9
ZnSO ₄	104 ± 1.8	108 ± 1.9
CuSO ₄	108 ± 1.5	134 ± 1.1
KCl	87 ± 1.4	45 ± 2.8
NaCl	94 ± 1.5	56 ± 1.2
CaCl ₂	78 ± 2.5	23 ± 1.4
MnCl ₂	85 ± 0.99	23 ± 1.3
NiCl ₂	84 ± 2.3	15 ± 1.4
AlCl ₃	80 ± 2.0	3.67 ± 0.31

^aAll measurements were performed in triplicate. Data is presented as mean ± standard deviation.

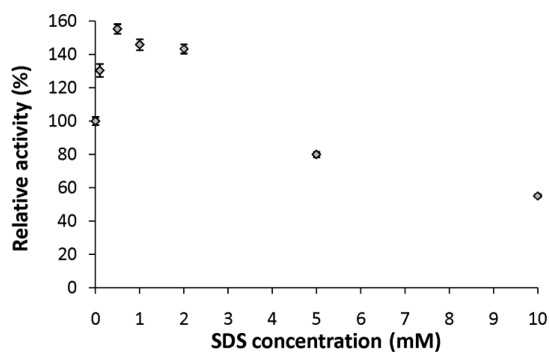


Figure 4. Effect of SDS on PaPPO activity.

reduction in catalytic activity as the temperature and duration of incubation increased.

The enzyme retained 56%, 31%, 18%, 13%, 6%, and 0% of its original activity after 2 min of incubation at 50, 60, 70, 80, 90, and 100 °C, respectively, and more than 90% of activity was lost after incubation at 70 °C for 10 min. PaPPO was completely inactivated following incubation at 80, 90, and 100 °C for 30, 10, and 5 min, respectively (Figure 3c). Our results are close to those of Yemenicioğlu and Cemeroglu,²⁶ who reported that apricot PPO (Kabaasi cultivar) lost more than 95% of its activity after 10 min of heating at temperatures ≥ 80 °C, using catechol as substrate. However, they found that the enzyme was quite stable at 70 °C. PPO from plum³⁰ showed similar thermal stabilities at 55 °C where the enzyme retained only 50% of its activity after 5 min of incubation. Also PPO

from blueberry³¹ showed similar behavior, the PPO retained only 3% of its activity after 2 min of incubation at 85 °C. By comparison with PaPPO, PPO from strawberry³² and medlar fruits³³ were relatively thermostable as the enzymes retained more than 60% of their activity after 30 min of incubation at 50 °C. On the other hand, PPO from potato³⁴ has been found to be sensitive to heat treatment; the enzyme was completely inactivated after heating at 70 °C for 10 min.

Substrate Specificity and Enzyme Kinetics. Substrate specificity for PaPPO was investigated using 9 different substrates (Table 2) at the enzyme's pH optimum for catechol as the substrate (pH 4.5). The purified enzyme (L-PaPPO) was found to be activated in the reaction media in contact with substrates without the addition of an external activator (like SDS). This activation can be attributed to the low pH optimum (4.5) of PaPPO. The latent PPO activation in the reaction media at low pH has been reported before.¹⁵ Activities were compared with the activity observed in the presence of catechol (set as 100%). The highest activity was found using chlorogenic acid, followed by 4-methylcatechol, caffeic acid, pyrogallol, and catechol.

A lower activity toward dopamine and L-dopa (diphenols) was recorded, and no activity was detected with monophenols (phenol and tyramine). The slight monophenolase activity reported for PaPPO after storage using tyramine as substrate suggests that PaPPO has a weak activity on monophenols compared to the strong activity on diphenols. Furthermore, reliable determination of monophenolase activity requires the use of a large amount of enzyme and a substantially extended monitoring time. The results obtained in this study are in agreement with those of Arslan et al.²⁵ (1998) and Yemenicioğlu and Cemeroglu²⁶ (2003), who reported that apricot PPO had no activity toward monophenols using hydroquinone and *p*-cresol as substrate at pH 6.8. PPOs lacking monophenolase activity were reported for other fruits among them mamey,³⁵ borage,³⁶ and blueberry.³¹ Chlorogenic acid and 4-methylcatechol have been found to be the best substrates for coffee³⁷ and apple PPO³⁸ and the here investigated PaPPO. Chlorogenic acid is the main phenolic compound in apricot,³⁹ which could explain the highest catalytic efficiency of PaPPO on this substrate.

K_M and k_{cat} were calculated by nonlinear regression using the four best substrates at various concentrations under optimal conditions and are shown in Table 3. Substrate specificities were evaluated by using the k_{cat}/K_M ratio (catalytic efficiency). k_{cat}/K_M followed the order of activity of PaPPO on the tested substrates: chlorogenic acid > 4-methylcatechol > pyrogallol >

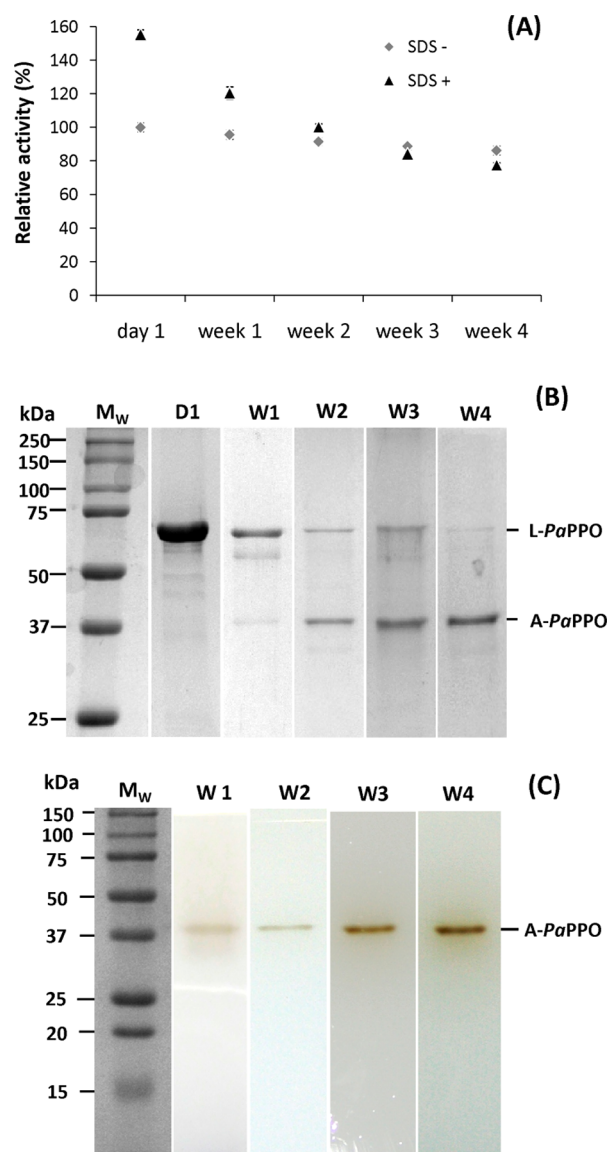


Figure 5. Effect of storage at 4 °C on *PaPPO*. (A) activity of *PaPPO* on catechol in the absence (SDS −) and presence (SDS +) of 0.5 mM SDS, (B) denaturing SDS–PAGE gels (reduced sample) of purified *PaPPO*, (C) activity gels of purified *PaPPO*. (M_w) molecular weight marker (values given in kDa), (D1) freshly purified protein, (W1) 1 week of storage, (W2) 2 weeks of storage, (W3) 3 weeks of storage, (W4) 4 weeks of storage. The enzyme was stored at 4 °C in Tris-HCl buffer (pH 8).

catechol. The lowest K_M was observed for 4-methylcatechol (2 mM), followed by chlorogenic acid (2.7 mM), catechol (5.3 mM), and pyrogallol (11 mM). The K_M values reported for PPOs from apricot are 6.6 mM (cultivar Malatyá)²⁵ and 1 mM (cultivar Moorpark)⁴⁰ using catechol and chlorogenic acid, respectively. Close K_M values were reported for mango (3.1 mM)⁴¹ using 4-methylcatechol and Yali Pear (1.5 mM)⁴² using chlorogenic acid as substrate.

Effect of Inhibitors, Metal Ions, and SDS on *PaPPO* Activity. The effects of ten various inhibitors, among them the most commonly used inhibitors of enzymatic browning, on *PaPPO* activity were investigated at four different inhibitor concentrations (0.1, 1, 5, and 10 mM). The results are presented in Table 4. At 0.1 mM, 4-hexylresorcinol was the most effective inhibitor with only 34% activity retained.

Increasing the concentration of inhibitors to ≥ 1 mM, sodium metabisulfite, ascorbic acid, and L-cysteine were the most effective inhibitors for *PaPPO* activity, followed by reduced glutathione, 4-hexylresorcinol, kojic acid, and benzoic acid. Complete inhibition was observed with sodium metabisulfite and ascorbic acid at 1 mM, with L-cysteine and glutathione at 5 mM, and with 4-hexylresorcinol at 10 mM. Citric acid, EDTA, and succinic acid were the weakest inhibitors with 81%, 87% and 89% of residual activity, respectively, even at 10 mM concentration. All of the inhibitors hinder the formation of melanin by preventing the accumulation of *o*-quinones or by forming stable colorless products.¹³ Our results are in agreement with those of Ünal and Şener¹⁶ who detected a complete inhibition of apricot PPO with 1 mM of sodium metabisulfite and ascorbic acid. Metabisulfite and ascorbic acid are reducing agents, which inhibit enzymatic browning reactions by reacting with quinones formed by PPO catalyzed oxidation of *o*-dihydroxy phenols, forming a stable, colorless product.⁷ In addition metabisulfite can act on the enzyme itself by irreversibly binding to the “met” and “oxy” forms of binuclear copper at the active site.⁷

Ascorbic acid and L-cysteine were found to provide effective inhibition of PPO in blueberry.³¹ Sodium metabisulfite was reported as the best inhibitor for PPOs from a wide variety of species, among them pears,⁴³ potato,³⁴ grape,⁴⁴ mamey,³⁵ mango,⁴¹ and blueberry.³¹ Citric acid, succinic acid, and EDTA have also been found not to be effective as inhibitors for PPO from mango, even at 10 mM concentration, with 67%, 69% and 79% retained activity, respectively.⁴¹

The effect of metal ions on *PaPPO* is shown in Table 5. The presence of most of the tested metal ions did affect the enzymatic activity negatively. Metal ions such as Al³⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, and Fe²⁺ inhibited PPO activity markedly; less than 35% of PPO activity was retained at a concentration of 10 mM. The exceptions were MgSO₄, ZnSO₄, and CuSO₄; their presence stimulated the *PaPPO* activity. Similar effects were observed in apple²⁹ where 50 mM of CuSO₄ enhanced PPO activity to 145% and 3.69 mM of AlCl₃ decreased it to 50%. Conversely PPO activity in litchi was reduced in the presence of FeSO₄ and NaCl and stimulated in the presence of MnSO₄ and CuSO₄.⁴⁵ PPO of longan fruit was found to be activated in the presence of MnSO₄ and CuSO₄.⁴⁶ The activities of PPO from mango⁴¹ and Japanese honeysuckle⁴⁷ were found to be stimulated in the presence of Mg²⁺; however in contrast to our results, they noted that the activity was decreased in the presence of CuSO₄ and increased in the presence of ZnSO₄. According to Sun et al.,⁴⁸ metal ions like Ca²⁺ can cause the repulsion of oxygen and therefore the inhibition of PPO activity. However, some metal ions can promote the binding of the substrate to the active site and enhance enzymatic activity by combining with substrate or PPO.³⁵

PPO exists in plant tissues in its active form and its latent form where full activity can only be observed by adding detergents or fatty acids or by treatment with proteases.⁴⁹ For this reason the enzymatic activity of the purified *PaPPO* was determined under normal assaying conditions using catechol as substrate with various concentrations of SDS. The PPO activity without SDS was taken as 100%. As displayed in Figure 4, SDS at lower concentrations (0.1, 0.5, 1, and 2 mM) enhanced the enzymatic activity, with the maximum activity (155%) at 0.5 mM, whereas at higher concentrations of SDS (5 and 10 mM) *PaPPO* activity diminished markedly to 80% and 55%, respectively. The activation of the enzyme with SDS suggests

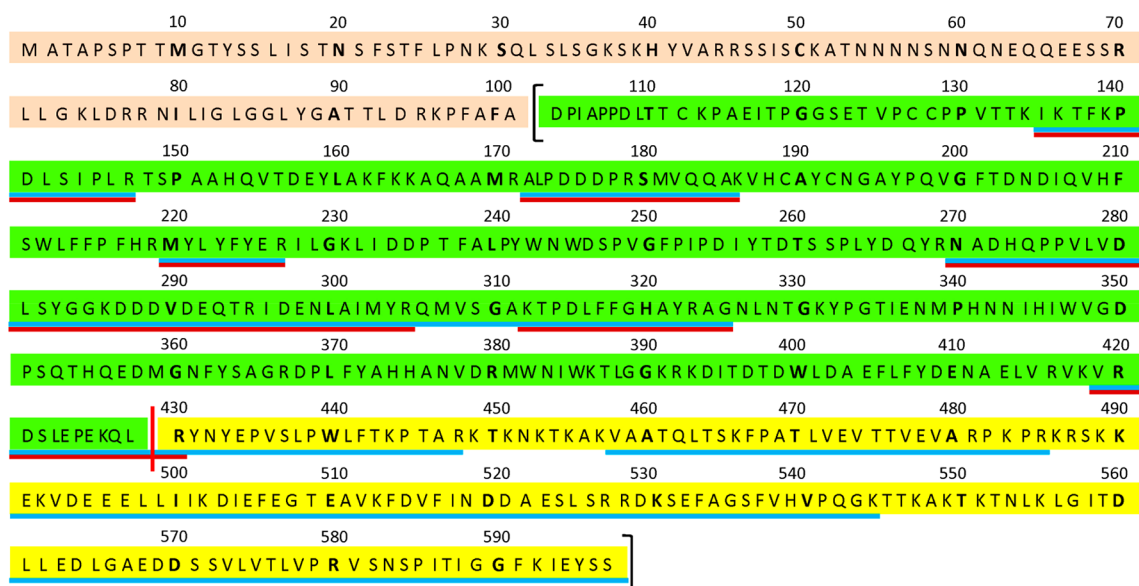


Figure 6. Sequence of PaPPO (UniProt O81103). (Peach shading: signal peptide domain. Green shading: main domain (A-PaPPO). Yellow shading: C-terminal domain. Square brackets indicate the start and the end of L-PaPPO. Pink vertical line indicates the cleavage position (the end of A-PaPPO and the start of C-terminal domain) as deduced from matching the amino acid sequence with the molecular mass determined for A-PaPPO by ESI LTQ Orbitrap Velos MS. The peptides identified by UHPLC-ESI-MS/MS for L-PaPPO and A-PaPPO are underlined in blue and crimson, respectively.

that purified PaPPO is present in its latent form. Activation of latent PPO by SDS was reported in many organisms, among them banana,⁵⁰ coffee,³⁷ peach,¹⁵ mushroom,⁵¹ and petals of *C. grandiflora*.⁵² The effect of SDS (3.5 mM) on PPO activity of five *Prunus* species (peach, almond, cherry, plum, and apricot) was investigated by Fraignier et al.²⁴ They noted that the activity of PPO in the presence of SDS was found to be 1.5 and 2 times higher than the activity without SDS in plum and cherry, respectively, and a slight increase in activity was noticed in almond and apricot. In peach, however, they found a little decrease in activity due to SDS. The increase of PPO activity in the presence of SDS might be due to the activation of latent PPO through conformational changes.⁵³ Thus, the activation of PPOs is observed at low concentrations of SDS, and higher concentrations can cause the opposite effect and decrease the enzyme activity instead of increasing it,⁵⁰ which is also what we observed for PaPPO.

Storage Stability of the Purified PaPPO. In order to determine the effect of storage at 4 °C (in 10 mM Tris-HCl buffer at pH 8) on stability of the purified PaPPO, we monitored the enzymatic activity with and without SDS over 4 weeks, where PaPPO activity without SDS at day one was taken as 100%. The results are shown in Figure 5A; PaPPO activity assayed in the presence of SDS diminished by 50% after one month of storage from 155% activity at day one to 78% activity at week 4. On the other hand just a small decrease (13%) in PaPPO activity was observed in the tests without SDS from 100% to 87% activity. Furthermore, starting from the third week, SDS switched from being an activator to acting as an inhibitor of the enzymatic activity, where we noted a decrease of 10% of activity at week 4 from 87% in the absence of SDS to 77% in the presence of SDS. Loss of PPO activity during storage at 4 °C is a common observation in studies on PPOs.²⁸ However, the peculiar behavior of PaPPO during storage noted in this study, in the presence and absence of SDS was not reported in earlier works. For that and to better understand this behavior, denaturing SDS-PAGE (reduced samples) and

partially denaturing SDS-PAGE were performed over the storage period (Figure 5B,C).

Gel Electrophoresis and Mass Determination. Reported molecular weights of PPO, range from very low masses like 25 kDa for pineapple PPO⁵⁴ to relatively high molecular masses, for example, 120 kDa for field bean PPO.⁵⁵ In our study, the purified L-PaPPO collected from cation exchange chromatography appeared as a single protein band on an SDS-PAGE gel with an apparent molecular mass of 63 kDa (Figure 2). This mass is identical to the molecular weight of the latent PPO detected in apricot and four other species of *Prunus*.²⁴ Chevalier et al.¹⁰ also reported a similar mass of 60 kDa. Our apparent mass is higher than the molecular weight of the mature protein (56.2 kDa) calculated by Chevalier et al.¹⁰ and the mass of the purified apricot PPO (57 kDa) detected by Ünal and Şener.¹⁶

Denaturing SDS-PAGE (reduced samples) stained with Coomassie brilliant blue G-250 was performed to monitor storage behavior of L-PaPPO, and the respective gels are presented in Figure 5B. The results show the formation of a new band at 38 kDa (A-PaPPO) during storage, which is apparent starting from the first week of storage and becomes thicker over the weeks, and in parallel the original band at 63 kDa (L-PaPPO) becoming thinner until it almost totally disappears after the fourth week (Figure 5B). Under partially denaturing SDS-PAGE, a single band was detected by in-gel enzymatic activity staining with catechol as substrate (Figure 5C). The band appeared at 38 kDa in the same position as the band observed when stained with Coomassie blue (A-PaPPO of Figure 5B). From these results, it is concluded that the band at 38 kDa represents the active form of apricot PaPPO, a mass that is close to the molecular weight (43 kDa) detected by activity staining previously reported by Fraignier et al.²⁴

The mass spectrum (ESI-LTQ) of the purified enzyme (after storage) is given in Figure S3 along with a zoomed-in section of this spectrum, indicating the presence of one major protein species. Twelve distinct peaks were used, and assuming that the

positive charge states are solely caused by the attachment of protons, the average molecular mass can be assessed as $37\,455.6 \pm 0.9$ Da. Those results confirm the results obtained by SDS-PAGE and indicate that the latent apricot PPO (L-*PaPPO*) was practically quantitatively converted to its active form after one month of storage at 4 °C in Tris-HCl buffer (pH 8).

PPOs are believed to be stored in latent form in plants.¹³ Latent PPO could exist in a completely latent or a partially active form,⁵⁶ as in the case of L-*PaPPO*. The C-terminal domain is thought to shield access of phenolic substrates to the active site.⁵⁷ From that, it can be concluded that following harvest *PaPPO* is present in the fruit in the latent form. Our results give a strong indication that latent *PaPPO* can also be activated spontaneously during storage at 4 °C.

Protein Identification and Sequence Confirmation. The mature protein of apricot PPO has 496 amino acids (Asp102 → Ser597) with a calculated molecular weight of 56.2 kDa.¹⁰ The mass for A-*PaPPO* (37 455.6 Da) determined by mass spectrometry (ESI-LTQ) matches perfectly to the mass of the polypeptide Asp102 → Leu429 with one thioether bridge⁵⁸ and two closed disulfide bridges containing all five cysteines present in the peptide chain (Figure 6). This is additionally supported by the results of enzymatic digestion. UHPLC-ESI-MS/MS identified the purified latent PPO (L-*PaPPO*) at 63 kDa as apricot PPO (UniProt O81103) yielding a sequence coverage of 48.87% (*PaPPO* (Asp102 → Ser597)) and a total of 36 identified peptides (Table S1), 16 peptides from the main domain and 20 peptides from the C-terminal part defining the enzyme latent form, including peptides that cover the C-terminus of the protein. The peptides are underlined in blue in Figure 6 and listed in Table S1. For A-*PaPPO*, we had a sequence coverage of 41.4% (*PaPPO* (Asp102 → Leu429)), and all the peptides that have been identified (12 peptides) are in the main domain region. No tryptic peptides were detected and identified in the C-terminal part beyond Arg430. The presence of Arg430 in the last peptide identified can provide an indication that the removal of the enzyme's C-terminal domain proceeds via more than one cleavage site, as it was also reported in recent research.⁵⁹ The identified peptides are underlined in crimson in Figure 6 and listed in Table S2. *PaPPO* (UniProt O81103) shows 96.65% and 94.14% sequence identity to PPO from Japanese apricot (*Prunus mume*; GenBank 645236994) and peach (*Prunus persica*; UniProt I1U4K7), respectively.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03210.

List of identified peptide sequences of L-*PaPPO* (Asp¹⁰² → Ser⁵⁹⁷) and of A-*PaPPO* (Asp¹⁰² → Arg⁴³⁰), Michaelis–Menten diagrams for the four tested di- and triphenols, photograph showing the tyramine test activity for *PaPPO* after storage (A-*PaPPO*), and mass spectra of A-*PaPPO* (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Fax: +43-1-4277-852502. Tel: +43-1-4277-52502. E-mail: annette.rompel@univie.ac.at.

ORCID

Annette Rompel: 0000-0002-5919-0553

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding

The research was funded by the Austrian Science Fund (FWF) P25217 and P29144.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully recognize the opportunity given by the University of Vienna for the Ph.D. student visiting program. The authors are grateful to INATAA, University Frères Mentouri Constantine 1, for financial support of a fellowship to A.D. We thank Mag. Alexander Ronacher and Anna Fabisikova, M.Sc., for the support during the ESI-LTQ-MS experiments.

■ ABBREVIATIONS

PaPPO, polyphenol oxidase from *Prunus armeniaca*; SDS, sodium lauryl sulfate; FPLC, fast protein liquid chromatography; AEX, anion exchange; CEX, cation exchange

■ REFERENCES

- (1) Garcia-Viguera, C.; Bridle, P.; Ferreres, F.; Tomas-Barberan, F. A. Influence of variety, maturity and processing on phenolic compounds of apricot juices and jams. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1994**, *199*, 433–436.
- (2) Siddiq, M. Apricots. In *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, 1st ed.; Hui, Y. H., Ed.; Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, 2006; pp 279–290.
- (3) Whitaker, J. R.; Lee, C. Y. Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning. In *Enzymatic Browning and Its Prevention*, Lee, C. Y., Whitaker, J. R., Eds.; ACS Symposium Series 600, American Chemical Society: Washington, DC, 1995; pp 2–7.
- (4) Jiménez, A. M.; Martínez-Tomé, M.; Egea, I.; Romojaro, F.; Murcia, M. A. Effect of industrial processing and storage on antioxidant activity of apricot (*Prunus armeniaca* v. *bulida*). *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 125–134.
- (5) McEvily, J.; Iyengar, R.; Otwell, W. S. Inhibition of Enzymatic Browning in Foods and Beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *32*, 253–273.
- (6) Pretzler, M.; Rompel, A. What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective. *Inorg. Chim. Acta* **2017**, DOI: 10.1016/j.ica.2017.04.041.
- (7) Molitor, C.; Mauracher, S. G.; Rompel, A. Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E1806–E1815.
- (8) Mayer, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2318–2331.
- (9) Tran, L. T.; Taylor, J. S.; Constabel, C. P. The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics* **2012**, *13*, 395.
- (10) Chevalier, T.; de Rigal, D.; Mbeguie-A-Mbeguie, D.; Gauillard, F.; Richard Forget, F. C.; Fils-Lycaon, B. R. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 1261–1270.
- (11) Mauracher, S. G.; Molitor, C.; Al-Oweini, R.; Kortz, U.; Rompel, A. Latent and active abPPO4 mushroom tyrosinase cocrystallized with hexatungstotellurate(VI) in a single crystal. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2014**, *70*, 2301–2315.
- (12) Pretzler, M.; Bijelic, A.; Rompel, A. Heterologous expression and characterization of functional mushroom tyrosinase (AbPPO4). *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1810.

- (13) Yoruk, R.; Marshall, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Biochem.* **2003**, *27*, 361–422.
- (14) Solomon, E. I.; Heppner, D. E.; Johnston, E. M.; Ginsbach, J. W.; Cirera, J.; Qayyum, M.; Kieber-Emmons, M. T.; Kjaergaard, C. H.; Hadt, R. G.; Tian, L. Copper active sites in biology. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3659–3853.
- (15) Cabanes, J.; Escribano, J.; Gandia-Herrero, F.; Garcia-Carmona, F.; Jimenez-Atienzar, M. Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina), molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane-bound forms. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10446–10451.
- (16) Ünal, M. Ü.; Şener, A. Two-year comparison of the biochemical properties of polyphenol oxidase from Turkish Alyanak apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chem.* **2016**, *190*, 741–747.
- (17) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (18) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- (19) Muñoz, J.; García-Molina, F.; Varón, R.; Rodríguez-Lopez, J.; García-Cánovas, F.; Tudela, J. Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity. *Anal. Biochem.* **2006**, *351*, 128–138.
- (20) Coseteng, M. Y.; Lee, C. Y. Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 985–989.
- (21) Galeazzi, M. A. M.; Sgarbieri, V. C.; Constantinides, S. M. Isolation and purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cauendishii*). *J. Food Sci.* **1981**, *46*, 150–155.
- (22) Golan-Goldhirsh, A.; Whitaker, J. R. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 1003–1009.
- (23) Flurkey, W. H.; Jen, J. J. Purification of peach polyphenol oxidase in the presence of added protease inhibitors. *J. Food Biochem.* **1980**, *4*, 29–41.
- (24) Fraignier, M.; Marques, L.; Fleuriot, A.; Macheix, J. Biochemical and immunochemical characterisation of polyphenol oxidase from different prunus fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2375–2380.
- (25) Arslan, O.; Temur, A.; Tozlu, I. Polyphenol oxidase from Malatya apricot. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1239–1241.
- (26) Yemencioğlu, A.; Cemeröglü, B. 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.* **2003**, *51*, 2371–2379.
- (27) Liu, L.; Cao, S.; Xie, B.; Sun, Z.; Li, X.; Miao, W. Characterization of polyphenol oxidase from litchi pericarp using (–)-epicatechin as substrate. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7140–7143.
- (28) Nagai, T.; Suzuki, N. Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa* L. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3922–3926.
- (29) Aydin, B.; Gulcin, I.; Alwasel, S. H. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Hemşin Apple (*Malus communis* L.). *Int. J. Food Prop.* **2015**, *18*, 2735–2745.
- (30) Siddiq, M.; Sinha, N. K.; Cash, J. N.; Hanum, T. Partial purification of polyphenol oxidase from plums (*Prunus dornesfica* L., cv. Stanley). *J. Food Biochem.* **1996**, *20*, 111–123.
- (31) Siddiq, M.; Dolan, K. D. Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chem.* **2017**, *218*, 216–220.
- (32) Serradell, M. A.; Rozenfeld, P. A.; Martinez, G. A.; Civello, P. M.; Chaves, A. R.; Añón, M. C. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): characterization and partial purification. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1421–1427.
- (33) Dincer, B.; Colak, A.; Aydin, N.; Kadioglu, A.; Guner, S. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). *Food Chem.* **2002**, *77*, 1–7.
- (34) Duangmal, K.; Owusu Apenten, R. K. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chem.* **1999**, *64*, 351–359.
- (35) Palma-Orozco, G.; Ortiz-Moreno, A.; Dorantes-Alvarez, L.; Sampedro, J. G.; Najera, H. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). *Phytochemistry* **2011**, *72*, 82–88.
- (36) Alici, E. H.; Arabaci, G. Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis* L.) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 1051–1056.
- (37) Mazzafera, P.; Robinson, S. P. Characterisation of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 285–296.
- (38) Marrufo-Hernández, N. A.; Palma-Orozco, G.; Beltrán, H. I.; Nájera, H. Purification, partial biochemical characterization and inactivation of polyphenol oxidase from Mexican Golden Delicious apple (*Malus domestica*). *J. Food Biochem.* **2017**, *41*, e12356.
- (39) Dragovic-Uzelac, V.; Levaj, B.; Mrkic, V.; Bursac, D.; Boras, M. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chem.* **2007**, *102*, 966–975.
- (40) Dijkstra, L.; Walker, J. R. L. Enzymic Browning in Apricots. *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *54*, 229–234.
- (41) Palma-Orozco, G.; Marrufo-Hernández, N. A.; Sampedro, J. G.; Nájera, H. Purification and Partial Biochemical Characterization of Polyphenol Oxidase from Mango (*Mangifera indica* cv. Manila). *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9832–9840.
- (42) Zhou, H. W.; Feng, X. Polyphenol Oxidase from Yali Pear (*Pyrus bretschneideri*). *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *57*, 307–313.
- (43) Siddiq, M.; Cash, J. N.; Sinha, N. K.; Akhter, P. Characterization and inhibition of PPO from pears (*Pyrus communis* L. cv Bose and Red). *J. Food Biochem.* **1994**, *17*, 327–337.
- (44) Ünal, M. Ü.; Şener, A. Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 2374–2379.
- (45) Yue-Ming, J.; Zauberman, G.; Fuchs, Y. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biol. Biotechnol.* **1997**, *10*, 221–228.
- (46) Jiang, Y. M. Purification and some properties of longan fruit. *Food Chem.* **1999**, *66*, 75–79.
- (47) Liu, N. N.; Liu, W.; Wang, D. J.; Zhou, Y. B.; Lin, X. J.; Wang, X.; Li, S. B. Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Food Chem.* **2013**, *138*, 478–483.
- (48) Sun, H. J.; Wang, J.; Tao, X. M.; Shi, J.; Huang, M. Y.; Chen, Z. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Rape Flower. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 823–829.
- (49) Mayer, A. M. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 11–20.
- (50) Sojo, M. M.; Núñez-Delgado, E.; García-Carmona, F.; Sánchez-Ferrer, A. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4924–4930.
- (51) Mauracher, S. G.; Molitor, C.; Michael, C.; Kragl, M.; Rizzi, A.; Rompel, A. High level protein-purification allows the unambiguous polypeptide determination of latent isoform PPO4 of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry* **2014**, *99*, 14–25.
- (52) Molitor, C.; Mauracher, S. G.; Pargan, S.; Mayer, R. L.; Halbwirth, H.; Rompel, A. Latent and active aurone synthase from petals of *C. grandiflora*: a polyphenol oxidase with unique characteristics. *Planta* **2015**, *242*, 519–537.
- (53) Moore, B. M.; Flurkey, W. H. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4982–4988.
- (54) Das, J. R.; Bhat, S. G.; Gowda, L. R. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the kew cultivar of Indian pineapple fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2031–2035.

(55) Paul, B.; Gowda, L. R. Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seeds of Field Bean (*Dolichos lablab*). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3839–3846.

(56) Raffert, G.; Flurkey, W. H. Carbohydrate associated with broad bean polyphenol oxidase is resistant to enzymatic and chemical deglycosylation. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1355–1360.

(57) Marusek, C. M.; Trobaugh, N. M.; Flurkey, W. H.; Inlow, J. K. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 108–123.

(58) Lerch, K. 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.* **1982**, *257*, 6414–6419.

(59) Zekiri, F.; Molitor, C.; Mauracher, S. G.; Michael, C.; Mayer, R. L.; Gerner, C.; Rompel, A. Purification and characterization of tyrosinase from walnut leaves (*Juglans regia*). *Phytochemistry* **2014**, *101*, 5–15.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry: X

journal homepage: www.journals.elsevier.com/food-chemistry-x

Inhibition of apricot polyphenol oxidase by combinations of plant proteases and ascorbic acid

Ala eddine Derardja^{a,b}, Matthias Pretzler^a, Ioannis Kampatsikas^a, Malika Barkat^b, Annette Rompel^{a,*}

^a Universität Wien, Fakultät für Chemie, Institut für Biophysikalische Chemie, Althanstraße 14, 1090 Wien, Austria¹

^b Laboratoire Bioqual, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Enzymatic browning
Polyphenol oxidase
Apricot
Plant proteases
Ascorbic acid

ABSTRACT

The present research investigates the long term inhibition of enzymatic browning by inactivating the polyphenol oxidase (PPO) of apricot, using combinations of plant proteases and ascorbic acid (AA). The selected proteases were able to inactivate PPO at pH 4.5, with the degree of inactivation proportional to incubation time and protease concentration. Papain was the most effective protease, with 50 µg completely inactivating PPO in less than one hour. AA prevented browning reactions that occur before or during PPO inactivation by protease. The combinations of AA/proteases were highly effective *in vitro*, where 2 mM AA/500 µg proteases inhibited PPO activity completely over 24 h. The combination of AA/proteases was also effective *in vivo*, as treated apricot purees preserved their color ($p < 0.0001$, compared to untreated samples after 10 days of storage). The results demonstrate that AA/proteases combinations constitute a promising practical anti-browning method with feasible application in the food industry.

1. Introduction

Apricot (*Prunus armeniaca* L.) is a globally consumed fruit. Apricot is mainly appreciated for its specific color and flavor (Melgarejo et al., 2014). However, apricot as a climacteric fruit undergoes fast post-harvest maturation (Supplementary A), making it highly perishable and sensitive to handling. Physical stress such as bruising, compressing, and cutting can disorder the pericarp cells, triggering undesirable enzymatic browning. Browning reactions affect the appearance, flavor, and nutritive value of apricot and many other fruits (apple, pear, banana, peach, etc.), which limits their shelf life. Furthermore, this phenomenon is among the biggest problems in fruit conservation and processing. It has been reported that enzymatic browning is responsible for more than 50% of fruit industry losses (Whitaker & Lee, 1995). Browning reactions in fruits are mainly triggered by polyphenol oxidases (PPOs). These enzymes oxidize phenolic compounds to mainly colorless compounds known as quinones. However, once this reaction has taken place, the reactive quinones can polymerize spontaneously and produce melanins (brown pigments) which results in browning (Vomas-Vigyazo, 1981; Whitaker & Lee, 1995).

PPOs are copper-containing enzymes belonging to the group of oxidoreductases. They oxidize monophenols and diphenols in the presence of molecular oxygen (Whitaker & Lee, 1995). PPOs are widely distributed in nature and can be found in the majority of plants, animals and microorganisms (Mayer, 2006). However, PPO properties vary widely between species. Plant PPOs are generally expressed in a latent (enzymatically inactive) form, which contains a catalytically active domain shielded by a C-terminal domain. The latent form can be activated by limited proteolysis, acidic pH, fatty acids, or detergents (Mayer, 2006). Recently, it has been reported that the latent form can spontaneously activate during the first weeks of storage, generating an active form with a molecular weight of 38 kDa (Derardja, Pretzler, Kampatsikas, Barkat, & Rompel, 2017; Kampatsikas, Bijelic, Pretzler, & Rompel, 2019). Apricot polyphenol oxidase had been studied during the last years; the enzyme was purified in its latent form (63 kDa), exhibiting a weak monophenolase activity and a strong diphenolase activity at the optimum conditions of pH 4.5 and 30 °C (Derardja et al., 2017).

Due to their direct connection to enzymatic browning, PPOs have been the subject of extensive research carried out in the last few

Abbreviations: AA, ascorbic acid; CI, (time of) complete inhibition; PPO, polyphenol oxidase; P, protease preparation; p , probability; SE, standard error

* Corresponding author at: Universität Wien, Fakultät für Chemie, Institut für Biophysikalische Chemie, Althanstraße 14, 1090 Wien, Austria.

E-mail address: annette.rompel@univie.ac.at (A. Rompel).

¹ <https://www.bpc.univie.ac.at>.

<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100053>

Received 14 May 2019; Received in revised form 6 September 2019; Accepted 9 September 2019

Available online 11 September 2019

2590-1575/ © 2019 Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

decades by food scientists and technologists. The research mainly aims to control enzymatic browning by inhibiting PPO (McEvily, Iyengar, & Otwell, 1992). Enzymatic browning can be prevented by the inactivation of the enzyme, exclusion or removal of the substrates (O_2 and phenols), moving the conditions away from the optimum for the enzyme by lowering or increasing the pH and temperature, and by adding compounds that inhibit PPO or prevent melanin formation (Whitaker & Lee, 1995). Up to date, most of the methods that have been developed focused mainly on the last approach, and hundreds of compounds have been tested as enzymatic browning inhibitors (McEvily et al., 1992; Mesquita & Queiroz, 2013). Several chemicals proved their efficiency in controlling enzymatic browning, especially reducing compounds like ascorbic acid (AA) and sulphites (Vomas-Vigyazo, 1981; McEvily et al., 1992). These two compounds are the most used browning inhibitors in the food industry. However, they are necessarily consumed during the process of inhibition and thus, provide only temporary protection against browning (Vámos-Vigyázó, 1981). Furthermore, the use of sulphites and their derivatives is restricted nowadays, due to their negative effect on consumer health (Whitaker & Lee, 1995; FDA, 2000). This prompted a refocusing of the research on enzymatic browning inhibition, towards more healthy and safe anti-browning agents like ascorbic acid. AA (vitamin C) is considered one of the major compounds used in the food industry, owing to its conservatory effects mainly as the most effective and least toxic antioxidant. AA is an essential nutrient for humans, as we cannot synthesize vitamin C and must acquire it from our diet. However, AA is rapidly oxidized and significant losses are observed during food storage (Mellidou, Koukounaras, Chatzopoulou, Kostas, & Kanellis, 2017).

The approach of preventing enzymatic browning by inactivating PPOs had received less attention. Heat inactivation is the most common method used to inactivate PPOs in the food industry (Marshall, Kim, & Wei, 2000). Most PPOs can be inactivated by subjecting the fruits to heat treatments (85–100 °C for 1 to 10 min). However, heat treatments have been found to significantly affect the nutritional and sensorial qualities of the fruit by reducing the content or the bioavailability of some bioactive compounds (phenolic compounds, carotenoids and vitamins) and inducing several chemical and physical changes that impair the flavor, the taste and the firmness of the fruit (Rawson et al., 2011).

In the last decades, interest in plant proteases has increased rapidly. Proteases are the commercially most important enzymes due to their multiple applications in the food, pharmaceutical and detergent industries. Protease preparations from plant have great potential in the food industry; they are used in many applications such as cheese-making, meat softening, brewing and in the beverage industries. They can also be used to improve the nutritional characteristics by retarding deterioration, preventing undesired interactions, modifying functional properties such as solubility, foaming, coagulation, and emulsifying capacities (González-Rábade, Badillo-Corona, Aranda-Barradas, & Oliver-Salvador, 2011). The majority of plant-derived proteases have been classified as cysteine proteases, and the most widely utilized plant proteases are papain, bromelain, and ficin, extracted from *Carica papaya*, *Ananas comosus* and *Ficus carica*, respectively (González-Rábade et al., 2011). Recently, calotropain, a cysteine protease extracted from *Calotropis procera*, has also drawn attention due to its high proteolytic activity (Anusha, Singh, & Bindhu, 2014). These proteolytic enzymes are very attractive since they can be active over a wide range of temperature and pH (González-Rábade et al., 2011).

In theory, PPOs can also be inactivated by digestion if subjected to strong proteolytic enzymes. Thereby, the degradation of PPOs by proteases will induce their inactivation. Ficin, papain, and bromelain have been reported to be effective in controlling enzymatic browning (McEvily et al., 1992; Lozano-De-Gonzalez, Barrett, Wrolstad, & Durst, 1993). In addition, several proteases (ficin, actinidin, papain, and bromelain) were tested on apple slices by Labuza, Lillemo, and Taoukis (1992), and the proteases proved their effectiveness as enzymatic browning inhibitors. Albeit, Lozano-De-Gonzalez et al. (1993) tested

the effect of multiple fractions of pineapple juice as browning inhibitors on apple slices. They reported a low enzymatic browning inhibition with the protein fractions compared to the non-protein fractions (that contain low molecular compounds) of the juice. However, in those studies, most of the protease preparations were applied without taking into consideration that PPO inactivation with proteases is a time-consuming reaction, and that PPO may still be active during most of the digestion process. Thus, proteolytic digestion needs a certain incubation time to inactivate PPOs. The necessary incubation time depends on the ratio of proteolytic activity which is determined by the protease (group, concentration, specificity, etc) and substrate (PPOs) loading as well as on the reaction conditions (pH, temperature) (González-Rábade et al., 2011).

In this context, the main goal of this research is to evaluate the potential of some plant protease preparations as inhibitors of enzymatic browning by studying their ability to inactivate PPO, the main enzyme responsible for enzymatic browning of apricots. In addition, we were also studying the possibility of a combination between protease preparations and AA, where AA is mainly used to inhibit PPO during the time needed by the proteases to completely inactivate PPO.

2. Materials and methods

2.1. Raw materials

Fruits of *Prunus armeniaca* L. cv. Bulida, were harvested from a local farm in the M'sila region of Algeria at commercial maturity in June 2017. The fruits were rinsed with tap water, deseeded, frozen in liquid nitrogen, immediately broken into small pieces with mortar and pestle, lyophilized, and stored at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Moreover, latex of *Calotropis procera* from Adrar, Algeria, and latex of *Ficus carica* from Bordj Bou Arreridj, Algeria, were collected during March and July 2017, respectively, put in clean tubes and stored at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lyophilized powders of papain from the latex of *Carica papaya* and bromelain from the stem of *Ananas comosus* were purchased from Roth (Vienna, Austria).

2.2. Extraction and purification of PPO

Apricot PPO was extracted and purified (Fig. 1A) as described previously (Derardja et al., 2017). Lyophilized apricots (100 g) were extracted several times with cold acetone until a white powder was obtained. The resulting acetone powder was homogenized in 1 L of sodium phosphate buffer (0.1 M) at pH 6.8 containing 30 mM sodium ascorbate, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 0.5% (v/v) Triton X-100 and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The homogenate was stirred, and then centrifuged at $30,000\times g$ for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatant was subjected to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation (85% saturation). The precipitate was dissolved in 250 ml of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) and dialyzed overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ against Tris-HCl buffer (10 mM, pH 8.0). The dialyzed solution was applied to an ÄKTA fast protein liquid chromatography system (FPLC). The protein solution was purified over an anion exchange column (Q-Sepharose FF, 20 ml) followed by a cation exchange step (Mono S HR 5/50 GL). The active fractions (pure PPO) were pooled, washed with 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 and concentrated by ultrafiltration to be used in further experiments.

2.3. Proteases extraction

The extraction of proteases from the latex of *Calotropis procera* and *Ficus carica* was done according to the method of Nath and Dutta (1991) with slight modifications. To one volume of latex, two volumes of distilled water were added and the mixture was kept overnight in a deep-freezer at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The floating gum was removed, and the latex solution was centrifuged at $10,000\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The

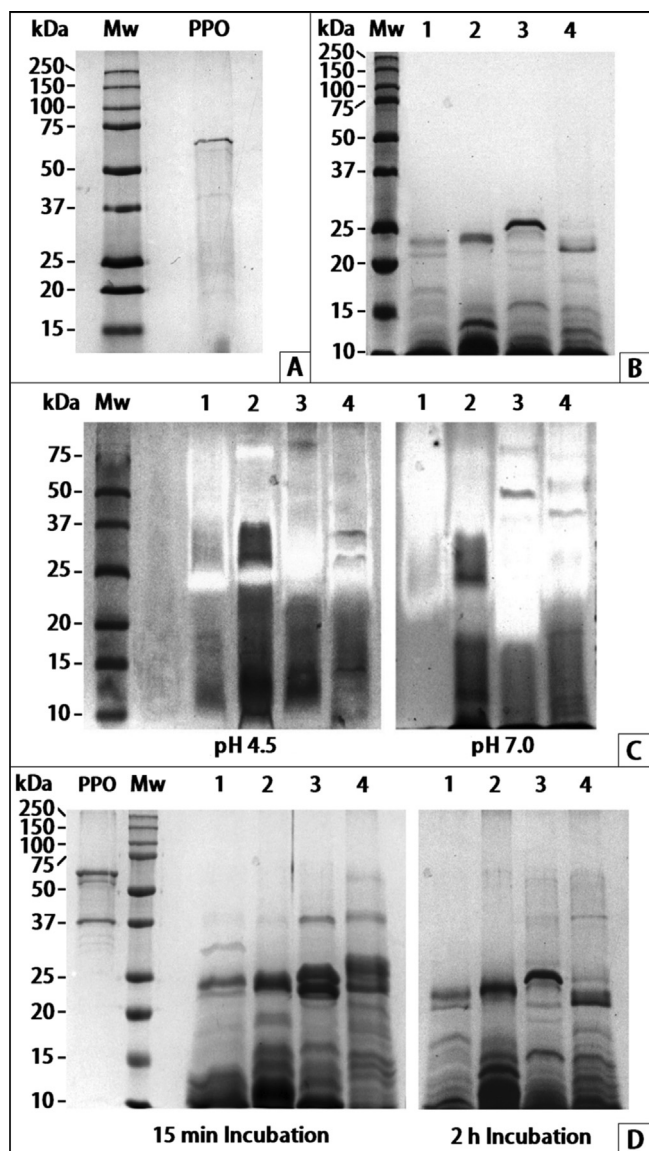


Fig. 1. Electrophoresis analysis. (A) SDS-PAGE of PPO purified from apricot: Mw, molecular weight markers; PPO, purified apricot polyphenol oxidase. (B) SDS-PAGE of protease preparations: Mw, molecular weight markers; lane 1, papain; lane 2, calotropain; lane 3, ficin; lane 4, bromelain. (C) Zymograms of protease preparations at pH 4.5 and 7.0: Mw, molecular weight markers; lane 1, papain; lane 2, calotropain; lane 3, ficin; lane 4, bromelain. (D) SDS-PAGE of PPO proteolysis by protease preparations after 15 min and 2 h of incubation at pH 4.5: PPO, purified apricot polyphenol oxidase; Mw, molecular weight markers; lane 1, papain + PPO; lane 2, calotropain + PPO; lane 3, ficin + PPO; lane 4, bromelain + PPO.

supernatant was filtered through a Whatman paper No. 1, and was then freeze dried. The lyophilized powder was used as the starting material for the further experiments ("protease preparation").

2.4. Enzyme activity and protein concentration

PPO activity was determined at 25 °C in 200 μ l of assay mixture by measuring the increase in absorbance at 410 nm using a microplate reader (Infinite M200, Tecan). The standard reaction mixture consisted of 1 μ g of enzyme and 10 mM catechol in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.5). PPO activity (catecholase activity) was determined from the slope of the initial linear part of the experimental curves (absorbance vs. time) and expressed as U/ml. One unit of enzymatic activity (U) was

defined as the amount of enzyme that catalyzed the formation of 1 μ mol of quinones per minute (1 U = 1 μ mol/min). The protein concentration measurement was carried out according to the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.5. Gel electrophoresis

Denaturing SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970) in a mini gel apparatus (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad). PPO (5 μ g) and protease preparations (20 μ g) were denatured and applied under reducing conditions in 10–15% linear polyacrylamide gradient gels. Gels were stained overnight with Coomassie Brilliant Blue G-250, and the molecular weight was estimated by comparison to molecular weight markers (Precision Plus Protein Standard Dual Color, Bio-Rad).

2.6. Proteases zymography

The development of activity zones (zymography) of the protease preparations was done according to García-Carreño, Dimes, and Haard (1993). The SDS-PAGE was performed as described above with the two sole modifications of omitting the β -mercaptoethanol in the loading buffer and the samples were not heated before loading onto the gels. 20 μ g of protease preparations were applied to the gels. After electrophoresis, gels were soaked in a 2.5% Triton X-100 solution for 30 min at 4 °C to remove SDS. Then the gels were immersed in 50 ml of 2% casein in 50 mM citrate buffer, pH 4.5 or 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 for 30 min at 4 °C, in order to allow the substrate to diffuse into the gel, while maintaining low enzymatic activity. Then the temperature was raised to 25 °C and the gels were incubated for 90 min to allow for the digestion of the protein substrate. After the incubation, gels were washed with distilled water, fixed and stained overnight with Coomassie Brilliant Blue G-250.

2.7. PPO proteolysis

PPO hydrolysis with proteases was monitored by SDS-PAGE. 5 μ g of PPO was added to 20 μ g of protease preparation in 50 mM of sodium citrate buffer pH 4.5. The mixture was incubated for two different time periods (15 min and 2 h). Then the reducing buffer was added and the mixture was heated and loaded on the gel. A control assay without protease preparations consisting of 5 μ g of PPO in 50 mM of sodium citrate buffer pH 4.5 was also loaded. SDS-PAGE was carried out as described above.

2.8. Inhibition with ascorbic acid (AA)

The effect of AA on PPO activity was studied with various concentrations (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 and 10 mM) of AA, and PPO activity was determined in activity Units (catecholase activity) as described above. In case of complete PPO inhibition by AA the reaction was monitored for 24 h, unless PPO activity was recovered earlier. Enzymatic activity is presented in the form of percent residual activity relative to the PPO activity of the control mixture without AA (100%).

2.9. Inhibition with proteases

To study the effect of the selected protease preparations (papain, calotropain, ficin, and bromelain) on PPO activity, PPO (1 μ g) was incubated in 50 mM sodium citrate buffer pH 4.5 with different amounts of protease preparations (50, 100, 200 and 500 μ g). In order to assess the effect of the proteases on PPO at pH 7.0 (optimum pH generally reported for the selected proteases), 1 μ g of PPO was incubated with 100 μ g of protease preparations in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The different mixtures were incubated for different incubation times (0, 2, 5, 10, 20, 30 min, 1, 2, 4, 8, 16 and 24 h), before adding the substrate

(catechol) and measuring PPO activity as described above. The enzymatic activity of the control mixture at pH 4.5 without proteases was defined as 100%.

2.10. Combined treatments with AA and proteases (AA/P)

According to the results of PPO inhibition with AA, the concentrations (0.1, 0.5, 1 and 2 mM) of AA, which did not give a complete inhibition (CI) of PPO over 24 h were selected for combination with proteases. The combinations of AA and proteases (AA/P) were mixed with 1 µg of PPO (16 pmol), and the enzymatic activity was determined as described earlier at pH 4.5. The reaction was monitored over 24 h to check for a recovery of PPO activity. The enzymatic activity of the control mixture at pH 4.5 without inhibitors was defined as 100%.

2.11. Application on apricot puree and color measurement

The effect of treatment with AA/P combinations on apricot puree was studied using 100 and 500 mg of AA and 10, 50 and 100 mg of protease preparations per 100 g of fresh apricots. The AA/P combinations were chosen based on the results of PPO inhibition *in vitro*, where the amount of PPO present in fresh apricots was estimated from the results of the apricot PPO purification (Derardja et al., 2017). The AA/P combinations were prepared in 1 ml of distilled water. The pH and the total soluble solid (TSS) content of the puree samples were 4.38 ± 0.33 and 14.1 ± 0.3 °Brix, respectively.

Apricots were cleaned and deseeded. Then, 100 g were introduced into a Hand Blender Beaker with 1 ml of the freshly prepared AA/P solution. The mixture was blended for 2 min. A control puree was prepared without inhibitors. In addition, to allow for a better comparison, apricot puree was also treated only with AA (50, 100, 500 and 1000 mg), without added protease. After homogenization, apricot purees were packaged in 250 ml plastic boxes made of polypropylene. The boxes were stored at 4 °C in darkness until analysis, for up to 10 days. Apricot puree color was measured immediately after homogenization to determine the initial color (0 min). Afterwards, the color of the apricot puree was determined after 5, 10, 30 min; 1, 2, 4, 8, 16 h; 1, 2, 5 and 10 days. The surface color of treated and untreated purees was measured by a computer vision system (CVS) and expressed as CIELAB Tristimulus coordinates L^* , a^* , b^* .

The computer vision system consisted of a standardized lighting system (photo shooting box) with three LED spotlights (6500 K daylight, 6 W), a Canon EOS-1200D digital camera (18 megapixel resolution and 3x 18–55 mm f/3.5–5.6 Zoom Lens), and a computer with Adobe Photoshop CS6 software (Adobe Systems Inc., USA).

For each assay, 3 g of apricot puree were smeared on a labeled transparent plastic square (70 × 70 × 0.2 mm) and then placed inside the photo shooting box on a white background. All photos were taken in manual mode (1/80, F5.6, ISO400). The measuring procedures of the color were as described by Zhou, Ling, Zheng, Zhang, and Wang (2015). The color values: lightness (L), redness-greenness (a) and yellowness-blueness (b) were obtained from the histogram of the menu bar by using LAB color mode in Adobe Photoshop. The rectangular marquee tool in the main menu was used to select the sample area. Then the L , a , b values of the selected area were transformed to CIELAB (L^* , a^* , b^*) values using the equations (Supplementary B):

$$L^* = \frac{L}{2.5}$$

$$a^* = \frac{240a}{255} - 120$$

$$b^* = \frac{240b}{255} - 120$$

The total color difference, ΔE was calculated according to the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

L^* , a^* , and b^* are the color values of the samples, while L_0^* , a_0^* , and b_0^* are the color values of the puree which exhibited minimal browning (puree treated with 1000 mg AA at 0 min).

2.12. Statistical analysis

Each experiment was repeated three times and the data was subjected to an analysis of variance (ANOVA). Significant difference was determined by Tukey's multiple range test ($p \leq 0.05$) using XLSTAT software Version 2009. The data values were expressed as mean \pm standard error (SE) ($n = 3$).

3. Results and discussion

3.1. Gel Electrophoresis, zymography and PPO proteolysis

PPO used in this study was purified in its latent form exhibiting a single band on SDS-PAGE (Fig. 1A). The enzyme had the same characteristics as reported in our previous research (Derardja et al., 2017); pH optimum of 4.5, activation during storage, a molecular weight of 63 kDa for the latent form of PPO and 38 kDa for the active form of PPO.

SDS-PAGE analysis of the protease preparations is shown in Fig. 1B. All extracts showed clear protein bands with molecular weights between 23 and 27 kDa. The molecular weights of the main bands observed on the gel are 23.7, 24.5, 26.5 and 23 kDa for papain, calotropain, ficin and bromelain, respectively. These molecular masses are consistent with the values reported for papain (23 kDa) (Mathew & Juang, 2005), calotropain (25–26 kDa) (Ramos et al., 2013), ficin (27 kDa) (Baeyens-Volant, Matagne, El Mahyaoui, Wattiez, & Azarkan, 2015) and bromelain (24 kDa) (Matagne, Bolle, El Mahyaoui, Baeyens-Volant, & Azarkan, 2017), and fall within the general range of molecular weights reported for cysteine proteases (21–30 kDa) (Grzonka, Kasprzykowski, & Wiczak, 2007).

The verification of the proteolytic activity of the protease preparations at pH 4.5 and 7.0 using the SDS-substrate gel (zymogram) is shown in Fig. 1C. The staining was performed at pH 4.5 and 7.0 in order to assess the proteolytic activity of the selected proteases at the optimum pH of PPO and proteases, respectively. Clear zones on dark background indicate protease activity. The undigested casein during staining is responsible for the slight darkening of the background (García-Carreño et al., 1993). The zymogram at pH 4.5 showed proteolytic activities in several zones, where all protease lanes contained more than one protein capable of producing a clearing zone. However, the main activity zones had molecular weights ranging from 22 to 27 kDa, which is in accordance to the bands observed on denaturing SDS-PAGE. The clear activity zones expended for the zymogram stained at pH 7.0 and they were more intense for most bands, which made a precise positioning of the bands difficult. This can be explained by the increase of proteolytic activity under these conditions at neutral pH, where papain (Homaei, Sajedi, Sariri, Seyfzadeh, & Stevanato, 2010), calotropain (Freitas et al., 2007), ficin (Devaraj, Kumar, & Prakash, 2008), and bromelain (Harrach et al., 1998) are optimally active. This is also consistent with the observation of casein agglomeration at pH 4.5 (Post, Arnold, Weiss, & Hinrichs, 2012), which may affect their hydrolysis by the protease preparations.

According to these results, we confirmed the presence of active proteases in our extracts. The proteolytic activity was higher at pH 7.0 for most proteases. However, all proteases still exhibit pronounced proteolytic activity at pH 4.5, allowing their use on PPO at acidic pH. Papain (Homaei et al., 2010), ficin (Devaraj et al., 2008), calotropain (Freitas et al., 2007; Anusha et al., 2014), and bromelain (Harrach et al., 1998) had been found to conserve activity at low pH, and they have been successfully used in many applications as e.g. in milk clotting

and meat tenderization (Grzonka et al., 2007).

In order to study PPO proteolysis capability of the protease preparations, 5 μg of PPO were subjected to hydrolysis by protease preparations for 15 min and 2 h followed by display on SDS-PAGE (Fig. 1D). As we reported in our previous work, PPO can be activated during storage, generating an active form with a molecular weight of 38 kDa (Derardja et al., 2017). This can explain the appearance of the active form in the control lane (Fig. 1D), where part of the purified latent PPO was converted to active PPO (PPO proteolysis was performed one week after PPO purification). All four protease preparations were able to hydrolyze PPO, but with different efficiencies. After 15 min of incubation, papain and calotropain preparations were able to hydrolyze PPO almost completely. Latent PPO was completely hydrolyzed, and only hardly visible slight bands of active PPO are left. However, with ficin and bromelain PPO was only partially digested after 15 min, where the bands of active PPO are still obvious and almost as strong as the respective bands of the control lane. After 2 h of incubation, the protease preparations had completely hydrolyzed the two forms of PPO, with the sole exception of bromelain, where traces of active PPO can still be detected. On these SDS-PAGE gels, we clearly noticed that the hydrolysis of the latent form and the active form by the protease preparations did not happen in the same manner. The latent PPO disappeared before the active PPO even though the band of the latent PPO was initially stronger (cf. the control lane). This is mostly caused by limited proteolysis of latent PPO giving rise to active PPO. Limited proteolysis of PPO has been shown to activate latent PPO (Tolbert, 1973; King & Flurkey, 1987; Robinson & Dry, 1992). Robinson and Dry (1992) reported that latent PPO from broad bean is more sensitive to proteolytic cleavage at the C-terminal end. They found that in the presence of proteases, the latent form of PPO can be cleaved yielding the active form (45 kDa). This suggests that, initially, the proteases attack the exposed peptide chains, thereby liberating or destroying the C-terminal domain, which leads to the generation of active PPO. The active PPO bands, however, tended to disappear as the incubation progressed to 2 h, resulting in a complete breakdown of the two domains of PPO, unveiling the importance of sufficient incubation time for PPO degradation.

3.2. Inhibition with protease preparations

Fig. 2 shows the effect of different concentrations (50, 100, 200, and 500 μg) of protease preparations (papain, calotropain, ficin, and bromelain) on PPO activity. The results indicate that with low concentrations of protease preparations there is an increase in PPO activity during the first minutes of incubation, where 50 μg of papain and calotropain increased PPO activity to $148 \pm 3.0\%$ and $106 \pm 5.7\%$, respectively. In addition, ficin and bromelain increased PPO activity to $127 \pm 4.0\%$ and $129 \pm 1.8\%$ after 2 and 5 min of incubation, respectively. As reported above, this can be attributed to the limited proteolysis of latent PPO, which leads to PPO activation. Observations of the same nature were made by Tolbert (1973), who reported that latent PPO of spinach (*Spinacia oleracea* L.) can be activated in < 30 sec by incubation with trypsin.

However, PPO activity started to decrease rapidly as the incubation progressed. The results (Fig. 2A, B, C, D.) show that the inhibition of PPO with proteases was proportional to the time of incubation and the protease concentration. All protease preparations successfully inhibited PPO. However, compared to ficin and bromelain, strong PPO inhibition was clearly demonstrated with the use of papain and calotropain. The papain preparation was the most effective inhibitor for PPO activity, where no PPO activity was detected with all tested papain concentrations after one hour of incubation. These results suggest that papain had a strong proteolytic activity on PPO, which confirms the results of PPO proteolysis monitored by SDS-PAGE. With calotropain, CI was reached after more than 1 h for all protease loads $\leq 100 \mu\text{g}$. For ficin, CI was registered with 100, 200 and 500 μg after incubation times of 24, 16

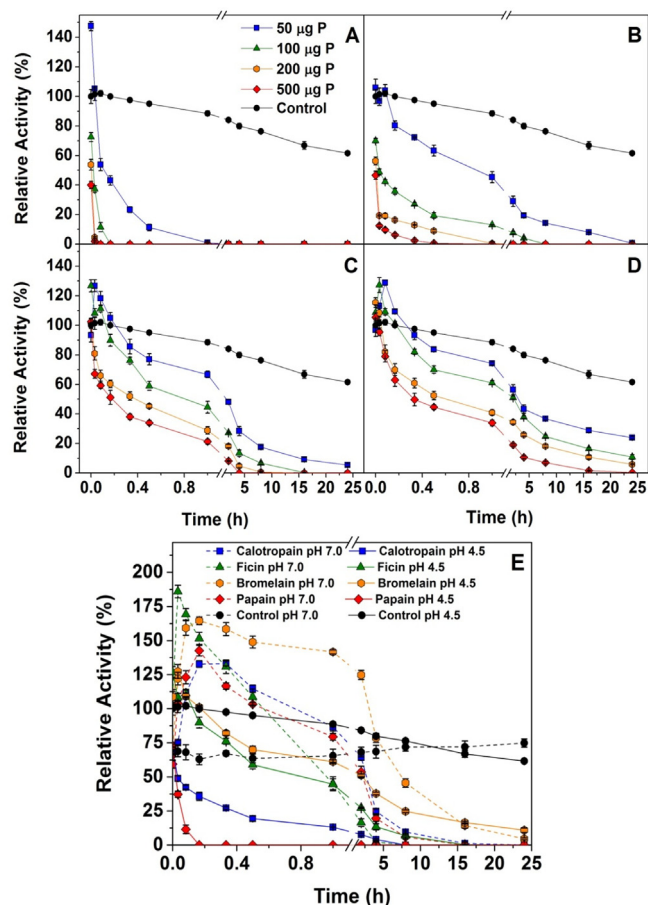


Fig. 2. (A), (B), (C), (D): Effect of the concentration of protease preparations (P) and incubation times on PPO activity at pH 4.5 (A, papain; B, calotropain; C, ficin; D, bromelain). (E) Effect of 100 μg of protease preparations and incubation times on PPO activity at pH 4.5 and 7.0. (//), indicate the gap that separates the scales on the same axis.

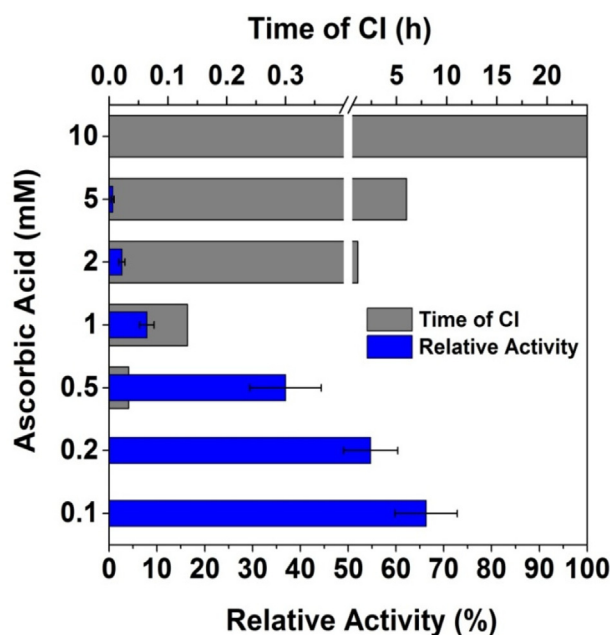


Fig. 3. Effects of different concentration of ascorbic acid on PPO activity and time of complete inhibition (CI). (//), indicate the gap that separates the scales on the same axis.

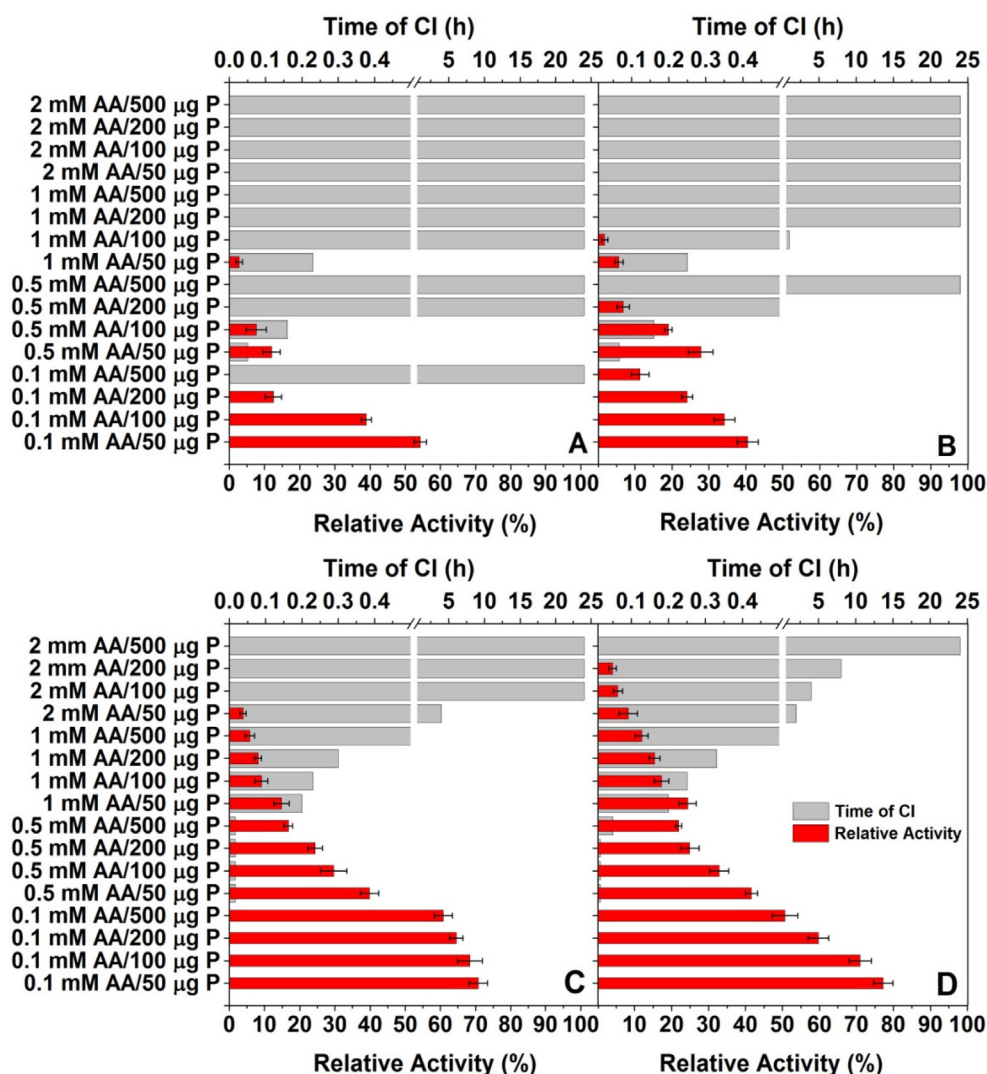


Fig. 4. Effects of different combinations AA/P on PPO activity and time of CI. (A) papain. (B) calotropain. (C) ficin. (D) bromelain. (//), indicate the gap that separates the scales on the same axis.

and 4 h, respectively, while bromelain was the weakest inhibitor, as no CI was registered for all the tested concentrations. According to those results, a complete inactivation of PPO by proteases cannot be achieved without allowing for the appropriate time of incubation, necessary for PPO digestion. The time of incubation can last from a few minutes to several hours, depending on the concentration and the proteolytic activity of the proteases. Furthermore, a short time of incubation may lead to PPO activation and thus an actual increase in PPO activity.

The effect of different protease preparations on PPO activity at pH 7.0 was also studied using 100 µg of each protease preparation. The results (Fig. 2E) show that PPO activation with protease preparations at pH 7.0 during the first minutes of incubation was much higher than for the treatment at pH 4.5 for all four tested proteases. The treatments at pH 7.0 did harm the inhibition process, where the inactivation of PPO was less effective than at pH 4.5. This can be attributed to the difference of the optimum pH between the latent and the active form of PPO, suggesting that the resulting active PPO (after the limited proteolysis) is more stable and active at pH 7.0. Similar observations were reported by Molitor et al. (2015) for PPO from the petals of *Coreopsis grandiflora*, where the latent and the active form of PPO were optimally active at two different pH values of 4.0 and 6.0, respectively. The authors related this difference to the acidic activation of the latent form at pH 4.

3.3. Inhibition with AA

Fig. 3 shows the time of complete inhibition (CI) and the remaining relative activity obtained with AA at concentrations ranging from 0.1 mM to 10 mM. The inhibitory effect of AA on PPO increased markedly with the concentration. At low concentrations (0.1 and 0.2 mM) PPO relative activity decreased significantly to 66 ± 6.5 and $55 \pm 5.7\%$, respectively, and thus, no CI was registered and the browning started immediately. However, for all the concentrations of AA beyond 0.2 mM, we observed a CI of PPO. The time of CI clearly increased with AA concentration. The concentrations 0.5, 1 and 2 mM provided CI for 2, 10 and 70 min, respectively. Increasing the concentration to 5 mM of AA, PPO activity was suppressed for more than 6 h, with only $0.76 \pm 0.31\%$ relative activity remaining after this time. Furthermore, the concentration of 10 mM did not allow for PPO activity over the time course of the experiment, yielding more than 24 h of CI. These findings suggest that AA loses its efficacy over time, preventing browning just for a limited time period, which depends on the used concentration. Similar observations were also reported by Gil, Gorny, and Kader (1998), who indicated that AA treatments reduced browning, but only for a finite period of time. AA reduces the oxidized substrate molecules to their diphenolic state, but once it is consumed PPO starts to recover activity.

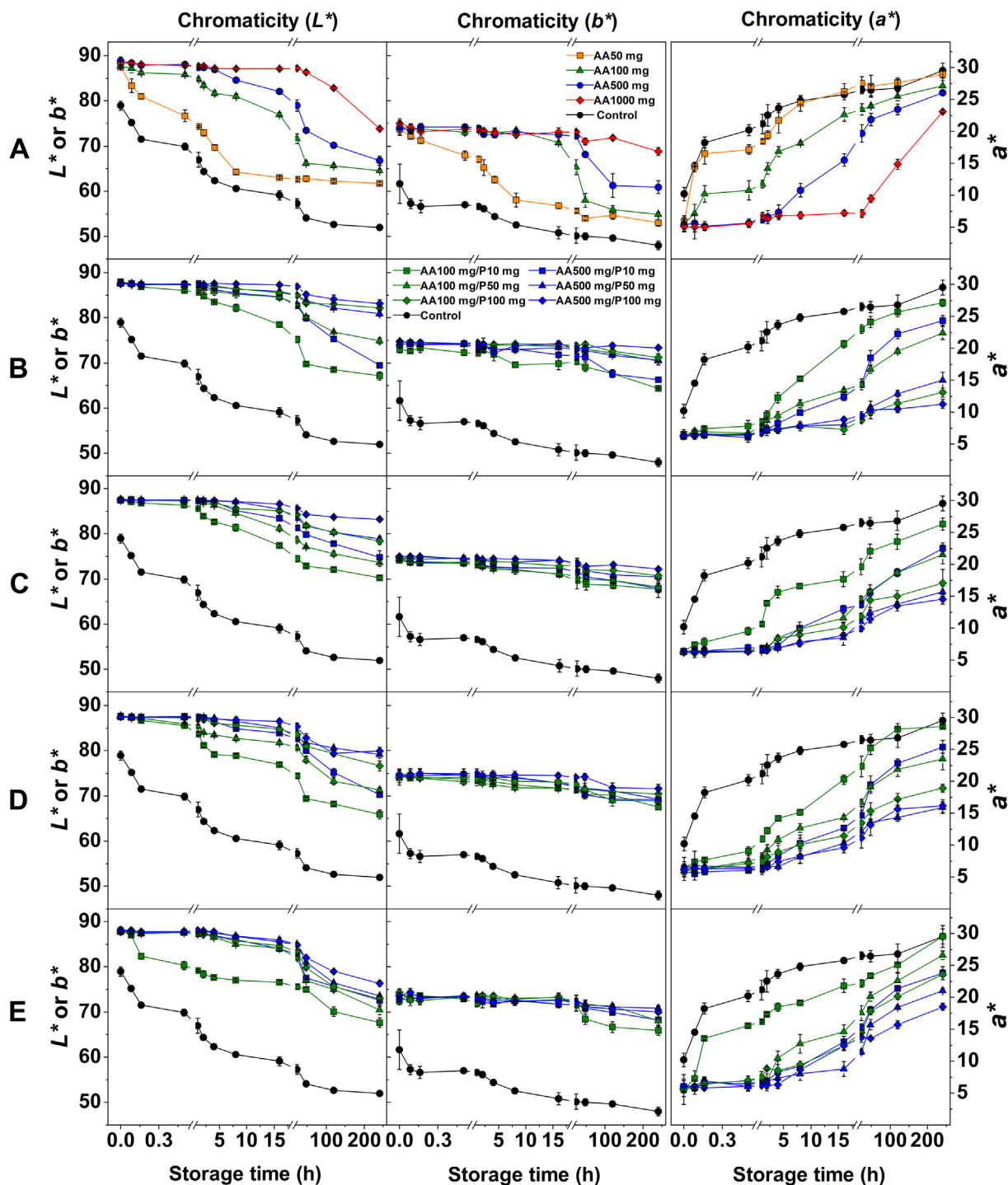


Fig. 5. Chromaticity (a^* , b^* , and L^*) evolution of treated and untreated apricot purees during storage at 4 °C. (A) samples treated with different concentration of AA. (B), (C), (D), (E): samples treated with AA/P combinations (B, AA/papain; C, AA/calotropain; D, AA/ficin; E, AA/bromelain). Each value is presented as mean \pm SE ($n = 3$). (//), indicate the gap that separates the scales on the same axis.

3.4. Inhibition with combinations of AA/P

To optimize the inhibition of PPO by proteases, AA was used to provide inhibition during the time that proteases need to hydrolyze PPO. The concentrations of AA (5 and 10 mM) that gave a CI greater than 5 h in the previous experiment were excluded from the set of tested AA/P combinations. The results are depicted in Fig. 4. The majority of the combinations with AA/papain and AA/calotropain exhibited a CI of PPO activity over 24 h, mostly when papain and calotropain were combined with 1 and 2 mM of AA. However, when papain and

calotropain were combined with low concentrations of AA (0.1 and 0.5 mM), PPO activity was detected, especially for the combinations with 50 and 100 μ g of protease preparations. This indicates that AA was oxidized before the proteases could complete the hydrolysis of PPO. AA/ficin and AA/bromelain combinations were not as effective as AA/papain and AA/calotropain. This can be justified by the low proteolytic activity of ficin and bromelain compared to papain and calotropain (see Fig. 2), which requires a higher concentration of AA to allow for the time needed for a sufficiently complete proteolysis of PPO. However, even if those combinations did not give a CI over 24 h, the overall

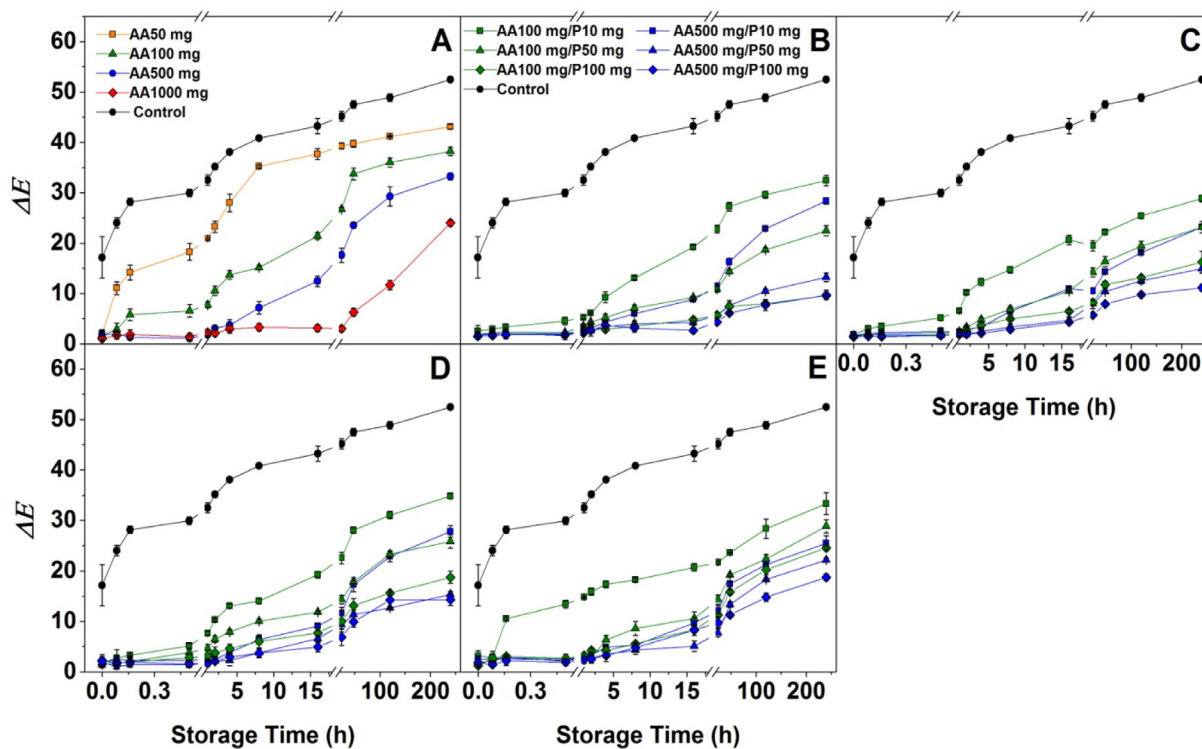


Fig. 6. Change in total color difference (ΔE) of treated apricot purees during storage at 4 °C. (A) Samples treated with different concentrations of AA. (B), (C), (D), (E): samples treated with different AA/P combinations (B, AA/papain; C, AA/calotropain; D, AA/ficin; E, AA/bromelain). Each value is presented as mean \pm SE (n = 3). (//), indicate the gap that separates the scales on the same axis.

results show that they did markedly improve the time of CI compared to the treatments with AA only. We suggest that the proteolysis of PPO by proteases decreased the PPO activity, thereby, also decreasing the amount of the produced quinones, which directly increased the time of CI by lowering the amount of consumed AA.

3.5. Application on apricot puree

In order to test the efficiency of the AA/P combinations *in vivo*, tests with samples of 100 g fresh apricot puree were conducted. The changes in color coordinates (a^* , b^* , and L^*) and the changes of total color difference (ΔE) were measured over 10 days and the results are presented in Figs. 5 and 6, respectively. In order to assess the efficiency of treatments, ANOVA was performed on the color parameters at the end of the storage period (10 days, Supplementary Table 1).

Generally, the browning of fruits and vegetables is marked by a decrease of L^* values and an increase of a^* values, which consequently increases ΔE values. The overall appearance of apricot purees regardless of treatment was a gradual decrease in a^* and L^* values and a gradual increase in b^* and ΔE values as storage time progressed. However, important differences were found between the different samples. In recently homogenized untreated puree (control), a^* , b^* , and L^* coordinates were 10 ± 1.1 , 62 ± 4.3 and 79 ± 1.0 , respectively. These values are significantly different from all the recently homogenized, treated samples (Fig. 5). This difference indicates high browning in the control puree, reflecting an immediate browning that mainly occurred during the homogenization. Additionally, the browning of the control puree increased gradually during storage time, and ΔE moved from 17 ± 4.1 at 0 min to 52.5 ± 0.23 at day 10, where 50% of this browning occurred within the first 10 min. Treatments with 100, 500 and 1000 mg of AA were effective in delaying the browning of apricot puree for 5 min, 30 min and 24 h, respectively, compared to the untreated samples (Fig. 6A). However, browning manifested itself afterwards, indicated by clear declines of chromaticity L^* and b^* and an

increase of chromaticity a^* , as well as ΔE values.

In comparison to untreated apricot purees, all AA/P combinations significantly ($p < 0.0001$) decreased browning and the more AA and/or protease was applied, the longer the apricot puree retained its color (Supplementary Table 1). The results clearly show that the AA/P combinations were more effective than the application of AA alone, and they reduced browning considerably, for some combination browning was reduced by 80% (500 mg AA/100 mg papain, 100 mg AA/100 mg papain, and 500 mg AA/100 mg calotropain). The apricot purees treated with AA/papain combinations had the lowest browning during storage time, where AA/calotropain was slightly less efficient followed by the AA/ficin and AA/bromelain combinations. These observations are in accordance with our findings *in vitro*. Meanwhile, no combination did manage to completely stop browning reactions *in vivo* like they did *in vitro*. A complete control of enzymatic browning *in vivo* was always a difficult goal to achieve even with strong inhibitors (McEvily et al., 1992; Marshall et al., 2000) or blanching (Deylami, Rahman, Tan, Bakar, & Olusegun, 2016), where treated fruits and vegetables mostly still undergo minimal browning. However, even if the main cause of color changes of apricot puree is attributed to PPO, the browning *in vivo* can be partially caused by other phenomenon, who may also have contributed to the color change observed here. The liquid release caused by the mechanical stresses favors fluids leakage, thereby causing a decrease in the water holding capacity of the puree over the time of storage, which leads to lower reflectance and a decrease in chromaticities L^* and b^* (Zhang et al., 2018). Different reactions may also simultaneously contribute to color changes of the puree such as non-enzymatic browning and the oxidation of carotenoids and AA (De Ancos, Sánchez-Moreno, Plaza, & Cano, 2011).

4. Conclusion

The results presented herein indicate that the selected plant protease preparations were able to efficiently inactivate apricot PPO. The

degree on inactivation is proportional to the time of incubation, the proteolytic activity and the concentration of the protease and thus, papain and calotropain were the most effective proteases on PPO. The AA/P combinations were highly effective as browning inhibitors, where ascorbic acid prevented the browning reactions that may occur before or during the proteolytic inactivation of PPO with the proteases. In addition, the application of AA/P combinations on apricot puree significantly reduced color loss of the treated samples, thereby demonstrating the feasibility of the concept in a real-world setup. This study provides clear proof that papain, calotropain, ficin, and bromelain can be effective as natural inhibitors if there is enough time to digest the PPO in question. Therefore, proteases in combination with ascorbic acid can be used as substitutes for chemical inhibitors of enzymatic browning.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Austrian Science Foundation (FWF, P25217, P29144 and P32326), and the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for the financial support of this work. The first author gratefully acknowledges the Austrian Federal Ministry of Science, Research and Economy (BMWFW) for an Ernst Mach-Stipendium (Ernst Mach – weltweit) grant, and the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) for the PNE scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100053>.

References

- Anusha, R., Singh, M. K., & Bindhu, O. S. (2014). Characterisation of potential milk coagulants from *Calotropis gigantea* plant parts and their hydrolytic pattern of bovine casein. *European Food Research and Technology*, 238(6), 997–1006. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2177-0>.
- Baeyens-Volant, D., Matagne, A., El Mahyaoui, R., Wattiez, R., & Azarkan, M. (2015). A novel form of ficin from *Ficus carica* latex: Purification and characterization. *Phytochemistry*, 117, 154–167. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.019>.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., & Cano, M. P. (2011). *Nutritional and health aspects of fresh-cut vegetables*. *Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing*. Florida-USA: CSC Press145–184.
- Derardja, A. E., Pretzler, M., Kampatsikas, I., Barkat, M., & Rempel, A. (2017). Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(37), 8203–8212. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03210>.
- Devaraj, K. B., Kumar, P. R., & Prakash, V. (2008). Purification, Characterization, and Solvent-Induced Thermal Stabilization of Ficin from *Ficus carica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11417–11423. <https://doi.org/10.1021/jf802205a>.
- Deylami, M. Z., Rahman, R. A., Tan, C. P., Bakar, J., & Olusegun, L. (2016). Effect of blanching on enzyme activity, color changes, anthocyanin stability and extractability of mangosteen pericarp: A kinetic study. *Journal of Food Engineering*, 178, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.001>.
- Food and Drug Administration (FDA) (2000). Sulfites: An important food safety issue, an update on regulatory status and methodologies.
- Freitas, C. D. T., Oliveira, J. S., Miranda, M. R. A., Macedo, N. M. R., Sales, M. P., Villas-Boas, L. A., & Ramos, M. V. (2007). Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(10), 781–789. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.020>.
- Gil, M. I., Gorny, J. R., & Kader, A. A. (1998). Responses of “Fuji” apple slices to ascorbic acid treatments and low-oxygen atmospheres. *HortScience: A Publication of the American Society for Horticultural Science (USA)*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US1997089860>.
- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E., & Haard, N. F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous protease inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214(1), 65–69. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1457>.
- González-Rábade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., & Oliver-Salvador, M. C. (2011). Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro*—a review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 983–996. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>.
- Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., & Wicz, W. (2007). Cysteine proteases. *Industrial enzymes* (pp. 181–195). Springer.
- Harrach, T., Eckert, K., Maurer, H. R., Machleidt, I., Machleidt, W., & Nuck, R. (1998). Isolation and Characterization of Two Forms of an Acidic Bromelain Stem Proteinase. *Journal of Protein Chemistry*, 17(4), 351–361. <https://doi.org/10.1023/A:1022507316434>.
- Homaei, A. A., Sajedi, R. H., Sariri, R., Seyfzadeh, S., & Stevanato, R. (2010). Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino Acids*, 38(3), 937–942. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0302-3>.
- Kampatsikas, I., Bijelic, A., Pretzler, M., & Rempel, A. (2019). A peptide inducing self-cleavage reaction initiates the activation of tyrosinase. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(22), 7475–7479. <https://doi.org/10.1002/anie.201901332>.
- King, R. S., & Flurkey, W. H. (1987). Effects of limited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 41(3), 231–240. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740410305>.
- Labuza, T., Lillemo, J. H., & Taoukis, P. S. (1992). Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes. *Fruit Processing*, 2, 9–13.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lozano-De-Gonzalez, P. G., Barrett, D. M., Wrolstad, R. E., & Durst, R. W. (1993). Enzymatic browning inhibited in fresh and dried apple rings by pineapple juice. *Journal of Food Science*, 58(2), 399–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04284.x>.
- Marshall, M. R., Kim, J., & Wei, C.-I. (2000). *Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods*. Rome: FAO49.
- Matagne, A., Bolle, L., El Mahyaoui, R., Baeyens-Volant, D., & Azarkan, M. (2017). The proteolytic system of pineapple stems revisited: Purification and characterization of multiple catalytically active forms. *Phytochemistry*, 138, 29–51. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.019>.
- Mathew, D. S., & Juang, R.-S. (2005). Improved back extraction of papain from AOT reverse micelles using alcohols and a counter-ionic surfactant. *Biochemical Engineering Journal*, 25(3), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.05.007>.
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318–2331. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.006>.
- McEvily, A. J., Iyengar, R., & Otwell, W. S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 32(3), 253–273. <https://doi.org/10.1080/10408399209527599>.
- Melgarejo, P., Calin-Sánchez, Á., Carbonell-Barrachina, Á., Martínez-Nicolás, J. J., Legua, P., Martínez, R., & Hernández, F. (2014). Antioxidant activity, volatile composition and sensory profile of four new very-early apricots (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1), 85–94. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6201>.
- Mellidou, I., Koukounaras, A., Chatzopoulou, F., Kostas, S., & Kanellis, A.K. (2017). Plant vitamin C: one single molecule with a plethora of roles. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, 2nd Edition, pp. 463–498.
- Mesquita, V. L. V., & Queiroz, C. (2013). Enzymatic browning. *Biochemistry of Foods* (pp. 387–418). Elsevier.
- Molitor, C., Mauracher, S. G., Pargan, S., Mayer, R. L., Halbwirther, H., & Rempel, A. (2015). Latent and active aureone synthase from petals of *C. grandiflora*: A polyphenol oxidase with unique characteristics. *Planta*, 242(3), 519–537. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2261-0>.
- Nath, L. K., & Dutta, S. K. (1991). Extraction and purification of curcain, a protease from the latex of *Jatropha curcas* Linn. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43(2), 111–114. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb06642.x>.
- Post, A. E., Arnold, B., Weiss, J., & Hinrichs, J. (2012). Effect of temperature and pH on the solubility of caseins: Environmental influences on the dissociation of αS- and β-casein. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1603–1616. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4641>.
- Ramos, M. V., Araújo, E. S., Jucá, T. L., Monteiro-Moreira, A. C. O., Vasconcelos, I. M., Moreira, R. A., & Moreno, F. B. (2013). New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.001>.
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., & Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44(7), 1875–1887. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.053>.
- Robinson, S. P., & Dry, I. B. (1992). Broad Bean Leaf Polyphenol Oxidase Is a 60-Kilodalton Protein Susceptible to Proteolytic Cleavage. *Plant Physiology*, 99(1), 317–323. <https://doi.org/10.1104/pp.99.1.317>.
- Tolbert, N. E. (1973). Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiology*, 51(2), 234–244. <https://doi.org/10.1104/pp.51.2.234>.
- Vomas-Vigayzo, L. (1981). Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(1), 49–127. <https://doi.org/10.1080/10408398109527312>.
- Whitaker, J. R., & Lee, C. Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. *Enzymatic Browning and Its Prevention*, 600, 2–7. <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0600.ch001>.
- Zhang, Z., Wang, J., Zhang, X., Shi, Q., Xin, L., Fu, H., & Wang, Y. (2018). Effects of radio frequency assisted blanching on polyphenol oxidase, weight loss, texture, color and microstructure of potato. *Food Chemistry*, 248, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.065>.
- Zhou, L., Ling, B., Zheng, A., Zhang, B., & Wang, S. (2015). Developing radio frequency technology for postharvest insect control in milled rice. *Journal of Stored Products Research*, 62, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2015.03.006>.

Résumés

Purification, caractérisation et essais d'inhibition de la polyphénol-oxydase de l'abricot par des combinaisons : préparations de protéases végétales- acide ascorbique.

Résumé

Le brunissement enzymatique est considéré généralement comme un phénomène indésirable dans l'industrie alimentaire. Il est considéré comme l'un des plus gros problèmes lors de la manipulation, du stockage, de la conservation et de la transformation des abricots. Les réactions de brunissement dans les fruits et légumes sont principalement initiées par la polyphénol oxydase (PPO). Dans ce cadre, l'objectif de cette thèse est d'extraire, de purifier, de caractériser puis d'inhiber la PPO de l'abricot (*PaPPO*). Ainsi, ce travail décrit une nouvelle méthode pour inhiber et inactiver la *PaPPO* par des combinaisons de protéases végétales (papaïne, calotropaine, ficine et bromélaïne) et d'acide ascorbique. Nos résultats montrent que la *PaPPO* est présente dans le fruit sous sa forme latente (*L-PaPPO*). La *PaPPO* purifiée est caractérisée par un poids moléculaire de 63 kDa sur SDS-PAGE, un pH optimal de 4,5 et une température optimale de 45 °C en utilisant le catéchol comme substrat. L'activité *PaPPO* a été améliorée en présence de faibles concentrations (≤ 2 mM) de SDS. L'enzyme a montré une forte activité diphénolase avec la plus grande affinité envers le 4-méthylcatéchol ($K_m = 2,0$ mM) et l'acide chlorogénique ($K_m = 2,7$ mM). La *L-PaPPO* s'est auto-activée spontanément pendant le stockage à 4 °C, créant une nouvelle bande à 38 kDa représentant la forme activée (*A-PaPPO*). Cette forme a montré une faible activité monophénolase. La masse de l'*A-PaPPO* déterminée par spectrométrie de masse est de 37 455,6 Da (Asp102 → Leu429). La *L-PaPPO* et l'*A-PaPPO* ont été identifiées comme des *PaPPO* (UniProt O81103) en utilisant l'empreinte peptidique massique. L'inactivation de la *PaPPO* par les protéases végétales a montré que les protéases sélectionnées sont capables d'inactiver la *PaPPO* à un pH de 4,5, le degré d'inactivation est proportionnel au temps d'incubation et à la concentration de la protéase. La papaïne est la protéase la plus efficace, où 50 µg a été suffisante pour inactiver complètement la *PaPPO* en moins d'une heure. L'AA a empêché les réactions de brunissement qui peuvent se produire avant ou pendant l'inactivation de la *PaPPO* par la protéase. Les combinaisons acide ascorbique/préparations de protéases (AA/P) ont été très efficaces *in vitro*, où la combinaison 2 mM AA/500 µg P a complètement inhibé l'activité *PaPPO* pendant les 24 h de suivi. Les combinaisons AA/P ont été également efficaces *in vivo*, car les purées d'abricots traitées ont significativement conservé leur couleur ($p < 0,0001$, par rapport aux échantillons non traités après 10 jours de stockage). Les résultats montrent que les combinaisons AA/P constituent une méthode pratique prometteuse contre le brunissement enzymatique, et qui peuvent être appliquées en industrie alimentaire afin de contrôler le brunissement enzymatique des fruits et légumes.

Mots-clés : Brunissement enzymatique, abricot, polyphénol oxydase, purification, caractérisation, inhibition, protéases végétales, acide ascorbique.

Abstract

Enzymatic browning generally is an undesirable phenomenon in the food industry. It is considered to be one of the biggest problems during apricot handling, storage, preservation and transformation. Browning reactions in fruits and vegetables are mainly initiated by polyphenol oxidase (PPO). Therefore, the objective of this thesis is extract, purify, characterize and then inhibit apricot PPO (*PaPPO*). Thus, herein describes a new method to inhibit as well as inactivate *PaPPO* by combinations of plant proteases (papain, calotropain, ficin and bromelain) and ascorbic acid. Our results show that *PaPPO* is present in the fruit in its latent form (*L-PaPPO*). The purified *PaPPO* was characterized with a molecular weight of 63 kDa on SDS-PAGE, a pH and a temperature optimum at pH and 45 °C for catechol as substrate. The activity was enhanced by low concentrations (≤ 2 mM) of SDS. It showed diphenolase activity and highest affinity toward 4-methylcatechol ($K_m = 2.0$ mM) and chlorogenic acid ($K_m = 2.7$ mM). *L-PaPPO* was found to be spontaneously activated during storage at 4 °C, creating a new band at 38 kDa representing the activated form (*A-PaPPO*). Surprisingly the active form showed a weak monophenolase activity. The mass of *A-PaPPO* was determined by mass spectrometry as 37 455.6 Da (Asp102 → Leu429). Both *L-PaPPO* and *A-PaPPO* were identified as PPO corresponding to the known *PaPPO* sequence (UniProt O81103) by means of peptide mass fingerprinting. The inactivation of *PaPPO* with proteases showed that the selected proteases were able to inactivate *PaPPO* at pH 4.5, with the degree of inactivation proportional to incubation time and protease concentration. Papain was the most effective protease, with 50 μ g completely inactivating *PaPPO* in less than one hour. AA prevented browning reactions that occur before or during *PaPPO* inactivation by protease. The combinations of ascorbic acid/proteases (AA/P) were highly effective *in vitro*, where 2 mM AA/500 μ g P inhibited *PaPPO* activity completely over 24 h. The combination of AA/P was also effective *in vivo*, as treated apricot purees preserved their color ($p < 0.0001$, compared to untreated samples after 10 days of storage). The results demonstrate that AA/P combinations constitute a promising practical anti-browning method with feasible application in the food industry that can help control enzymatic browning in fruits and vegetables.

Keywords: Enzymatic browning, apricot, polyphenol oxidase, purification, characterization, inhibition, plant proteases, ascorbic acid.

الإسمرار الأنزيمي عموماً هو ظاهرة غير مرغوب فيها في صناعة المواد الغذائية ويعتبر واحدة من أكبر المشكلات أثناء قطف، تخزين، حفظ وتحويل المشمش. تفاعلات الإسمرار في الفواكه والخضراوات تبتدى أساساً بواسطة إنزيم البوليفينول أوكسيداز (PPO). في هذا الإطار، فإن هدف هذه الأطروحة هو استخراج، تصفية، توصيف ثم تثبيط إنزيم بوليفينول أوكسيداز المشمش (PaPPO). كما أن هذا العمل يقترح طريقة جديدة لتثبيط وتعطيل الـ PaPPO وذلك باستعمال توليفات من بروتيازات نباتية (باباين، كالتروبين، فيسين وبروميلين) وحمض الأسكوربيك. أظهرت النتائج أن إنزيم الـ PaPPO موجود في فاكهة المشمش في صيغة كامنة (L-PaPPO). يتميز الـ PaPPO المصفى بوزن جزيئي قدره 63 كيلو دالتون على هلام متعدد الأكريلاميد (SDS-PAGE) ويتصف بدرجة حموضة مثلى 4,5 pH ودرجة حرارة مثلى 45 درجة مئوية باستعمال الكاتيكول كركيزة. نشاط الـ PaPPO تعزز بإضافة تركيزات منخفضة (≥ 2 ملي مولار) من مادة الـ SDS. كما أبان الإنزيم عن نشاط قوي مع ثنائيات الفينول حيث سجلنا أعلى ألفة نحو ركيزة الـ 4 ميثيل كاتيكول (2,0 ملي مولار $K_m =$) وحمض الكلوروجينيك (2,7 ملي مولار $K_m =$). تم تسجيل تنشيط تلقائي للبوليفينول أوكسيداز الكامنة (L-PaPPO) أثناء عملية التخزين في حرارة 4 درجات مئوية، حيث نشأ عنها بروتين جديد بوزن جزيئي يبلغ 38 كيلو دالتون يمثل الصيغة النشطة للبوليفينول أوكسيداز (A-PaPPO). هذه الصيغة النشطة أظهرت نشاطاً ضعيفاً مع أحاديات الفينول. تم تحديد كتلة الـ A-PaPPO بواسطة مطياف الكتلة بـ 37455,6 دالتون (أسباراجين 102 ← ليوسين 429). من خلال مقارنة التسلسل الببتيدي ومطابقة البصمة الكتلية للبيبتيدات تم التأكد من الـ L-PaPPO و الـ A-PaPPO على أنهما بوليفينول أوكسيداز موافقين للـ PaPPO المعروف في قاعدة البيانات (UniProt O81103). من ناحية أخرى أظهرت عملية تثبيط الـ PaPPO بواسطة البروتياز أن البروتيازات المختارة قادرة على تعطيل الـ PaPPO في درجة الحموضة 4,5. كفاءة التعطيل تتناسب طردياً مع وقت الحضانه وتركيز البروتياز. الباباين كان البروتياز الأكثر فاعلية، حيث قامت 50 ميكروغرام من هذا البروتياز بتعطيل كلي للـ PaPPO في أقل من ساعة. من جهة أخرى تكفل حمض الأسكوربيك بتثبيط تفاعلات الإسمرار الأنزيمي التي قد تحدث قبل أو أثناء تعطيل الـ PaPPO بواسطة البروتياز. أظهرت النتائج فعالية توليفات حمض الأسكوربيك مع البروتياز (AA/P)، حيث قامت الثنائيات 2 ملي مولار حمض الأسكوربيك/500 ميكروغرام بروتياز بتثبيط نشاط الـ PaPPO بشكل كامل على مدار 24 ساعة. مفعول التوليفات AA/P كان فعالاً أيضاً عندما تم تطبيقه مباشرة على المشمش، حيث حافظ مهروس المشمش المعالج على لونه مقارنة بالعينات غير المعالجة وذلك بعد 10 أيام من التخزين ($p < 0.0001$). توضح النتائج أن توليفات AA/P تشكل طريقة واعدة وعملية لمكافحة الإسمرار الأنزيمي مع إمكانية تطبيقها في صناعة وتحويل المواد الغذائية حيث يمكنها أن تساعد في التحكم في اسمرار الفواكه والخضراوات.

الكلمات المفتاحية: إسمرار إنزيمي، مشمش، بوليفينول أوكسيداز، تصفية، توصيف، تثبيط، بروتيازات نباتية، حمض الأسكوربيك.