

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique



Ecole Doctorale : Sciences de l'Eau et Développement Durable (SEDD)
Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement

MEMOIRE DE MAGISTER

Pour l'obtention du titre de

Magister en Génie de l'Environnement

Option : Sciences et Techniques de l'Environnement

Thème :

*Etude comparative entre la cinétique d'oxydation
du phénol par la tyrosinase libre et immobilisée
dans le gel d'alginate de calcium*

Présentée par : M^{me} LEBOUKH Saida

Ingénieur d'Etat en Génie des Procédés Université de Badji Mokhtar(ANNABA)

Devant le jury :

Président :	Mme. A. HELLAL	Professeur, ENP
Directeur :	Mr.A.NAMANE	Maître de conférences (B), ENP
Examineurs :	Mme. F. FEZOUANE	Professeur, Boumerdès
	Mme. S. ZEBOUDJ	Maître de conférences (A), ENP
	Mr.A. CHERGUI	Maître de conférences (A), ENP

ENP, Avenue Hassen Badi, El-Harrach, Alger

Dédicaces

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

A mes parents

A mon mari Mohamed

A mes enfants Ramy, Islam

A mes frères Mourad, Ouahel et mes soeurs

A toute ma famille

A tous mes amis.

Remerciement

Je tiens en premier lieu à exprimer ma sincère gratitude au Pr. Amina Hallal, Directeur de Recherche à l'ENP, pour m'avoir accueilli dès le stage de magister au sein du Laboratoire de Sciences et Technique Environnementales qu'elle dirige. Je salue encore votre rigueur scientifique ainsi que vos grandes valeurs humaines.

J'adresse aussi tous mes remerciements à mon promoteur Docteur Abdel Kader Namane, Maître de conférences à l'ENP. Dont la pertinence des observations a considérablement contribué à l'aboutissement de mon travail.

Je remercie tous particulièrement Mr. GOUZI.H (Enseignant-Chercheur à l'université de Amar Tlidji de l'Agouate) pour leur collaboration, le choix de thème, ses efforts scientifiques, et ses conseils durant ce projet de recherche. Merci de m'avoir fait découvrir l'Enzymologie et pour la confiance que vous m'avez su m'accorder le long de cette recherche.

Je tiens également à remercier les membres de jury d'avoir examiné mon humble travail ainsi qu'à toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation à ce modeste œuvre.

Je souhaiterai enfin finir par une pensée envers mes proches, mon marie qui m'a aidée à réaliser ce travail, et qui m'a supportée durant ces années, mes parents, mon frère Mourad et mes sœurs.

Sommaire

<i>Introduction générale</i>	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	3
Chapitre I : Phénol	3
I-1- La pollution par le phénol.....	3
I-1-1. Identité du phénol.....	3
I-1-2. Synthèse industrielle.....	3
I-1-3. Utilisation du phénol.....	4
I-1-4- Principales sources d'exposition.....	4
I-1-5- Comportement dans l'environnement.....	5
I-1-6- Toxicité.....	5
I-1-7- Normes.....	6
I-2- Traitements des composés phénolés.....	7
I-2-1. Traitements physico-chimiques.....	7
I-2-2. Traitements biologiques.....	7
Chapitre II : Tyrosinase	12
II-1- Historique.....	12
II-2- Définition, nomenclature et classification de la polyphénol oxydase.....	12
II-3- Source et localisation de la polyphénol oxydase.....	14
II-4- Rôles biologiques et importance de la polyphénol oxydase dans les fruits et les végétaux.....	15
II- 5-Extraction de la polyphénol oxydase.....	17
II-6- Caractéristiques réactionnelles et structurales des polyphénols oxydases.....	18
II-6-1- les différents sous-groupes de PPO.....	18
II-6-2- Structure, poids moléculaire et site actif de la polyphénol oxydase.....	19
II-7- Application de la polyphénol oxydase.....	22
Chapitre III : Techniques d'immobilisation des enzymes	24
III-1- Définition	24
III-2- Les méthodes d'immobilisation des enzymes.....	25
III.3. Choix de la méthode d'immobilisation.....	27
III.4. L'immobilisation par inclusion des enzymes dans l'alginate de calcium.....	28
III.4.1. technique d'inclusion des enzymes	28

III.4.1.1. Définition de l'inclusion des enzymes	28
III.4.1.2. Procédé d'inclusion dans l'alginate.....	28
III.5. L'alginate.....	30
III.5.1. Origine	30
III.5.2. Structure	30
III.5.3. Obtention de l'alginate.....	31
III.5.4. Propriétés des alginates	31
III.6. Avantages de la méthode d'immobilisation des enzymes par inclusion.....	32
III.7. Inconvénients de la méthode des enzymes par inclusion.....	33
III.8. Application de la PPO immobilisée.....	34
Chapitre IV : Cinétique Enzymatique.....	36
IV.1. Principes de base de la cinétique enzymatique.....	36
IV.1.1. Définition	36
IV.1.2. Méthodes de détermination de l'activité enzymatique.....	36
IV.1.2.1. Les phases de la réaction enzymatique	37
IV.1.2.2. Mesure de la vitesse initiale	38
IV.1.2.3. Effets des paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique...	39
IV.1.3. Modèles mathématiques de la cinétique enzymatique	41
IV.1.3.1. Modèle de Michaelis-Menten	41
IV.1.3.2. Modèle de Briggs-Haldane	42
Matériels et méthodes.....	43
I- Matériels.....	43
II- Méthodes.....	43
II-1. Extraction de la tyrosinase du champignon <i>Agaricus bisporus</i>	43
II-2. Immobilisation de la tyrosinase par inclusion dans l'alginate de calcium.....	44
III- Caractérisation de la tyrosinase soluble et de la tyrosinase immobilisée.....	45
III-1- Caractérisation de la tyrosinase soluble.....	45
III-1-1- Détermination de l'activité de la tyrosinase soluble	45
III-1-2- Etude de la stabilité de la tyrosinase soluble	47
III-1-3- Effet de la concentration du substrat (phénol) sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase soluble	47
III-1-4- Détermination des paramètres cinétiques de la tyrosinase.....	47
III-1-5- Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation	

du phénol par la tyrosinase soluble	47
III-1-6- Influence de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase soluble	48
III.1.7.Etude de la stabilité thermique de l'enzyme soluble	48
III-1.8. Effet de pH sur l'activité de la tyrosinase.....	48
III-2- Caractérisation de la tyrosinase immobilisée.....	49
III-2-1- Détermination de l'activité de la tyrosinase immobilisée.....	49
III-2-2- Effet de la concentration du substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée.....	50
III.2.3.Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée.....	50
III.2.4.Effet de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée	50
III.2.5.Etude de la stabilité thermique de l'enzyme immobilisée.....	50
III.2.6.Effet du pH sur l'activité enzymatique	51
III.2.7.Effet du diamètre des billes d'alginate sur la vitesse initiale d'oxydation.	51
III.2.8.Etude de la stabilité opérationnelle de l'enzyme immobilisée.....	51
Résultats et discussions.....	53
I- Extraction de la tyrosinase d'<i>Agaricus bisporus</i>.....	53
I.1.Essai d'activité de la tyrosinase.....	54
II. Etude de la stabilité de la tyrosinase à -15°C	56
III. Les paramètres cinétiques de la tyrosinase libre et de la tyrosinase immobilisée	57
IV. Effet de la concentration de la tyrosinase sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol	62
V. Effet de la température sur l'activité de la tyrosinase libre et de la tyrosinase immobilisée.....	63
VI. Etude de la stabilité thermique de la tyrosinase libre et immobilisée.....	65
VII. Effet du pH sur l'activité de la tyrosinase libre et immobilisée.....	67
VIII. Effet du diamètre des billes d'alginate sur l'activité de la tyrosinase immobilisée	69
VIII- Etude de la stabilité opérationnelle de la tyrosinase immobilisée	70
Conclusion.....	72

<i>Références bibliographiques</i>	73
<i>Annexe</i>	92

Liste des figures

Figure 1: Schéma illustrant le mécanisme réactionnel de l'activité catécholase et crésolase de la tyrosinase de champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>) [69].....	11
Figure 2: Schéma de la réaction catalysée par la PPO ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées [20,88].....	14
Figure 3 : Formation des quinones catalysée par la diphénoloxydase en présence d'oxygène [55,56].....	19
Figure 4 : (a) Le site actif de fixation de l'oxygène des protéines à cuivre [58]. (b) Représentation schématique du centre de cuivre binucléaire. L'oxygène se lie comme peroxyde et chaque ion de Cu est lié à trois atomes d'azote d'histidine. Les symboles noirs-ions-Cu ; symboles blancs-oxygène ; symboles à tiret hachurés-His-N.....	21
Figure 5: Les trois états physiologiques du site actif de la polyphénol oxydase [74]: • (a) : forme <i>deoxy</i> les cuivres sont dans l'état cuivreux ; • (b) et (c) : formes <i>met</i> et <i>oxy</i> les cuivres sont dans l'état cuivrique.....	21
Figure 6: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 KDa (les atomes sont colorés par le type d'atome : Carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan [143].....	22
Figure 7 : Notion de micro- et de macroenvironnement [165].....	24
Figure 8 : Méthodes d'immobilisation. (a) enzyme non-covalent adsorbée à une particule insoluble ; (b) enzyme en covalence attachée à une particule insoluble ; (c) enzyme enfermée dans une particule insoluble par un polymère réticulé ; (d) enzyme confinée dans une membrane semi-perméable [165].....	26
Figure 9 : Procédé d'inclusion des enzymes dans l'alginate de calcium.....	29
Figure 10 : Structure d'une bille d'alginate [171].....	29
Figure 11 : Représentation de l'Acide β -D-mannuronique (M) Et l'Acide α -L-gulonurique (G) [164]	30
Figure 12 : Structure chimique des Alginates : Conformations du poly G-Blocs (à gauche), poly M-Blocs (à droite) et blocs mixtes MG (au centre) [164].....	31
Figure 13 : Les phases de la réaction enzymatique [193].	37
Figure 14 : formes de graphes montrant la variation de la vitesse de réaction enzymatique en fonction du temps [185].....	39
Figure 15 : Champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>).....	44
Figure 16: Technique de l'immobilisation de la tyrosinase par inclusion dans l'alginate de calcium.....	45
Figure 17 : Exemple de variation de l'absorbance au cours de l'oxydation du phénol par la tyrosinase soluble (tampon phosphate de sodium pH 6,0-0,05 M ; 30°C ; phénol 2,5 mM (29 ml); 1 ml d'extrait enzymatique) (a).....	46
Figure 18 : Exemple de variation de l'absorbance au cours de l'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée (tampon acétate de sodium pH 6,0-0,05 M ; 35°C ; phénol 2,5 mM ; enzyme diluée 10 fois; diamètre des billes d'alginate de calcium 2.6 mm). (b).....	49
Figure 19: Protocole d'extraction de la tyrosinase de champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>).....	53
Figure 20 : Réaction catalysée par la polyphénol oxydase: Hydroxylation et oxydation de la L-tyrosine en L-DOPA quinone respectivement [64].....	54

Figure 21 : Enregistrement par spectrophotométrie de l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase libre d' <i>Agaricus bisporus</i>	55
Figure 22: Stabilité de la tyrosinase du champignon de paris durant le stockage à -15C°.....	56
Figure 23: Effet de la concentration du substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase libre du champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>) (pH 6.0 ; 35°C). (A) Représentation graphique de Michaelis-Menten (B) Représentation graphique de Lineweaver-Burk.....	58
Figure 24 : Etude de l'effet de la concentration du substrat sur la vitesse initiale de l'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée dans le gel d'alginate de calcium à 2.5% (diamètre des billes 2.6 mm, pH 6 (tampon acétate de sodium 0.05 M), et à 35°C) (A) Représentation graphique de Michaelis-Menten ; (B) Représentation graphique de Lineweaver-Burk.....	60
Figure25: Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase libre (pH 6,0, 35°C ; phénol 2,5mM).....	63
Figure 26: Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée (pH 6,0, 35°C ; phénol 2,5mM).....	63
Figure 27: Effet de la température sur l'activité relative de la tyrosinase libre et immobilisée (phénol à 2,5 mM; pH 6,0).....	64
Figure 28 : Graphes d'Arrhenius pour la détermination de l'énergie d'activation de l'oxydation du phénol par la tyrosinase libre et la tyrosinase immobilisée dans le gel d'alginate de calcium.....	64
Figure 29: Graphique de la stabilité thermique de la tyrosinase libre et de la tyrosinase immobilisée après une durée d'incubation 10mn à chaque température (phénol à 2,5 mM; pH 6,0).....	66
Figure 30: Effet du pH sur l'activité de la tyrosinase libre et de la tyrosinase immobilisée (phénol à 2.5 mM ; 35°C).....	68
Figure 31 : Effet du diamètre des billes d'alginate l'activité de la tyrosinase immobilisée (phénol à 2.5 mM; pH 6.0 ; 35°C).....	69
Figure 32 : Stabilité de l'activité de la tyrosinase immobilisée après son réutilisation pour l'oxydation du phénol à 2.5 mM.....	71
Figure 33: L'aspect des billes d'alginate récupérées après recyclage de la tyrosinase immobilisée.....	71

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison entre les différentes techniques d'immobilisation [165].	27
Tableau 2 : Préparation du tampon phosphate de sodium.....	92
Tableau 3 : Préparation du tampon acétate de sodium.....	92

Introduction générale

Introduction générale

Les composés aromatiques, y compris le phénol, sont parmi les polluants organiques les plus communs dans les effluents provenant des industries du papier, du plastique, du pétrole, des teintures, de résine et du bois [1, 2, 3]. Le phénol est considéré comme un composé toxique, ce qui nécessite le développement d'une technologie efficace pour l'éliminer à partir des eaux usées [4, 5].

Pour cela, diverses méthodes ont été élaborées telles que l'extraction par solvant, la dégradation microbienne, l'adsorption sur charbon actif et l'oxydation chimique [6, 7,8]. Les méthodes d'extraction sont incomplètes et onéreuses, alors que les traitements par adsorption et d'oxydation sont extrêmement coûteuses pour de faibles concentrations de l'effluent [9, 10]. Les traitements microbiologiques sont alternatifs à ces procédés de traitement mais qui ont aussi leurs limites (instabilité, inhibition...) [11,12].

Le traitement des eaux usées par les enzymes est une alternative aux méthodes traditionnelles. L'application des enzymes, tels que les peroxydases, la laccase et la tyrosinase pour l'élimination du phénol des eaux usées, a un certain nombre d'avantages par rapport aux traitements biologiques classiques dont : la capacité à traiter une large gamme de concentration de contaminants, de pH, de température, des vitesses de réaction élevées, et une haute spécificité des enzymes pour leur substrats [13, 14, 15].

La tyrosinase est très utilisée pour l'élimination du phénol. C'est une métalloenzyme à cuivre largement répandue dans la nature [16]. Dans la présente étude, la tyrosinase a été obtenue à partir du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) qui est considéré comme la source naturelle majeure de cette enzyme [17,18, 19]. Elle catalyse deux réactions bien distinctes, l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols appelée activité crésolase et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones désignée sous le nom d'activité catécholase, avec consommation de l'oxygène moléculaire [20, 21, 22].

La tyrosinase est le plus souvent immobilisée dans des supports en vue de son réutilisation et en raison de sa stabilité thermique plus grande par rapport à sa forme libre [23]. L'alginate de calcium est l'une des matrices les plus couramment utilisées pour l'immobilisation des enzymes en raison de ses avantages tels que sa bonne biocompatibilité, son faible coût, sa disponibilité et la simplicité de sa préparation [24].

De ce fait, cette présente étude a pour objectif de suivre l'oxydation du phénol en mode batch par la tyrosinase libre et immobilisée par inclusion dans de l'alginate de calcium.

Après avoir extrait la tyrosinase à partir d'un champignon comestible (*Agaricus bisporus*) plus communément appelé champignon de Paris, ses caractéristiques d'élimination ont été étudiées à différentes valeurs de pH et de température. Les effets de la concentration du substrat et de l'enzyme ont été également étudiés.

Par la suite l'enzyme a été immobilisé par inclusion dans un gel d'alginate de calcium. Les effets de quelques paramètres physico-chimiques sur les propriétés d'oxydation ont été étudiés, en particulier les effets du pH ; de la température ; de la concentration du substrat et de l'enzyme ainsi que le diamètre des billes d'alginate de calcium.

Ce document comporte trois chapitres. Le premier présente une étude des principales données bibliographiques concernant le phénol dans l'environnement, ainsi que quelques éléments relatifs aux traitements, surtout enzymatique. Une brève étude bibliographique sur la tyrosinase, et les techniques d'immobilisation des enzymes. Une étude théorique sur les techniques d'immobilisation par inclusion sur un support d'alginate de calcium, et une étude sur les cinétiques enzymatiques. Le second chapitre abordera l'ensemble du matériel et des méthodes utilisés pour l'extraction de la tyrosinase, et la caractérisation de la tyrosinase libre et immobilisée. Dans le dernier chapitre, nous exposons et discuterons l'ensemble des résultats expérimentaux relatifs aux cinétiques de l'oxydation réalisés dans les différentes conditions opératoires.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Phénol

I- Etat des connaissances sur le phénol

Les risques liés à la pollution par le phénol sont connus de nos jours, et leurs maîtrises résident dans la prévention et le traitement de cette dernière.

Dans cette étude une recherche bibliographique est faite concernant ce polluant, ainsi que les traitements appliqués pour son élimination en s'intéressant plus particulièrement au traitement enzymatique.

I-1- La pollution par le phénol

I-1-1. Identité du phénol

Le phénol de formule brute C_6H_6O a été d'abord extrait du goudron de houille en 1834 par le chimiste allemand Rung [25]. C'est un des premiers constituants de la grande famille des composés organiques aromatiques [26].

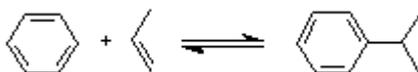
A l'état pur, c'est un solide à température ambiante hygroscopique et d'odeur âcre et douceâtre [27]. Il porte aussi les noms de : acide phénique, acide carbolique et hydroxybenzène [28].

I-1-2. Synthèse industrielle

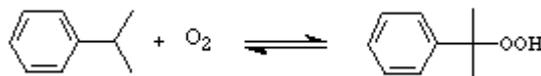
Historiquement, le phénol a été préparé industriellement à partir du benzène par une nitration, une sulfonation, une chloration suivie d'une hydrolyse [29].

La méthode de synthèse actuelle, plus avantageuse porte le nom de procédé de Hock. Elle fut découverte en 1944 par Hock et Lang et elle est exploitée depuis les années 50, produit environs 95% du phénol dans le monde [30]. Cette méthode comporte trois phases [31] :

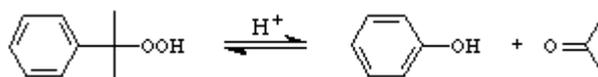
- La première est l'alkylation du benzène avec du propène pour former de l'isopropylbenzène (cumène) :



- La seconde consiste à oxyder du cumène par de l'air, donnant naissance à du l'hydroperoxyde de cumyle :



- La troisième, est la scission de l'hydroperoxyde de cumyle en phénol et acétone en milieu acide suivant la réaction exothermique suivante :



Ce procédé particulièrement avantageux illustre une des caractéristiques de la chimie industrielle moderne : limiter le coût des réactifs (ici l'O₂ de l'air) et valoriser au maximum les sous produits [32].

I-1-3. Utilisation du phénol

Le phénol est utilisé en synthèse organique. Il est à la base de la production d'un grand nombre de produits comme : des alkylphénols ; des diphénols ; des chlorophénols tels que le pentachlorophénol utilisé dans le traitement du bois ; des nitrophénols; des aminophénols tels que le paraminophénol intermédiaire dans l'industrie pharmaceutique [31,33] ; et l'aniline qui est intermédiaire important dans l'industrie des colorants azoïques [25,27].

Le bisphénol A utilisé dans la production des polycarbonates ; des résines époxydes et des polysulfonates et le caprolactame pour produire du nylon 6 [33, 34].Cependant, le phénol est aussi utilisé pour la fabrication de colorants; produits pharmaceutiques; pesticides; parfums; lubrifiants et solvants; peintures; d'adhésifs; d'explosifs; de textile; des matériaux isolants; du coke; de synthèse de médicaments [27,28,33].

Le phénol sert aussi de désinfectant ; d'anesthésiant et d'antiseptique généraux et on le trouve dans un certain nombre de produits de consommation [25,27].

I-1-4- Principales sources d'exposition

I-1-4-1. Sources naturelles

Le phénol est présent à l'état naturel dans le bois et les aiguilles de pin ; dans l'urine des herbivores ; et dans le goudron de houille [29].

La décomposition de déchet organiques divers ; le métabolisme humain et animal sont également responsables de la présence naturelle du phénol dans l'environnement [25, 31, 34]. Les incendies de forêt peuvent en augmenter les concentrations naturelles [27,34].

I-1-4-2. Sources anthropiques

Le phénol est fabriqué en tant qu'intermédiaire de la préparation d'autres produits chimiques et il peut être libéré comme sous produit ou contaminant [27].

Les échappements des moteurs thermiques [31,35] ; et la dégradation photochimique du benzène [34, 35,36] émettent aussi du phénol dans l'atmosphère. Il en est de même pour les usines de cokéfaction et de carbonisation à basse température ; de la combustion du bois et du tabac [25,29, 31].

I-1-5- Comportement dans l'environnement

Le phénol est un polluant ubiquitaire, donc il peut être détecté dans tout l'environnement à différentes concentrations:

- ***Atmosphère*** : Dans l'air, les vapeurs de phénol sont plus lourdes que l'air et forment des mélanges explosifs sous l'effet de la chaleur. Le phénol s'oxyde à l'air, et ce processus d'oxydation est accéléré par la lumière ou par des impuretés à effet catalytique [27]. Une partie est lessivée par la pluie [36].
- ***Sols*** : On possède peu de données attestant de la présence de phénol dans le sol, parce qu'il est rapidement adsorbé/désorbé, oxydé mais plus généralement biodégradé ou drainé dans l'eau et/ou volatilisé dans l'air [29].
- ***Eaux*** : Le phénol a été détecté dans les eaux de surfaces, eaux souterraines [10,37], eaux de pluie, eaux potables, les effluents industriels et les eaux de ruissellements urbaines. Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer et se dissout lentement et même dilué continue de former des solutions toxiques [29].
- ***Sédiments*** : Pour les sédiments, il n'existe pas suffisamment de données montrant la présence de phénol dans ces derniers. Par ailleurs, compte tenu des propriétés physico-chimiques du phénol il y a peu de chances que celui-ci s'accumule dans les sédiments [31].

I-1-6- Toxicité

Le phénol a été classé comme polluant toxique pour les microorganismes, animaux, végétaux et les êtres humains à différentes concentrations [38].

I-1-6-1. Homme

Le phénol est rapidement absorbé par toutes les voies d'exposition : le foie, les poumons, et la muqueuse gastro-intestinale sont les principaux sites de métabolisation du phénol [31]. La faible volatilité du phénol limitant les risques d'inhalation de concentrations importantes. Cependant, les vapeurs de phénol sont très désagréables pour les voies aériennes supérieures et pourraient être à l'origine de lésions sévères des muqueuses respiratoires.

Localement, le phénol exerce une action corrosive sur les tissus, c'est un irritant sévère pour la peau et les yeux. L'inhalation donne des signes d'irritation respiratoire avec toux et dyspnée [28]. L'exposition prolongée entraîne une paralysie du système nerveux central ainsi que des atteintes rénales et pulmonaires. Cette paralysie peut entraîner la mort. L'intoxication s'accompagne de symptômes tels que : maux de tête, bourdonnements, vertiges, troubles gastriques et intestinaux, étourdissement, collapsus, empoisonnement, perte de conscience, respiration irrégulière, défaillance respiratoire, troubles cardiaques, et parfois convulsions [29]. L'ingestion de 1 g du phénol est mortelle pour l'homme [25,29, 39]. L'agence internationale pour la recherche sur le cancer et l'EPA ont déterminés que le phénol n'est pas classifiable comme cancérigène pour les êtres humains [25,26].

I-1-6-2. Animaux

Après exposition par voie orale et cutanée à des doses d'une toxicité aiguë de phénol, parmi les effets observés chez les animaux de laboratoire il y a la nécrose de la peau ou des muqueuses de la gorge, des tremblements et des convulsions neuromusculaires ainsi que des effets histopathologiques sur le rein, le foie, la rate et le thymus. Il y a aussi des effets hématologiques, la suppression de la réaction immunitaire [27]. Et des effets sur le système nerveux [28].

Le phénol est toxique pour les organismes aquatiques et celles-ci peuvent être en danger dans les eaux de surface ou de mer contaminée avec le phénol [36]. Des concentrations du phénol supérieures à 50 ppb sont toxiques pour certaines formes de vie aquatique [4].

I-1-6-3. Végétaux

Perturbation de la perméabilité passive ; inhibition de la croissance [40].

I-1-7- Normes

Les phénols sont considérés comme des polluants à traiter en priorité à cause de leurs toxicités avérées même à faibles concentrations. A cause de cette toxicité différents phénols

ont été classés comme polluants prioritaires par US EPA (United States of Environmental protection Agency) [25,40]. De même que l'union européenne a limité la concentration maximale tolérée pour les eaux de consommation à $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (0,5 ppb). (Décret exécutif N° 89-3 du 03/01/89) [25, 29, 40,41]. L'agence de protection de l'environnement a établie une norme de purification de l'eau de moins de une partie par billion (1 ppb) de phénol dans les eaux de surface [25,42,43], tandis que les limites des phénols pour les émissions des eaux usées sont de $0,5 \text{mg. L}^{-1}$ (0,5 ppm) [25].

L'Algérie tolère une concentration maximale des phénols de $0,3 \text{mg. L}^{-1}$ pour les rejets industriels (Décret exécutif N° 06-141 du 19/04/2006) [44].

I-2- Traitements des composés phénolés

Le phénol et ses dérivées sont considérés par l'Environmental Protection Agency comme d'importants polluants. Leur élimination des eaux résiduaires, a été envisagée. Les techniques employées (piégeage, transformation, recyclage, dégradation....) vont des procédés physico-chimiques (floculation, précipitation, oxydation,...) aux traitements biologiques [45].

I-2-1. Traitements physico-chimiques

Des nombreuses méthodes traditionnelles ont été utilisées pour éliminer les phénols des eaux usées industrielles. Ces méthodes étant fondées sur des principes chimiques ou physiques [4, 10, 12, 15, 43, 46, 47, 48,49]. Cependant elles impliquent généralement des coûts d'exploitation élevés [4, 10, 12, 15, 43, 46, 47, 50]. et n'éliminent pas le phénol complètement [12, 15, 43, 46]. En outre elles peuvent générer de sous produits polluants, par exemple : les cyanates, phénol chlorinates, les hydrocarbonés...qui sont produites par des procédés chimiques et peuvent être plus toxiques que les composés d'origine [10, 12, 15, 43, 46, 47,50].

A cause de ces inconvénients, nous nous intéressons à la seconde méthode de traitement qui est :

I-2-2. Traitements biologiques

Les traitements microbiologiques sont alternatifs aux procédés physico-chimiques mais qui ont aussi leurs limites (instabilité, inhibition...) [11,12]. D'où le besoin du développement

de méthodes de traitements alternatives qui sont plus rapide, moins chers, et plus simples que les méthodes traditionnelles [13].

Récemment, plusieurs chercheurs ont essayé une approche originale à ce problème, en proposant l'utilisation des enzymes [49].

I-2-2-1. Traitements enzymatiques

Les procédés enzymatiques ont plusieurs avantages par rapport aux traitements biologiques [3, 4, 13, 15] dont : la capacité à traiter une large gamme de concentration de contaminants, de pH, de température, des vitesses de réaction élevées, et une haute spécificité des enzymes pour leur substrats [13, 14, 15].

L'oxydation des phénols par les enzymes à été mise en évidence dès 1980 par Klibanov et al [3, 4, 51]. Les méthodes enzymatiques sont basés sur les enzymes oxydatives telles que : les peroxydases et les phénoloxydases [3, 15, 51, 52]. Les peroxydases ont besoin de peroxyde d'hydrogène comme Co-substrat, ce qui complique le processus et augmente les coûts, ils sont employés commercialement, mais les coûts de ces processus sont élevés [12, 15, 47, 51, 53], les phénols oxydases incluent des laccases et des tyrosinases [13, 15].

Une alternative potentielle à la peroxydase est la tyrosinase (polyphénoloxydase, EC.1.14.18.1) [13, 43, 53], qui catalyse également l'oxydation des phénols mais qui emploie l'oxygène comme oxydant [9, 15, 20, 43, 46, 51, 53]. En raison de la disponibilité de la tyrosinase dans une large variété de sources et la disponibilité de l'oxygène en air ambiant, cette enzyme peut présenter une alternative moins chère aux peroxydases pour le traitement des phénols [9, 15, 20, 51, 53].

Cette enzyme a été proposée la première fois par Atlow et al en 1984 [3, 20], qui a prouvé qu'un certain nombre de composés phénoliques pourraient être enlevés de l'eau sur une large gamme de concentrations, en utilisant la polyphénoloxydase de champignons purifiée ou brute [20].

La tyrosinase catalyse deux réactions bien distinctes en présence de l'oxygène moléculaire :

L'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité monophénolase) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité diphénolase) [4, 15, 43, 46, 47].

Les o-quinones subissent spontanément des polymérisations non-enzymatique donnant naissance à des composés insolubles qui peuvent être enlevés par filtration ou sédimentation [4, 12, 13, 15, 46, 48, 51].

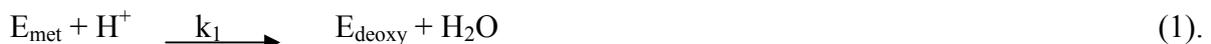
Les préparations commerciales de la tyrosinase sont extrêmement chères, ce qui limite la possibilité de leur utilisation pratique, donc il est avantageux d'employer les préparations fermentatives pareillement teintées [43]. En raison de ces caractéristiques, les tyrosinases ont été étudiées pour l'élimination des phénols des eaux usées. Plusieurs études ont impliquées des tyrosinases de champignons [15], par exemple :

Atlow et al a employé la tyrosinase soluble pour éliminer le phénol à des concentrations initiales variés de 0,01g/l à 1g/l, la conversion du phénol jusqu'à de 99% a été obtenue [3, 4, 13]. Etant donné que l'immobilisation a l'avantage d'augmenter la stabilité enzymatique, beaucoup de chercheurs ont examinés l'efficacité de la tyrosinase immobilisée pour la dégradation du phénol. Wada et al a immobilisée la tyrosinase sur la magnétite et le dianon WK-20, et une conversion pratiquement complète a été obtenue d'une solution de phénol de 0,02g. L⁻¹[4]. Dans cette étude, nous nous sommes intéressé à étudier l'oxydation du phénol par la tyrosinase libre et immobilisée.

I-2-2-2. Mécanisme réactionnels de la catalyse enzymatique

Le cycle catalytique a été étudié par de nombreux auteurs (Wilcox et al, 1985 ; Whitaker, 1994 ; Lerch, 1995 ; Solomon et al, 1996 ; Espinetal, 1998) les études sont le plus souvent réalisées sur la tyrosinase de champignons [54]. Le site actif des tyrosinases peut exister sous trois formes selon la valence de cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire :

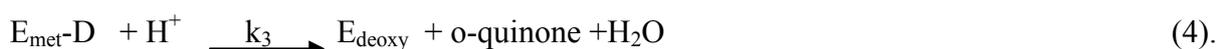
deoxy (CuI-CuI), *oxy* (CuII-O₂-CuII) et *met* (CuII-CuII). La forme *met* est convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy* résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy* [3,55].



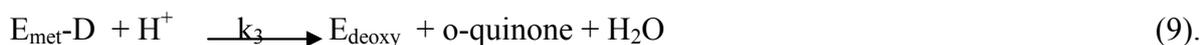
In vivo, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme *met*, incapable de fixer l'oxygène moléculaire [3,55]. Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols catalysée par les tyrosinases suit une cinétique de Michaelis-Menten, tandis que l'hydroxylation des monophénols est caractérisée par une phase de latence [3,55].

Le mécanisme de la tyrosinase agissant sur les monophénols et l'o-diphénols est généralement décrit par deux cycles catalytiques (figure 1), le cycle (B) : phénolase (crésolase) et le cycle (A) diphénolase (catécholase) [55,56].

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



Dans l'activité crésolase, l'O₂ est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du deoxytyrosinase pour donner l'oxytyrosinase dans laquelle l'O₂ a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'oxytyrosinase, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau et l'intermédiaire (o-diphénol) conduisant à la formation de l'O-quinone [16, 17, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67].



Les étapes limitantes dans l'hydroxylation monophénolique pourraient être :

- 1) L'attaque nucléophile du groupement OH en C-4 sur l'ion cuivre du site actif de la tyrosinase ;
- 2) L'attaque électrophile du peroxyde du site actif de l'oxytyrosinase sur le C-3 du substrat monophénolique ;
- 3) L'oxydation du o-diphénol formé à partir du monophénol [68].

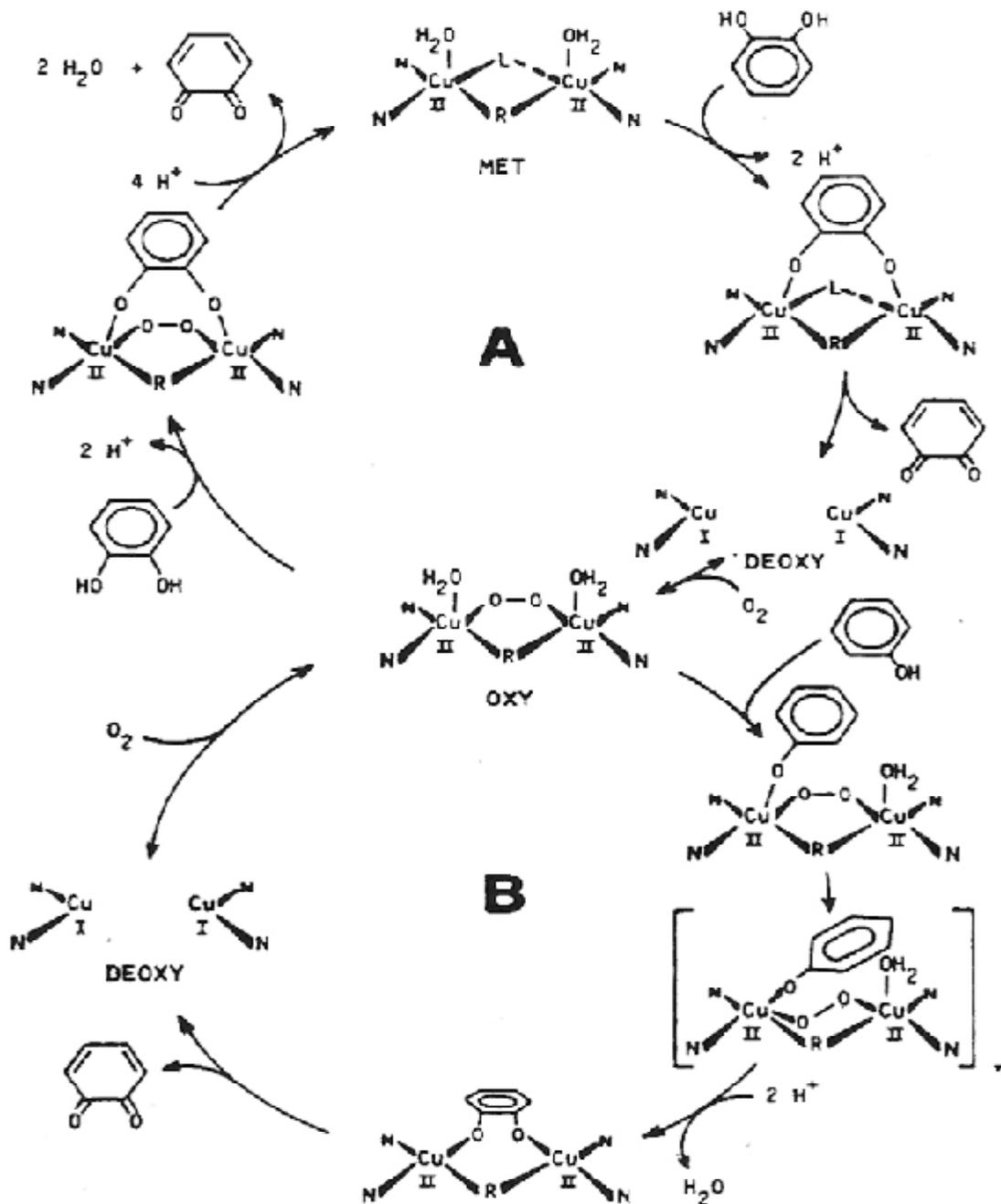


Figure.1: Schéma illustrant le mécanisme réactionnel de l'activité catécholase et crésolase de la tyrosinase de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) [69].

Chapitre II : Tyrosinase

II-1- Historique

La tyrosinase a été découverte en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a observé que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés dans les plantes provoquant ainsi la formation d'un pigment bleu [64, 70].

La polyphénol oxydase a été préparé pour la première fois simultanément par Kubowitz (1938) à partir des pommes de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir d'*Agaricus bisporus* et partiellement purifiée par précipitation. C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité [71].

Depuis sa découverte, elle a fait l'objet de plusieurs sujets de recherches intensifs. Ces recherches ont portés d'une part sur la nature physique et chimique de l'enzyme elle-même et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans la respiration des végétaux inférieurs et supérieures [72].

Bien que la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* ait été découverte et purifiée il y'a bien longtemps [70, 73], c'est tout récemment qu'une image claire de cette enzyme a commencée à émerger [17].

II-2-Définition, nomenclature et classification de la polyphénol oxydase

II-2-1. Définition

Le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animales et humaines, et se rapporte au substrat 'typique', tyrosine qui était le premier substrat expérimental. La polyphénol oxydase est la dénomination générale la plus appropriée, et sera employée sous l'acronyme PPO dans ce présent travail [74,75].

La PPO (EC 1. 14. 18. 1) est une oxygénase aussi bien qu'une oxydase [58], à fonctions mixtes contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre est désigné sous le nom de 'cuivre type 3' se trouve également dans l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine [65, 76,77]. De loin l'oxygénase multi-cuivre le mieux étudiée est la tyrosinase [59].

II-2-2. Nomenclature

Les groupes des polyphénols oxydases comprennent essentiellement deux types d'enzymes : l'O-diphénol oxydase (catéchol oxydase, tyrosinase, phénolase, ou polyphénol oxydase (PPO)) et les p-diphénol oxydase ou laccase. Les deux types d'enzyme sont phénol-oxygène oxydoréductases [65].

Des noms différents ont été associés au polyphénol oxydase dont la tyrosinase, crésolase, catécholase, diphénolase, phénolase, phénol oxydase, O-diphénol oxydase et acide chlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est la polyphénol oxydase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme d'utiliser différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des o-quinones dans les deux cas. Les noms "tyrosinase", "phénol oxydase" et "polyphénolase" sont aussi généralement employés interchangeablement avec 'polyphénol oxydase' [20, 57, 58, 79, 80,81].

II-2-3. Classification

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB) a placé la PPO dans deux catégories principales comme (EC 1. 14. 18. 1) monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase et (EC 1. 10. 3. 2) o-diphénol : O₂ oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme [57,82].

De nos jours, on accepte généralement que la polyphénol oxydase (PPO : monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine : oxygène oxydoréductase ; (EC 1. 14. 18. 1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions bien distinctes en présence d'oxygène moléculaire, à savoir [réaction (1)] l'ortho-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (catéchols) (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des o-diphénols [réaction (2)] en o-quinones, activité fréquemment désignées sous le nom de polyphénol oxydase, o-diphénol oxydase, catéchol oxydase ou activité catécholase [76, 81, 83,84].

Les o-quinones sont des composés fortement réactifs et peuvent subir spontanément en solution aqueuse soit des réactions de polymérisation et de cyclisation non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène noir, brun ou rouge, généralement appelé mélanine soit réagir avec des acides aminés ou des protéines pour produire des composés

colorés [76, 84, 85,86]. Les préparations enzymatiques à partir de plusieurs espèces montrent une ou les deux activités [20,87] selon la figure suivante (Figure2) :

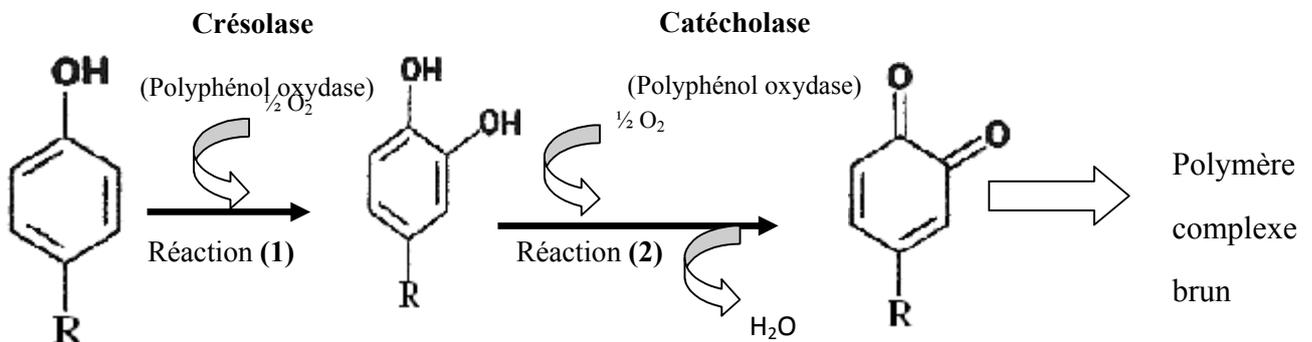


Figure. 2: Schéma de la réaction catalysée par la PPO ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées [20,88].

II-3- Source et localisation de la polyphénol oxydase

II-3-1. Source de la polyphénol oxydase

La PPO est largement distribuée dans la nature. Elle se trouve dans une grande variété d'organismes vivants y compris les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être rencontrée chez les mycètes [20, 64, 89,90].

Un certain nombre de microorganismes peuvent produire la PPO [20]. Les premières PPOs bactériennes ont été purifiées à partir des extraits cellulaires de *Streptomyces nigrifaciens* et *Streptomyces glaucescens*.

Le champignon commun coloré en blanc (*Agaricus bisporus*) est généralement reconnu comme étant la source naturelle majeure de la tyrosinase [91]. La tyrosinase est présente dans la tige, la peau du chapeau, et la chair du chapeau (3). Cette enzyme a été utilisée dans la majorité des études biocatalytiques, puisqu'elle est aisément obtenue en quantité relativement grande [20]. Les meilleures préparations caractérisées sont issues de *Streptomyces glaucescens* et de *Neurospora crassa* et d'*Agaricus bisporus* [59].

Beaucoup de chercheurs sont intéressés par les PPOs isolées à partir de diverse sources telles que la banane[87, 92,93, 94,95], le tubercule de pomme de terre [84, 96,97,98,99, 100],

les épinards [101], l'artichaut [102], les champignons [103,104,,105,106,107,108], la poire[109], le coing [110], la pêche [111], l'abricot [112], les feuilles de tabac [113].

II-3-2. Localisation de la polyphénol oxydase

Les PPOs des plantes supérieures sont principalement liées aux membranes des thylacoïdes de chloroplastes. Elles peuvent également être situées dans des vésicules, des microsomes, peroxysomes, liées aux membranes mitochondriales, ou bien librement solubles dans le cytoplasme [17, 57, 65, 114]. Chez les mammifères, elles sont localisées dans les mélanocytes de la rétine et de la peau [115].

Yamaguchi et *al.* [116] ont constaté que l'activité PPO d'*Agaricus bisporus* est produite dans le chapeau (chair, peau et les ouïes) et dans le pied. Ce dernier contient deux fois plus d'activité par gramme de matière fraîche que le chapeau [77,117]. La PPO d'*Agaricus bisporus* est une enzyme cytosolique soluble [88]. Bonner [118] a montré aussi que la PPO est présentée dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon.

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes peut être considérablement inégale et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble change avec la maturité [119].

En outre, l'activité de la PPO dépend de l'espèce, du cultivar, du développement du fruit, et de l'âge des plantes. L'activité enzymatique change pendant le stockage et peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables dans certains cas [65].

II-4-Rôles biologiques et importance de la polyphénol oxydase dans les fruits et les végétaux

II- 4-1.Rôles biologiques de la polyphénol oxydase

La PPO entre dans la chaîne respiratoire des plantes supérieures en tant qu'oxydase terminale. Elle joue également plusieurs rôles comme moyen de défense chez les plantes supérieures et les actinomycètes grâce à la formation de pigments [65, 119, 120].

Elle pourrait être impliquée dans la photosynthèse, en tant que tampon d'oxygène au niveau des plastides, par piégeage des radicaux libres ou via des effets sur la 'Réaction de Mehler' (phosphorylation pseudocyclique); un système non cyclique de transport d'électrons impliquant l'oxygène au lieu de NADP⁺ comme accepteur terminal [16, 57, 82].

La réaction suivante illustre l'intervention de la PPO dans le tamponnage de l'O₂ [121] :



L'enzyme participe à la résistance des plantes contre les insectes et les microorganismes et, probablement, au climat défavorable [119]. Une explication simplifiée et approximative du rôle de la polyphénol oxydase dans la résistance des plantes aux infections est que les quinones formées par l'action de l'enzyme subissent des réactions secondaires de polymérisation produisant des polymères foncés et insolubles. Les tissus imbibés de ces polymères agissent en tant que barrières contre la propagation des infections [119]. La mélanine et les quinones sont d'ailleurs avérées bactériostatiques [57].

Dans la plupart des fruits et légumes, la PPO est responsable du brunissement enzymatique [62, 64, 88,122]. La diminution de l'activité enzymatique signale que le fruit a atteint une étape de maturité [65]. Elle est impliquée principalement dans divers processus tels que la pigmentation des vertébrés et la sclérotisation de l'exosquelette et le brunissement des fruits et des légumes [62].

La PPO peut induire des modifications des protéines végétales pour les faire des antinutritionnels décourageant les herbivores ou les microbes pathogènes [16].

La réaction d'hydroxylation de l'enzyme joue un rôle dans la biosynthèse des phénols en particulier les phénylpropanoïdes en transformant la tyrosine en DOPA, l'acide p-coumarique en acide caféique, l'acide p-coumarylquinique en acide chlorogénique, ou en insérant un groupement o-dihydroxy dans le cycle B des flavonoïdes. La polyphénol oxydase participe indirectement à la formation de lignine [57, 119, 121].

II-4-2. Importance de la polyphénol oxydase

Deux aspects doivent être considérés à cet égard : la fonction de la PPO dans le tissu végétal pendant sa croissance et son développement. Cette enzyme est d'une grande importance dans le traitement des produits alimentaires.

L'activité PPO détermine la qualité et la couleur d'un produit alimentaire, tels que les graines de cacao, le café et les feuilles de thé. La PPO est utilisée dans le procédé de vinification et agit clairement sur la qualité du vin.

Les produits résultant de l'activité polyphénol oxydase (les quinones) peuvent réagir avec les protéines ce qui pourraient réduire leur digestibilité, leur goût ainsi que leur valeur nutritionnelle [65, 123].

Les technologies alimentaires sont concernées par le phénomène du brunissement enzymatique [119]. Dans certains produits alimentaires, par exemple le raisin sec et le cacao, cette réaction indésirable est nécessaire afin d'induire des propriétés organoleptiques recherchées [88].

II- 5-Extraction de la polyphénol oxydase

La PPO d'*Agaricus bisporus* a été pour la première fois extraite et purifiée par Keilin et Mann (1938) [17].

Plusieurs méthodes d'extraction et de purification de la PPO de champignon de Paris ont été développées, les plus largement utilisées et qui donnent de bon rendement d'activité enzymatique sont celles de : Dawson et Magee [75], gouzi et benmansour [124], Frieden et Ottesen [105], et Nelson et Mason [125].

Trois problèmes doivent être traités avant d'extraire la PPO à partir d'un matériel végétal : (1) la latence, (2) la solubilisation de l'activité liée à la cellule, et (3) la prévention de l'oxydation enzymatique des phénols endogènes qui se polymérisent et provoquant ainsi la précipitation des protéines enzymatiques [119].

La solubilisation et l'activation de la PPO insoluble ou latente peuvent être effectuées grâce à l'utilisation des traitements chimiques aux détergents, tels que le Tween-80[®], le Triton X-100[®] ou le sodium dodecyl sulfate (SDS), ou d'un milieu hypotonique, ou physique par les ultrasons [119,126]. La solubilisation est habituellement réalisée après préparation d'une poudre d'acétone par l'extraction avec des détergents ou d'autres agents [119, 127].

La plus grande difficulté à surmonter pour l'obtention d'une préparation enzymatique soluble consiste à empêcher l'oxydation enzymatique des phénols et la formation des pigments pendant les étapes de broyage et l'extraction de l'enzyme à partir de la matière végétale. Les pigments provoquent la précipitation et l'inactivation irréversible de l'enzyme [119]. Afin de réduire au minimum ces risques, toutes les étapes de morcellement et d'homogénéisation devraient être effectuées à des températures inférieures à 0°C [57, 119]. La précipitation par l'acétone suivie de l'extraction par une solution tampon, est l'une des

méthodes le plus souvent appliquées. Pour mieux protéger le produit d'extraction contre l'oxydation enzymatique des polyphénols, les agents réducteurs, les adsorbants des composés phénoliques et des quinones, aussi bien que les inhibiteurs réversibles de l'enzyme, sont incorporés dans la solution d'extraction. L'acide ascorbique, la cystéine, le métabisulfite de sodium, le DIECA, le saccharose, le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), ou le polyéthylène glycol (PEG) et parfois des mélanges de certains de ces composés, sont employés [20, 119, 128]. L'isolement de la polyphénol oxydase peut être aussi réalisée en présence des inhibiteurs d'enzymes protéolytiques endogènes tels que le phénylméthylsulfonyl (PMSF) [57].

II-6-Caractéristiques réactionnelles et structurales des polyphénols oxydases

La classe des polyphénoloxydases est divisée en deux sous-groupes en fonction du substrat dont elles catalysent l'oxydation :

- hydroxylation en position ortho d'un substrat monophénolique (activité monophénoloxydase, crésolase ou tyrosinase).
- oxydation d'un diphénol en benzoquinone (activité diphénoloxydase, et spécifiquement catécholase lorsqu'il s'agit *o*-diphénol).

Ces deux réactions utilisent l'oxygène moléculaire comme Co- substrat.

II-6-1-les différents sous-groupes de PPO

II-6-1-1-Activité monophénoloxydase(EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons et un peu plus récemment dans la pomme [55].

II-6-1-2-Activité catécholoxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase. Cette dernière a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanoidines comme le montre (la figure 3) et elle montre plus spécifiquement comment l'activité tyrosinase, évoquée précédemment, englobe l'activité monophénoloxydase et catécholoxydase [55].

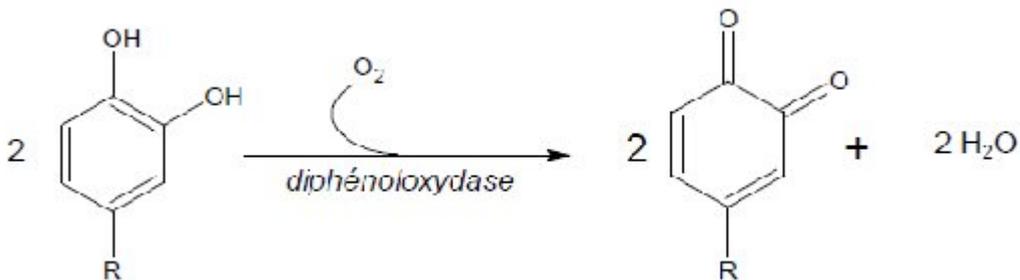


Figure. 3 : Formation des quinones catalysée par la diphénoloxydase en présence d'oxygène [55,56].

II-6-2- Structure, poids moléculaire et site actif de la polyphénol oxydase

II-6-2-1. Structure et poids moléculaire de la polyphénol oxydase

La PPO native d'*Agaricus bisporus* est une métalloenzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire et dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques, et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa, qui diffèrent par leur composition en acides aminés, formant ainsi une structure tétramérique de la forme H_2L_2 ayant un poids moléculaire global apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L demeure inconnue. Ces sous-unités pourraient contribuer à la stabilité ou à l'activité de la préparation d'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa) a la structure H_2L_2 , alors que la forme active de l'enzyme (montrant l'activité crésolase et catécholase) a la composition en sous-unités L_2H . Le poids moléculaire de la sous-unité de base de la polyphénol oxydase

des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa [17, 57, 59, 64, 88, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136].

La structure secondaire de la PPO est principalement α -hélicoïdale. Le cœur de l'enzyme est constitué de quatre paquets spiraux composés d'hélice α : α_2 , α_3 , α_6 et α_7 (figure6). Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire de cuivre et qui est entouré par les hélices, α_1 et α_4 , et de plusieurs coudes β . Dans la PPO d'*Agaricus bisporus*, l'isoleucine est le N-terminal, tandis que la valine est le C-terminal [127].

II-6-2-2. Le site actif de la polyphénol oxydase

Le site actif de la PPO de champignon de Paris contient deux atomes de cuivre, nommées CuA et CuB, très rapprochées avec une distance interatomique de 3,6 Å environ et se caractérisent par une forte interaction magnétique [61]. CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice α_2 , tandis que l'His 109 et His 118 sont au début et au milieu de l'hélice α_3 . Le second cuivre catalytique, le site CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus sont trouvés au milieu des hélices α_6 et α_7 [137]. (figure4 et6). Cette paire de cuivre est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et les substrats phénoliques [88].

Le site actif de la PPO existe sous trois formes physiologique (figure 5) : la forme oxygénée oxytyrosinase (E_{oxy}) [CuII-O₂²⁻-CuII], la forme mettyrosinase (E_{met}) Cu(II), et la forme deoxytyrosinase (E_{deoxy}) Cu(I) [74, 115, 138, 139, 140, 141, 142, 143].

Les deux états *met-* et *oxytyrosinase* permettent l'activité diphénoloxydase, tandis que la réaction monohydroxylase exige l'état oxy [115].

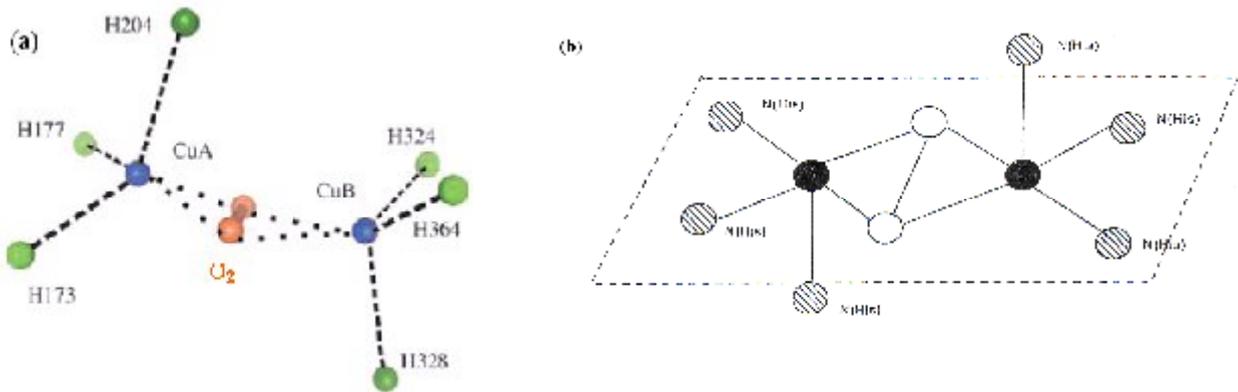


Figure 4 : (a) Le site actif de fixation de l'oxygène des protéines à cuivre [58].

(b) Représentation schématique du centre de cuivre binucléaire. L'oxygène se lie comme peroxyde et chaque ion de Cu est lié à trois atomes d'azote d'histidine.

Les symboles noirs-ions-Cu ; symboles blancs-oxygène ; symboles à tiret hachurés-His-N

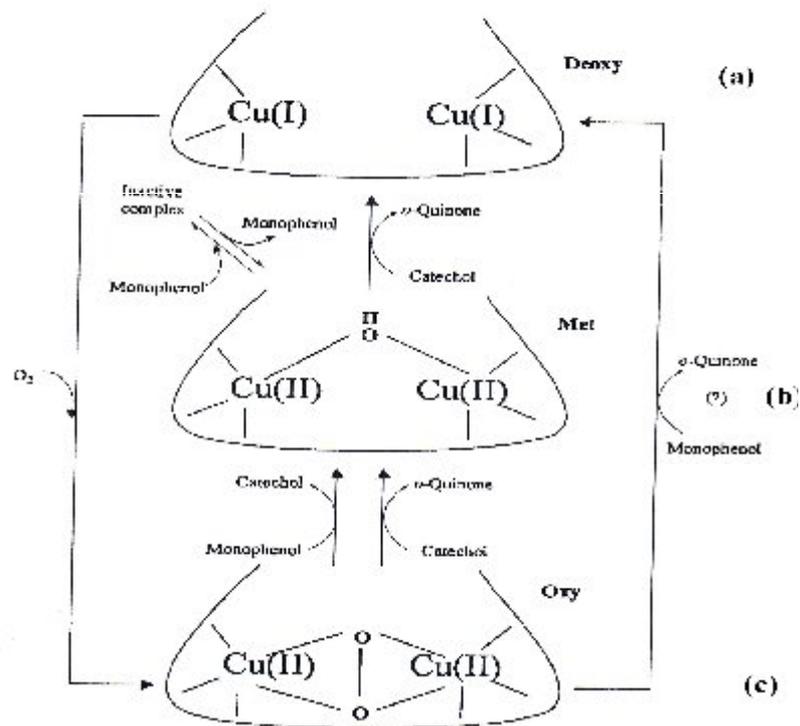


Figure5: Les trois états physiologiques du site actif de la polyphénol oxydase [74]:

- (a) : forme *deoxy* les cuivres sont dans l'état cuivreux ;
- (b) et (c) : formes *met* et *oxy* les cuivres sont dans l'état cuivrique.

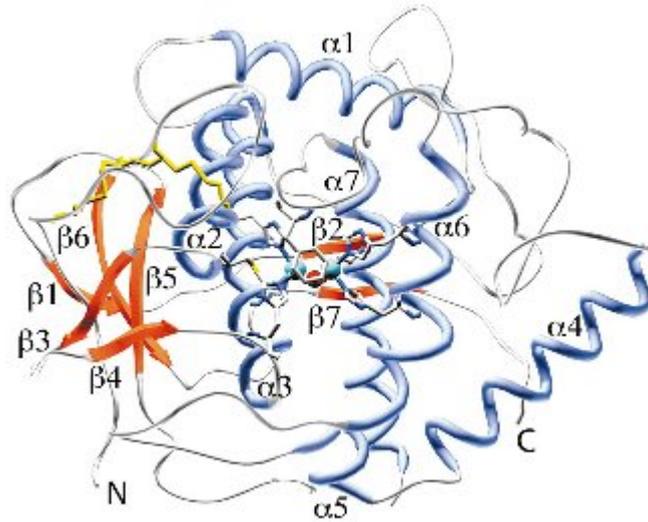


Figure 6: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 KDa (les atomes sont colorés par le type d'atome :

Carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan [143].

II-7- Application de la polyphénol oxydase

Les activités monophénolhydroxylase et diphénoloxydase de la polyphénol oxydase servent de base à beaucoup d'applications industrielles [136, 144].

En technologie environnementale, la PPO est utilisée pour la détoxification des eaux résiduaires et sols contaminés par des polluants environnementaux fortement toxiques représentés par une grande classe des composés phénoliques et polyphénoliques [6, 48, 136, 145, 146, 147, 148].

Cette enzyme est à l'origine du développement des biocapteurs pour la de détection des composés phénoliques [20, 21, 80,85].

Dans l'industrie pharmaceutique elle est utilisée pour la production de la L-dopamine à partir de la L-tyrosine, produit largement utilisé pour le traitement de la maladie de Parkinson [149, 150,151].

Ainsi que pour la détermination de la L-cystéine dans les produits pharmaceutiques, et l'acide ascorbique dans les produits alimentaires et l'acide benzoïque, grâce à leur effet inhibiteur sur l'activité de la polyphénol oxydase [152, 153,154].

Dans un réacteur à système d'écoulement par injection contenant la polyphénol oxydase immobilisée on a employé pour la détermination des catéchols et toute autres catécholamines biologiquement actives dans les liquides biologiques et également pour la détection des phénols dans l'eau [20, 146, 155].

De même, un réacteur pré-colonne contenant la polyphénol oxydase immobilisé a été couplé à un système de chromatographie liquide à haute performance avec une détection par fluorescence, pour la détermination sensible de la L-dopa et de la L-tyrosine dans le sérum [20]. La polyphénol oxydase a été employée dans l'élimination des phénols de l'eau, [6, 20, 48, 145], et en cosmétique et dans les industries alimentaires. Elle est utilisée pour activer les réactions de brunissement oxydantes [127]. Les mélanines synthétiques ont des rôles protecteurs contre les rayonnements (UV, rayon X, rayons gamma). Ce sont des échangeuses cationiques, fixatrices des médicaments, des antioxydants, des agents antiviraux et des immunogènes [57, 156,157]. Aussi La polyphénol oxydase a été employé dans une méthode simple mais précise pour le calibrage d'une électrode à oxygène [20].

Chapitre III : Techniques d'immobilisation des enzymes

Les applications des enzymes libres sont considérablement limitées dans la pratique par le coût élevé des enzymes et leur relative instabilité. En effet, la majorité des enzymes agissent non pas à l'état libre dans le cytoplasme, mais sous formes associées c'est-à-dire macroscopiquement immobilisées, notamment aux constituants membranaires de la cellule ou des organites, c'est-à-dire dans un microenvironnement très sensiblement différent d'une phase aqueuse homogène (figure 7). Donc l'immobilisation puisse être une solution qui nous offre un mode d'action plus suffisant, on parle d'une cinétique hétérogène.

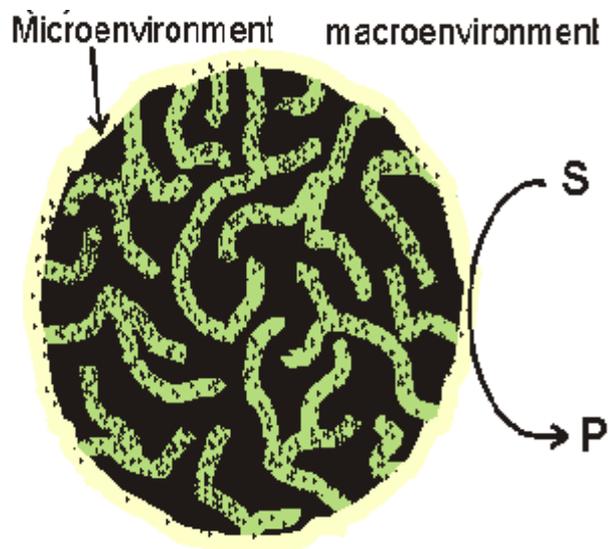


Figure 7 : Notion de micro- et de macroenvironnement [165]

III-1-Définition

La rétention d'enzyme dans une phase insoluble, est plus couramment dénommée immobilisation des enzymes [166]. Donc on peut dire qu'une enzyme est immobilisée lorsque ces molécules sont macroscopiquement confinées pendant un processus catalytique. Une nette stabilisation de l'activité catalytique est constatée après l'immobilisation des enzymes par voie chimique ou physique (suivant que l'enzyme est liée au support de manière covalente ou non) et sur différents supports insolubles résine échangeuse d'ions, polymères synthétiques, charbon actif, verre microporeux, matériaux inorganiques, DEAE cellulose.....etc [167].

Les effets d'immobilisation sur l'activité des enzymes résultent de l'interaction de différents facteurs : [158].

- ✚ Modifications de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, sous l'action des contraintes dues à la fixation ;
- ✚ Modifications du microenvironnement : pH local, interactions électrostatiques.....etc. ;
- ✚ Phénomènes diffusionnels à l'intérieur du complexe ;
- ✚ Encombrement stérique.

Cet ensemble de facteurs va jouer un rôle déterminant sur l'activité et la stabilité de l'enzyme.

III-2-Les méthodes d'immobilisation des enzymes

L'intérêt suscité par les enzymes immobilisées a crû parallèlement au développement de méthodes variées d'immobilisation qui ont été mises au point et décrites au cours des récentes années. Ces méthodes peuvent être regroupées en un tryptique comprenant [166] :

- **Immobilisation par inclusion** [151, 158, 160, 161] : dans le réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère, dans une microcapsule, dans une fibre creuse ou pleine [161, 166]. Cette méthode est basée sur l'inclusion d'une enzyme au sein d'une structure polymère qui permet la diffusion des substrats, mais ne permet pas l'écoulement hors des protéines. Comme il n'y a aucune formation de liaison entre l'enzyme et la matrice, il n'y a pas de perte d'activité due à l'inactivation ou l'encombrement stérique des sites actifs, comme c'est souvent le cas lorsque l'enzyme est lié de façon covalente à un support [158].

Les avantages de cette technique sont les suivantes [158,162]:

- ✚ La simplicité et le faible coût.
- ✚ Possibilité de piéger plus d'une enzyme à n'importe quel niveau de pureté.
- ✚ Une récupération facile et rapide des produits de la réaction.
- **Immobilisation par adsorption** [151, 158, 160, 161] : par l'intermédiaire d'interaction de type secondaire, sur un support organique ou minérale [166]. Les enzymes peuvent être adsorbées sur des matériaux tels que : des échangeurs d'ions, des polymères organiques, des gels de silice...etc. Cette méthode a l'avantage d'être simple et peu coûteuse. L'immobilisation par adsorption est préférable lorsque l'enzyme est sensible

à des modifications chimiques ou encore lorsqu'elle est inactivée par des liaisons covalentes [158].

- **Immobilisation par liaison covalente** [151, 158, 160, 161] : Soit directement entre un groupe chimique de l'enzyme et un groupe réactif d'un support, soit par réticulation à l'aide d'agents polyfonctionnels (éventuellement après inclusion ou adsorption) [166]. L'immobilisation par liaison covalente des polymères activés ou matrices est la méthode d'immobilisation la plus utilisée au laboratoire. Cette méthode a l'avantage de lie solidement l'enzyme à un support polymérique, par l'intermédiaire de liaisons chimiques stables par rapport aux changements de la température, pH, force ionique et concentration du substrat [158].
- **Immobilisation par réticulation avec des agents bi- ou multi fonctionnels** [151, 158, 160, 161] : Une large variété des agents de réticulations ont été proposées pour l'immobilisation des enzymes, mais seulement le glutaraldéhyde est intensivement employé. Les méthodes pour l'immobilisation d'enzymes près ces réactifs peuvent être divisés en deux types :
 - 🔗 Immobilisation, ou plutôt insolubilisation, réalisée par la formation des réticulations intermoléculaires entre les molécules d'enzymes.
 - 🔗 Adsorption de l'enzyme sur un support (polymères naturelles et synthétiques) suivi de la réticulation de l'enzyme adsorbée [158].

Malgré cette division claire, le procédé utilisé dans beaucoup de cas exige une combinaison de deux méthodes ou plus telles que l'adsorption de l'enzyme sur un support approprié suivi de la réticulation intermoléculaire [158].

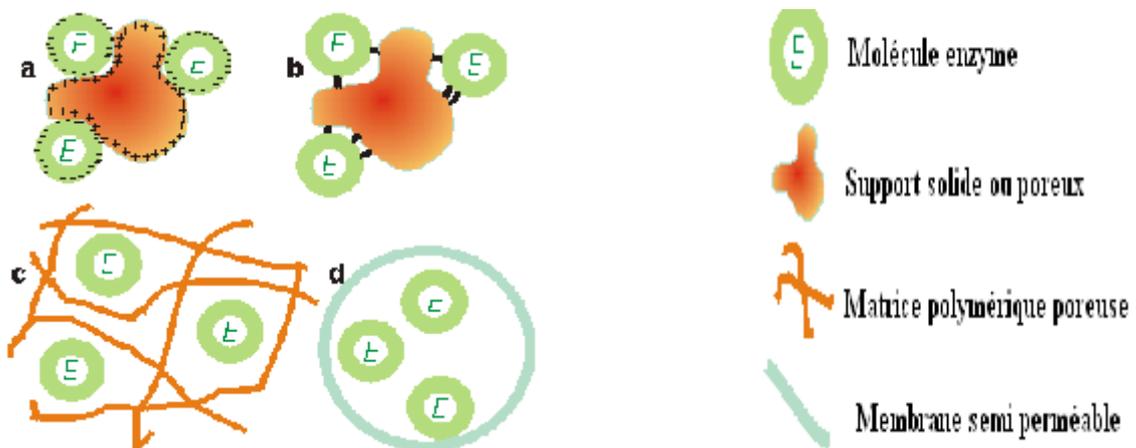


Figure 8 : Méthodes d'immobilisation. (a) enzyme non-covalent adsorbée à une particule insoluble ; (b) enzyme en covalence attachée à une particule insoluble ; (c) enzyme enfermée dans une particule insoluble par un polymère réticulé ; (d) enzyme confinée dans une membrane semi-perméable [165].

III.3. Choix de la méthode d'immobilisation

Le tableau suivant représente une brève comparaison entre les techniques d'immobilisation :

Tableau 1 : Comparaison entre les différentes techniques d'immobilisation [165].

Caractéristiques	Adsorption	Liaisons covalentes	inclusion	Encapsulation
Réalisation	facile	difficile	difficile	facile
Coût	faible	élevé	moyen	élevé
Energie de liaison	variable	forte	faible	forte
Fuite d'enzyme	oui	non	oui	non
Utilisation	large	sélectif	large	très large
Problèmes d'exécution	élevés	faibles	élevés	élevés
Effets de matrice	oui	oui	oui	non
Importantes barrières diffusionnelles	non	non	oui	oui
Protection microbienne	non	non	oui	oui

D'après ce tableau, nous pouvons opter pour l'utilisation d'une méthode d'immobilisation ou une autre, et cela suivant les caractéristiques techniques et économiques qui nous intéressent. Beaucoup de facteurs doivent être pris en considération dans le choix de la méthode d'immobilisation. Parmi ceux-ci, on peut citer :

- 🔧 La nature chimique de la réaction catalysée ;
- 🔧 Le coût et la stabilité des réactifs et du biocatalyseur mis en jeu ;
- 🔧 L'influence des traitements nécessaires à l'immobilisation sur l'activité et la stabilité de l'enzyme ;
- 🔧 Le rendement et le degré de pureté voulus.

Donc, il faut trouver un compromis entre toutes ces contraintes. Nous pouvons dire que l'immobilisation par inclusion apparaît comme une solution convenable par son coût, sa stabilité ainsi que sa facilité de réalisation c'est ce qui fait qu'elle est communément utilisée.

III.4.L'immobilisation par inclusion des enzymes dans l'alginate de calcium

III.4.1.technique d'inclusion des enzymes :

III.4.1.1.Définition de l'inclusion des enzymes :

Il s'agit de la méthode la plus utilisée aujourd'hui [159, 162, 168]. Cette méthode consiste à retenir physiquement une enzyme enfermée à l'intérieur d'une matrice (gel, fibre ou microcapsule) d'une manière purement physique ; l'enzyme est répartie dans une solution du monomère ou dans une émulsion. La polymérisation du monomère ou sa prise en masse conduit à la formation d'un réseau au sein duquel l'enzyme est emprisonnée [169].

Généralement, les gels d'alginate et carraghénates sont les produits les couramment employés pour l'immobilisation des enzymes par inclusion [170]. L'alginate est le copolymère le plus utilisé car c'est un polymère anionique, léger et non toxique [111, 162, 163].

III.4.1.2.Procédé d'inclusion dans l'alginate

La solution enzymatique est mélangée à une solution d'alginate de sodium, l'enzyme solubilisée est ensuite polymérisée en présence d'un ou plusieurs agents de réticulation. Le mélange est dispersé à travers un orifice (seringue) goutte à goutte dans une solution saline telle que le chlorure de calcium (CaCl_2) (dispersion par extrusion) afin d'obtenir des billes de gel présentant de bonnes propriétés mécaniques et dans lesquelles l'enzyme est retenue (figure 10).

Le diamètre des gouttes formées par extrusion simple par gravité est toujours supérieur au millimètre même avec des aiguilles très fines dont la taille s'échelonne entre 2 et 4000 μm [166, 171]. La taille des mailles du réseau dépend du pourcentage d'alginate [169, 172].

Le gel est néanmoins fragile car un complexant (EDTA) ou même la présence d'ions phosphates suffit pour le dissocier [173].

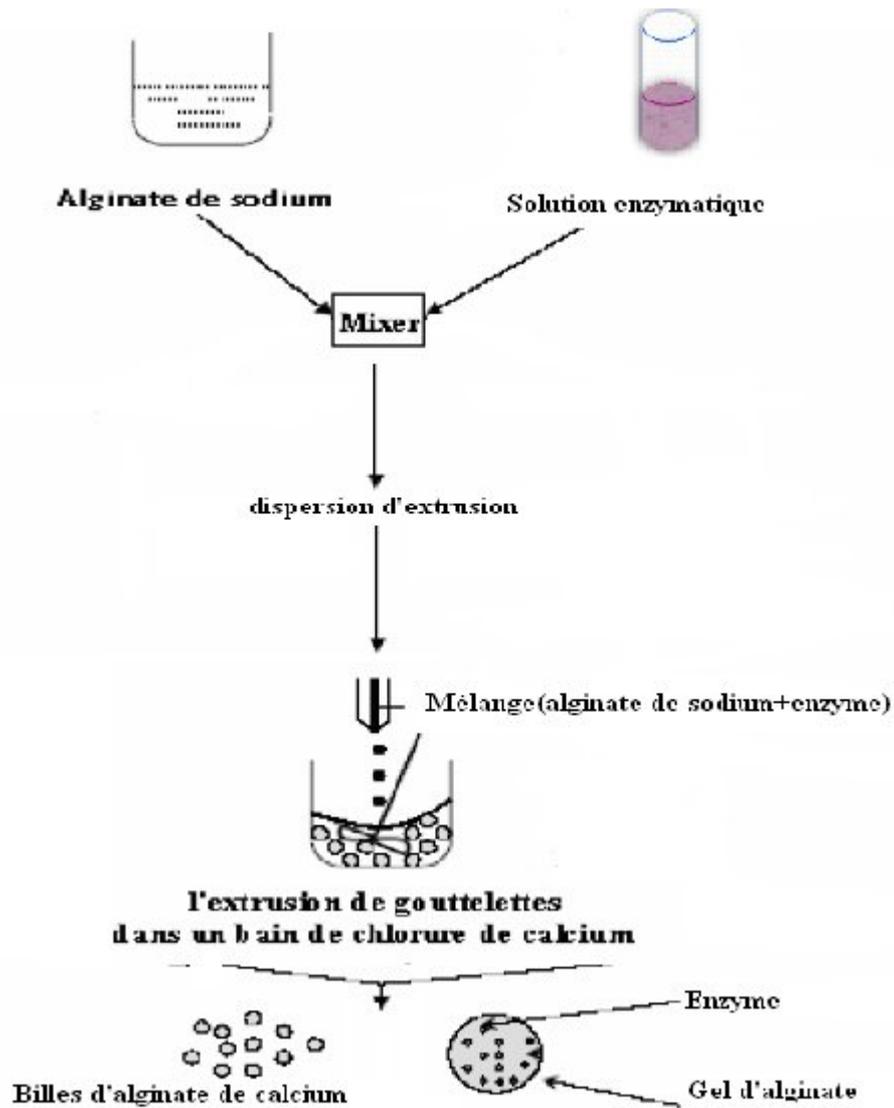


Figure 9 : Procédé d'inclusion des enzymes dans l'alginat de calcium

Bille : système matriciel

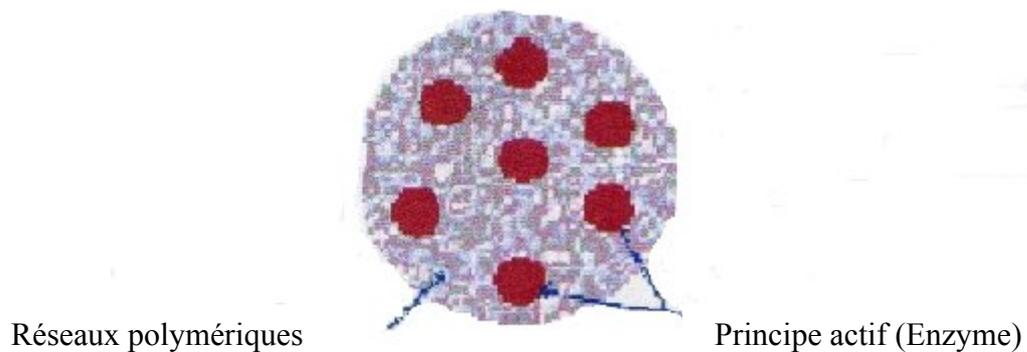


Figure 10 : Structure d'une bille d'alginat [171].

III.5. L'alginate

III.5.1. Origine

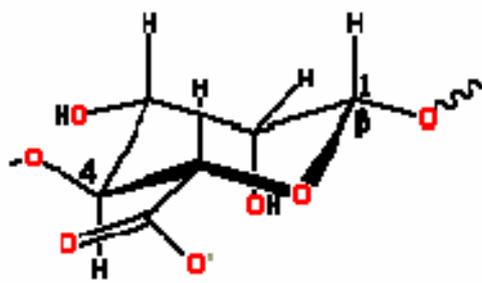
L'alginate a été obtenu pour la première fois au Royaume-Uni par Stanford en 1880 [171, 174]. Grâce à une extraction alcaline à partir des algues brunes [35, 162, 171, 174]. Les algues constituent toujours la matière première pour l'obtention de l'alginate aujourd'hui ; il s'agit surtout des espèces suivantes : *Laminaria digitata* ; *Fucus serratus* [171, 174].

III.5.2. Structure

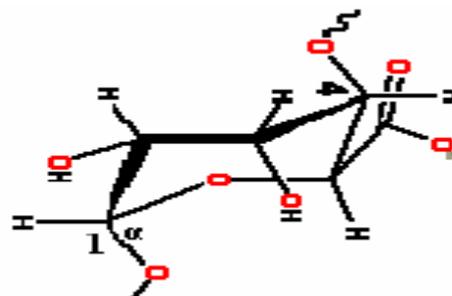
L'alginate est un polysaccharide linéaire fortement anionique [173] ; C'est également un polyuronide, constitué d'un enchaînement de deux acides uroniques : l'acide β -D-mannuronique et l'acide α -L-guluronique (Figure 11); la liaison entre les monomères est de type : β -(1 \rightarrow 4) [35, 163, 171, 175].

Il existe trois types d'enchaînements différents (figure 12) :

- 🔗 L'enchaînement G-G-G (blocs homogènes d'acides guluroniques) ;
- 🔗 L'enchaînement M-M-M (blocs homogènes d'acides mannuroniques) ;
- 🔗 L'enchaînement M-G-M (blocs hétérogènes des deux acides) ;



Acide β -D-mannuronique (M)



Acide α -L-guluronique (G)

Figure 11 : Représentation de l' Acide β -D-mannuronique (M) Et l' Acide α -L-guluronique (G) [164]

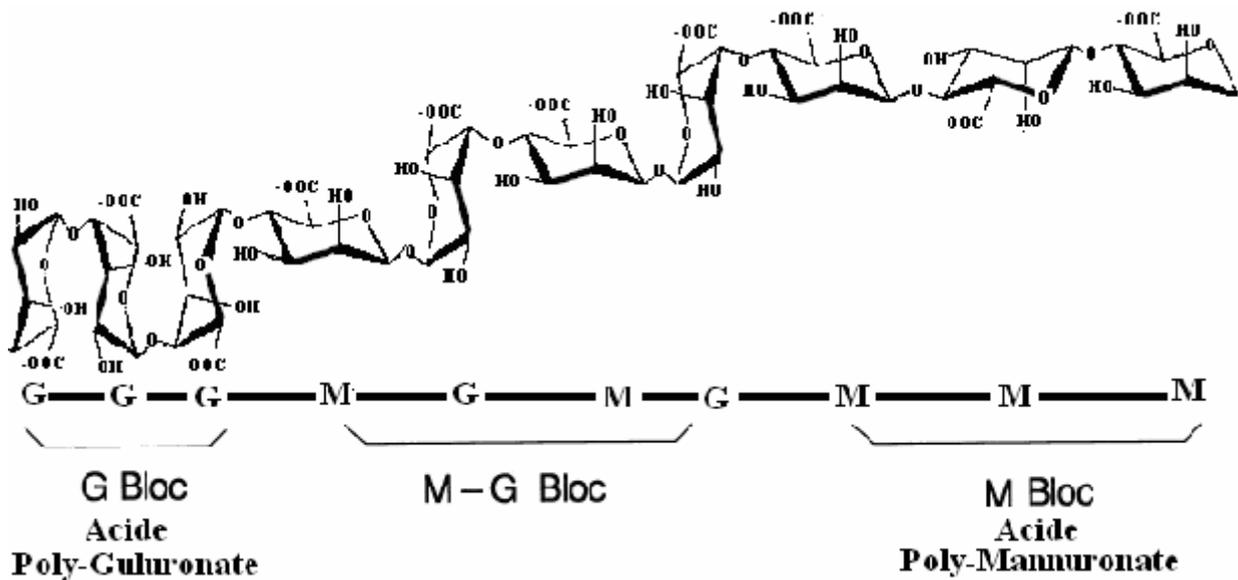


Figure 12 : Structure chimique des Alginate : Conformations du poly G-Blocs (à gauche), poly M-Blocs (à droite) et blocs mixtes MG (au centre) [164]

III.5.3.Obtention de l'alginate

On obtient l'alginate par la transformation d'algues brunes. Ces dernières subissent quatre étapes [171] :

- 🧪 Déminéralisation ;
- 🧪 Extraction de l'alginate ;
- 🧪 Coagulation du colloïde ;
- 🧪 Neutralisation ;

III.5.4.Propriétés des alginates

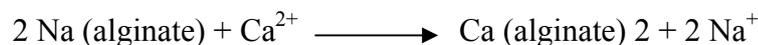
Les alginates des métaux alcalins sont solubles dans l'eau. Ils sont essentiellement utilisés comme viscosifiants ou comme gélifiants dans l'industrie alimentaire [174].

Il est possible d'obtenir des solutions d'alginate plus ou moins visqueuses en jouant sur le degré de polymérisation et la composition en acides uroniques. Les alginates riches en blocs guloniques conduisent à des gels rigides et cassants, tandis que les alginates riches en blocs mannuroniques conduisent à des gels de texture souple [171].

L'addition progressive et limitée d'ions Ca^{2+} (calcium) et H^+ à une solution d'alginate alcaline permet d'obtenir des gels non thermostables.

L'alginate a une forte affinité pour les cations divalents comme le calcium [159, 177]. Cette propriété augmente quand la proportion en acide guluronique augmente : les segments guluroniques à conformation plissée retiennent par coordination les ions calcium, en coopération avec une chaîne parallèle, il se forme un réseau tridimensionnel [35, 162, 176].

Le processus de gélification est simplement l'échange des ions sodium par les ions calcium dans les conditions relativement douces [178] ; après 10 mn de l'ajout de l'alginate de sodium à la solution de chlorure de calcium (CaCl_2) [35] :



III.6. Avantages de la méthode d'immobilisation des enzymes par inclusion

En général l'immobilisation des enzymes a plusieurs avantages :

- Protection des enzymes contre les conditions physiques et chimiques extérieures comme (le pH, la température, ou la concentration ionique) [24, 160].
- des enzymes immobilisées peuvent plus facilement être séparées des substrats et des produits de réaction et être employées à plusieurs reprises et sans interruption [2, 24, 151, 160, 163] ; de ce fait simplifiant la manœuvre et empêchant la contamination de protéine de produit finale [163].
- La réduction de l'usage des enzymes, car une fois l'enzyme est immobilisée, elle peut être utilisée pour une période plus longue que pour l'enzyme libre ;
- L'enzyme immobilisée peut conduire à des processus en continu à lit fixe ou bien à lit fluidisé ;
- Il est possible d'utiliser des doses d'enzyme plus élevées par un volume de réacteur que pour un processus d'enzyme libre, cela contribue à des taux de réaction élevés et par conséquent des réacteurs de tailles plus petites ;

Ces avantages techniques permettent une réduction des coûts de processus, lorsque la demi-vie de l'enzyme immobilisée est suffisamment longue [179].

En particulier, l'inclusion de l'enzyme dans une matrice est généralement avantageuse parce que l'immobilisation ne met pas en jeu des liaisons covalentes entre la matrice et l'enzyme [180].

Les réactions de polymérisation et de gélification sont bien maîtrisées et leurs mécanismes sont connus [166].

La réaction chimique avec l'enzyme est limitée. L'inclusion dans le gel naturel est applicable à toutes les enzymes et permet l'obtention de supports de formes adaptables (films, billes, fibres) [181]. Il est également possible d'immobiliser simultanément plusieurs enzymes dans la même matrice [182].

L'inclusion permet d'immobiliser en une seule étape la totalité de la masse d'enzyme [166].

III.7. Inconvénients de la méthode des enzymes par inclusion

Le réseau formé est presque toujours trop lâche pour retenir complètement l'enzyme, les fuites peuvent cependant être évitées par une coréticulation.

Il y a des problèmes de transfert de masse (inaccessibilité de certains substrats) et des risques de fuite d'enzymes [181].

L'enzyme peut migrer vers l'extérieur du gel si les pores sont trop grands [169].

Certaines polymérisations font appel à des agents dénaturants ou à des radicaux [166].

Il y a une résistance diffusionnelle imposée au substrat lors de son passage dans les pores du support [183]. Aux phénomènes diffusionnels, viennent s'ajouter également les problèmes d'encombrement stérique, limitant l'efficacité de la catalyse [166, 182].

Les propriétés mécaniques des gels sont souvent mauvaises, du moins insuffisantes pour envisager une utilisation en réacteur à lit fixe de taille importante [166].

III.8. Application de la PPO immobilisée

Depuis L'inactivation de la tyrosinase a été considérée être associée à l'attachement d'o-quinone sur le résidu d'acide aminé dans la proximité du site actif de l'enzyme, la tyrosinase a été immobilisée sur plusieurs supports afin d'améliorer la stabilité pour le stockage, et la réutilisation de l'enzyme [3].

Des PPO_s qui sont isolées de diverses sources ont été immobilisées sur différents supports tels que : zéolite, sépiolite, bentonite, chitine, etc... Une partie de ces PPO immobilisées a été employée pour lutter contre la pollution dans l'eau, pour enlever et transformer les composés toxiques du processus industriel et pour déterminer le catéchol et d'autres catécholamines biologiquement actives dans les liquides biologiques en tant que biodétecteur enzymatique [146].

Dans les industries pharmaceutiques pour la production de la L-dopa à partir de la L-tyrosine qui est largement utilisée pour le traitement de la maladie de Parkinson [149, 150, 151]. Dans un réacteur à système d'écoulement par injection contenant la polyphénol oxydase immobilisée on a employé pour la détermination des catéchols et toute autres catécholamines biologiquement actives dans les liquides biologiques et également pour la détection des phénols dans l'eau [20, 146, 155].

Il existe une multitude d'articles qui étudient les traitements enzymatiques par les PPO immobilisées dont nous pouvons citer en exemples :

Palmieri et al ; réalisés en 1994 ont étudié un nouveau procédé pour l'immobilisation de la PPO par inclusion dans le gel d'alginate de cuivre. Les propriétés mécaniques du gel d'alginate de cuivre ont été caractérisées et comparées à celle de l'alginate de calcium couramment employé. Les résultats indiquent une utilisation potentielle de ce système pour la construction des bioréacteurs servant dans la désintoxication des eaux usées polluées. [160].

Crecchio et al ; en 1995 ont examiné les possibilités de deux enzymes immobilisées en gels organiques (laccase de *Trametes versicolor* et une tyrosinase de champignon). Pour enlever les composés aromatiques naturels et xenobiotique des solutions aqueuses. Et déterminés un modèle pour la réutilisation du catalyseur immobilisé dans un système de colonne en soulignant la possibilité de détoxifier des eaux polluées [1].

Alikhan et al en 2006 ; ont conclu que PPOs de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) attachée de Celite PPO étaient efficace pour la décoloration /élimination des mélanges des colorants industriellement importants. Ainsi, PPOs pourraient être des outils efficaces pour le traitement des effluents industriels contenant plusieurs genres de polluants organiques même s'ils sont présents dans les compositions complexes [24].

Ensuncho et al ; en 2005 ont étudié l'immobilisation de la tyrosinase dans l'alginate de chitosane pour le traitement des eaux usées. La matrice a montré de bonnes propriétés d'adsorption, et l'enzyme à une bonne réactivité. [9].

Shao et al ; en 2007 ; ont étudié le traitement des solutions du phénol par la PPO immobilisé par réticulation dans le gel chitosane-SiO₂. L'efficacité d'éliminer le phénol (10 mg phenol/l) par la PPO immobilisé était 86%, et une efficacité d'élimination environ de 60% a été maintenue après cinq réutilisation [2].

Alors qu'en 2008 ; ils ont étudié l'élimination du phénol par La PPO l'immobilisée sur alginate-SiO₂ du gel hybride. L'enzyme immobilisée a pu facilement être séparé de la solution de réaction et être réutilisé. Après répétition de cinq fois, l'efficacité de l'élimination du phénol a diminué à 68.9% Les résultats ont confirmé que la stabilité l'enzyme immobilisée était bonne, et la réutilisation de l'ALG-SiO₂/PPO était meilleur que celui d'ALG/PPO [11].

Chapitre IV : Cinétique Enzymatique

IV.1. Principes de base de la cinétique enzymatique

IV.1.1.Définition : L'étude de la cinétique enzymatique regroupe un ensemble de méthodes qui donnent les premiers outils dans la compréhension du fonctionnement des enzymes. Elle se propose d'établir des relations entre la vitesse de la réaction et les concentrations en substrats ou en inhibiteurs ainsi que de quantifier l'influence de certains paramètres tels que le pH, la température et effecteurs.

En 1888 le chimiste suédois Savante Arrhenius a proposé une théorie pour expliquer l'action catalytique des enzymes. Il a proposé que le substrat et l'enzyme forme une certaine substance intermédiaire qui est connue comme le complexe enzymes-substrat. Le modèle de base de la cinétique enzymatique s'écrit ainsi :



Où E est l'enzyme, S le substrat, P le produit de la réaction et les K_i sont les constantes de vitesse des réactions élémentaires [184].

La catalyse est homogène si le catalyseur fait partie de la même phase que les systèmes réactionnels. et dans le cas contraire on parle de la catalyse hétérogène.

IV.1.2.Méthodes de détermination de l'activité enzymatique :

L'activité de la polyphénol oxydase peut être déterminée en mesurant la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit. Avec l'une ou l'autre méthode, il est nécessaire de limiter la mesure à la phase initiale de la réaction, en effet l'inactivation de la réaction de l'enzyme ralentit cependant l'oxydation de l'o-dihydroxy phénol [119]. On détermine la vitesse de disparition du substrat, généralement l'absorption de l'O₂. Elle est mesurée par la technique de Warburg ou par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène [65, 119].

La vitesse de formation de produit peut être déterminée par méthode spectrophotométrique en mesurant la densité optique des composés colorés formés à partir des quinones, cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la PPO [57, 119].

IV.1.2.1. Les phases de la réaction enzymatique

Au moment où l'enzyme et le substrat sont mélangés, la vitesse de la réaction est nulle. Puis elle augmente généralement rapidement à une valeur maximale et reste constante pendant une période de temps. Durant cette période, la vitesse de réaction ne dépend que de la concentration de l'enzyme et elle est totalement indépendante de la concentration du substrat, elle est similaire à une cinétique d'ordre zéro. Enfin, dans une dernière phase, le substrat est consommé, la vitesse de réaction est diminuée et entre dans une phase du premier ordre et elle dépend de la concentration du substrat [185]. Comme nous pouvons le voir sur le graphe ci-dessous (figure 13) qui décompose la cinétique enzymatique en quatre phases distinctes : [193].

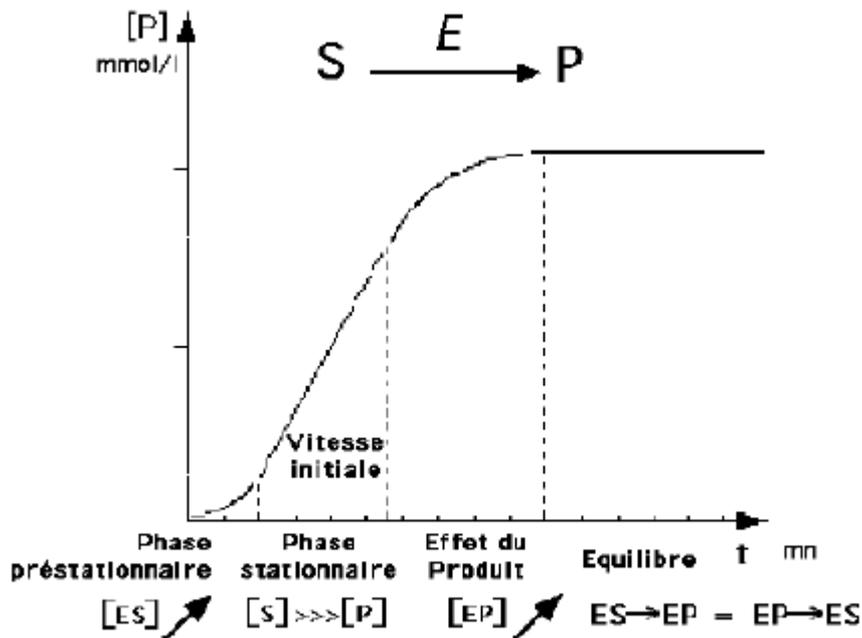


Figure 13 : Les phases de la réaction enzymatique [193].

Revenons à notre échelle, en mesurant la concentration du produit P en fonction du temps. Dans un milieu où il n'y a au temps 0 que des molécules de l'enzyme et du substrat, la réaction se déroule de façon non uniforme.

- **Phase préstationnaire** : On distingue une première phase très brève, au cours de laquelle la vitesse de la réaction est croissante. Durant cette phase, les molécules de substrat se lient avec l'enzyme : la concentration du complexe enzyme-substrat augmente.
- **Phase stationnaire** : Lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont occupées par des molécules du substrat la vitesse de la réaction est maximum et reste constante tant que la concentration du substrat est grande et celle du produit petite. C'est ce qu'on observe lors des premières mesures.
- **Effet du produit** : Lorsque la concentration du produit augmente, la réaction inverse commence à concurrencer celle qu'on mesurait : la vitesse diminue.
- **Phase d'équilibre** : Enfin dans une dernière phase, tardive, la vitesse de la transformation inverse devient égale à celle de départ : les concentrations ne changent plus, on est à l'équilibre.

IV.1.2.2. Mesure de la vitesse initiale :

La vitesse de réaction enzymatique au cours de la phase d'ordre -zéro (phase stationnaire) est déterminée par la mesure de la quantité du produit formé pendant une période d'incubation fixée où la vitesse reste constante (Figure 14). La mesure des vitesses de réaction à toute partie de la deuxième phase (stationnaire) donne des résultats qui sont identiques à la vraie «vitesse initial», [185]. En ignorant la phase transitoire (phase de latence) qui la précède. Elle est aussi appelée «steady state», car la concentration du complexe enzyme-substrat ne change pas [184].

La vitesse initiale est déterminée à partir de la partie linéaire de la courbe « absorbance en fonction du temps » après la phase de latence [124,186].

À partir de la courbe c, les résultats corrects sont obtenus que si le taux est mesuré le long de Segment II. Résultats incorrects sont obtenus si la vitesse est mesurée pendant la phase de latence (I) ou lors de la phase III [185].

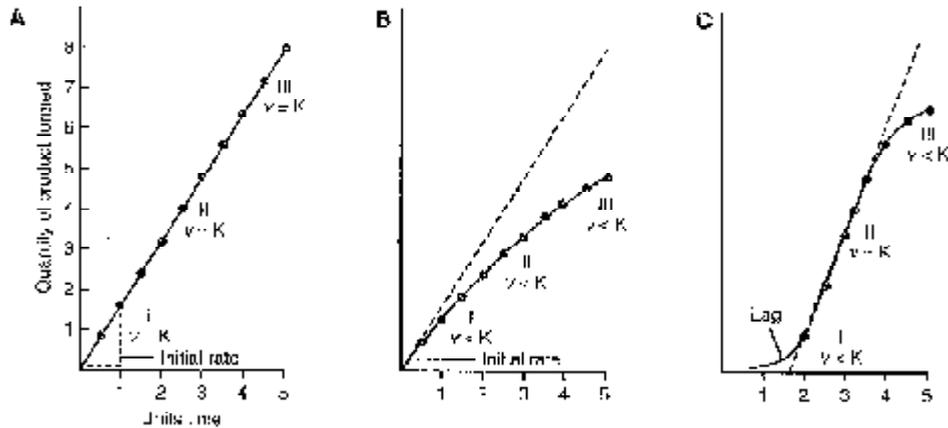


Figure 14 : formes de graphes montrant la variation de la vitesse de réaction enzymatique en fonction du temps. En A, la vitesse est constante, et les vitesses calculées en I, II et III sont identiques à la vitesse initiale. En B, la vitesse diminue en continu, et les vitesses calculés en I, II et III sont différents et inférieur la vitesse initiale vrai. En C, une mesure II sera représentante de la vitesse maximale, mais à I (période de latence) et III), elle sera inférieure à II.

IV.1.2.3.Effets des paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique :

De nombreux facteurs peuvent modifier l'environnement de la réaction et donc la vitesse d'une réaction enzymatique. On distingue les facteurs physiques (T^0 , pH) d'une part et les facteurs chimiques (concentration du substrat et concentration d'enzyme) d'une autre part.

IV.1.2.3.1.Effet de la température :

Comme n'importe quelle réaction chimique ; la catalyse enzymatique est sensible aux variations de la température. Deux phénomènes résultent de l'action de la température :

- L'activation des réactions chimiques par la chaleur ;
- La dénaturation des protéines par la chaleur et donc une baisse de l'activité catalytique [168].

La compétition entre ces deux phénomènes se traduit par l'existence d'une température optimale [187].

L'effet de la température sur l'activité des phénolases n'a pas été étudié intensivement que l'effet du pH [119]. D'après Lehninger [188], La température optimale déterminée expérimentalement dépend de la durée d'analyse parce que la dénaturation d'une enzyme dépend de la température et du temps d'incubation de l'enzyme [189].

IV.1.2.3.1. Effet du pH

L'activité enzymatique est très dépendance du pH. Ceci s'explique par le rôle de la distribution des charges sur la molécule d'enzyme lors de la fixation au substrat et lors du mécanisme catalytique [183]. Le substrat peut aussi, subir une modification de son degré d'ionisation, ce qui peut permettre ou au contraire empêcher la formation du complexe enzyme-substrat [182].

Le pH optimum change avec la source d'enzyme et dépend également du substrat phénolique choisi pour l'analyse, mais il peut également être affecté par le type du tampon et la pureté de l'enzyme; la forme d'isoenzyme, l'espèce végétale (genre et le cultivar) ; l'origine du matériel, la méthode d'extraction, et de la maturité du fruit [57, 109, 119].

En général, la plupart des PPOs des végétaux possèdent un maximum d'activité à partir du pH neutre ou juste après, c'est-à-dire, à pH 7 ou après [20, 109].

IV.1.2.3.1.Effet de la concentration du substrat

La vitesse initiale de la réaction enzymatique augmente d'abord avec l'augmentation de la concentration du substrat ; mais aux fortes concentrations la vitesse de réaction décroît progressivement au lieu d'approcher V_{max} , il y a inhibition anticompetitive par excès de substrat [190]. Ce type d'inhibition est fréquent avec la tyrosinase. Cette inhibition est due au mauvais positionnement du substrat. A forte concentration, la probabilité que plusieurs molécules du substrat se fixent sur le site actif devient très élevée, empêchant alors la catalyse [165, 168, 172].

IV.1.2.3.1.Effet de la concentration d'enzyme

La vitesse initiale de la réaction est souvent supposée directement proportionnelle à la concentration d'enzyme. Bien que ceci soit vrai dans la plupart des cas ou $[S] \ll [E]$, si l'on porte la vitesse de la réaction en fonction de la teneur en enzyme, on obtient soit une réponse linéaire, soit une courbe tournée vers le haut ou vers le bas [183]. Il est possible de porter sur un graphique la vitesse initiale en fonction de la concentration totale en enzyme ; on obtient alors une droite qui possède d'importantes applications pratiques car elle permet d'estimer les concentrations relatives d'une enzyme donnée dans des extraits cellulaires sans qu'il soit nécessaire d'effectuer une purification totale de l'enzyme [182].

IV.1.3. Modèles mathématiques de la cinétique enzymatique

Des méthodes graphiques sont données pour l'interprétation des données cinétiques des réactions enzymatiques et d'obtention des constantes caractéristiques d'enzyme-substrat et d'inhibition des enzymes. Des équations cinétiques non-linéaires sont transposées dans une forme qui donne des graphiques linéaires qui peuvent être aisément extrapolés pour rapporter les constantes [191].

IV.1.3.1. Modèle de Michaelis-Menten

Pour décrire la dépendance de la vitesse de réaction de la concentration d'enzyme dans des conditions où le substrat est présent en excès, la formation d'un complexe ES explique également la relation hyperbolique entre la vitesse de réaction et la concentration du substrat [185]. comme il est décrit dans l'équation de Michaelis-Menten, 1913 [182, 185, 191, 192, 193].

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Avec : V_{\max} : Vitesse maximale de la réaction, qu'on peut atteindre lorsque toutes les sites actifs d'enzymes sont occupés par des molécules de substrat (**mM / mn**).

V : Vitesse initiale de la réaction (**mM / mn**).

$[S]$: Concentration en substrat (**mM**).

K_m : Constante de Michaelis (**mM**). (La concentration du substrat est égale à K_m lorsque

$V = \frac{V_{\max}}{2}$; elle représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat).

A des faibles concentrations en substrat, la vitesse de la réaction est similaire à une cinétique du premier ordre ($K_m \gg S$, à des fortes concentrations en substrat, elle suit une cinétique d'ordre zéro ($K_m \ll S$) [185, 192].

La représentation de Lineweaver-Burk(1934), ou bien en double inverse est une transformation apportée à l'équation de Michaelis-Menten pour donner une représentation linéaire en $\frac{1}{V_0}$ et $\frac{1}{S}$. Elle est la plus utilisée [185, 191].

$$\boxed{1/V_0 = 1/V_{\max} + (K_m/V_{\max})(1/S)} \quad (2)$$

Et donc le tracé de la droite $\frac{1}{V_0}$ en fonction de $\frac{1}{S}$ nous permet d'avoir V_{\max} et K_m

respectivement à partir de l'ordonnée à l'origine et la pente.

Quand le substrat inhibe sa propre biodégradation, le modèle original de Michaelis-Menten devient insuffisant. Dans ce cas, des modèles dérivés de celui de Michaelis-Menten qui apportent une correction pour l'inhibition par le substrat ou d'autre modèle qui se distingue de ce dernier, peuvent être utilisés pour décrire la cinétique enzymatique.

IV.1.3.2. Modèle de Briggs-Haldane

Parmi les modèles les plus pertinents, l'équation de Haldane établie en 1925, est largement utilisée pour décrire la cinétique enzymatique en présence d'inhibition par le substrat, elle est représentée par l'équation suivante : [191].

$$\boxed{V_0 = V_{\max}(S)/((S) + K_m + (S)^n / K_s)} \quad (3)$$

K_s : représente la constante d'inhibition (**mM**).

Hans (1932) a multiplié les deux membres de l'équation de Haldane par S pour donner une représentation linéaire $\frac{S}{V_0}$ en fonction de S. Une transformation a été rapportée à l'équation de Hans pour tenir compte de l'effet inhibiteur par excès de substrat. On aura donc l'équation suivante : [194].

$$\boxed{(S)/V_0 = K_m/V_{\max} + (1/V_{\max})((S) + (S)^n / K_s)} \quad (4)$$

Le tracé de la droite $\frac{S}{V_0}$ en fonction de la concentration du substrat S, nous permet de déterminer les paramètres cinétiques théoriques (K_m , K_s , V_{\max}) et nous donne le résultat le plus précis dans la plupart des cas.

Matériels et méthodes

I- Matériels

-Le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) de couleur blanchâtre frais (figure 15) est utilisé comme source de la tyrosinase. La L-tyrosine (Fluka) et le phénol (Prolabo) sont utilisés comme des substrats monophénoliques. Les autres réactifs chimiques sont d'un grade analytique.

II- Méthodes

II-1. Extraction de la tyrosinase du champignon *Agaricus bisporus*

La tyrosinase est préparée selon la méthode décrite par Gouzi et Benmansour (2007).

260 g de champignon de Paris froids à -15°C, préalablement lavés à l'eau distillée (afin d'éliminer les résidus du sol) et séchés à l'air libre, sont broyés dans un mixeur contenant 429 ml d'acétone (99,5%) refroidie à -15°C pour éliminer l'eau et les phénols [124, 195]. La suspension de pulpe est filtrée à l'aide de gaze et pressée manuellement jusqu'à l'obtention d'un résidu sec ou poudre d'acétone [195]. La pulpe pressée, qui pèse 22,98 g est refroidie en la plaçant en contact avec de la glace au moins 4 heures.

La pulpe froide est suspendue dans 236 ml d'eau distillée à l'aide d'un mixeur et laissée une nuit (15 h) dans un réfrigérateur à environ 5°C afin d'extraire l'enzyme et de minimiser la perte de l'activité enzymatique. La suspension est filtrée à travers de la gaze, et la pulpe qui se dépose sur le tissu est pressée à sec manuellement.

Le filtrat est centrifugé à 4000 tr/min pendant 15 minutes, afin d'éliminer les particules restantes. Le surnageant (139 ml) constitue l'extrait enzymatique brut de la tyrosinase et va être utilisé dans notre étude.

L'extrait brut de la tyrosinase ainsi est divisé en petites parties en volumes dans des tubes Eppendorf qui vont être congelés en dessous de -15°C.



Figure 15 : Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

II-2. Immobilisation de la tyrosinase par inclusion dans l'alginate de calcium

La tyrosinase est immobilisée par inclusion dans du gel d'alginate de calcium à 2.5% selon la méthode décrite par Munjal et Sawhney (2002) [151]:

0,25g d'alginate de sodium est dissoute dans 10 ml d'enzyme diluée 10 fois dans du tampon acétate de sodium (0,05 M-pH= 6). La solution obtenue est mélangée à l'aide d'une spatule puis la solution d'alginate ainsi obtenue est laissée se dégazée. La solution est versée dans une seringue de 10 ml munie d'une aiguille et placée à 20 cm au dessus d'un bécher contenant 100 ml de solution du chlorure de calcium à 0,2 M maintenu sous faible agitation. Une fois qu'une goutte de la solution d'alginate de sodium tombe dans la solution de chlorure de calcium elle se polymérise formant ainsi une bille d'alginate de calcium.

Les billes d'alginate formées sont rincées tous d'abord avec de l'eau distillée, puis avec du tampon acétate de sodium (0,05 M-pH 6,0) et sont mises ensuite dans une solution de CaCl_2 à 0,2 M sous faible agitation pendant 1 heure.

Les billes d'alginate sont ensuite récupérées à l'aide d'un filtre, lavées avec de l'eau distillée et avec du tampon acétate de sodium (0,05 M-pH 6,0), dénombrées, puis conservées à 4°C dans une solution tampon d'acétate de sodium (0,05 M-pH 6,0).

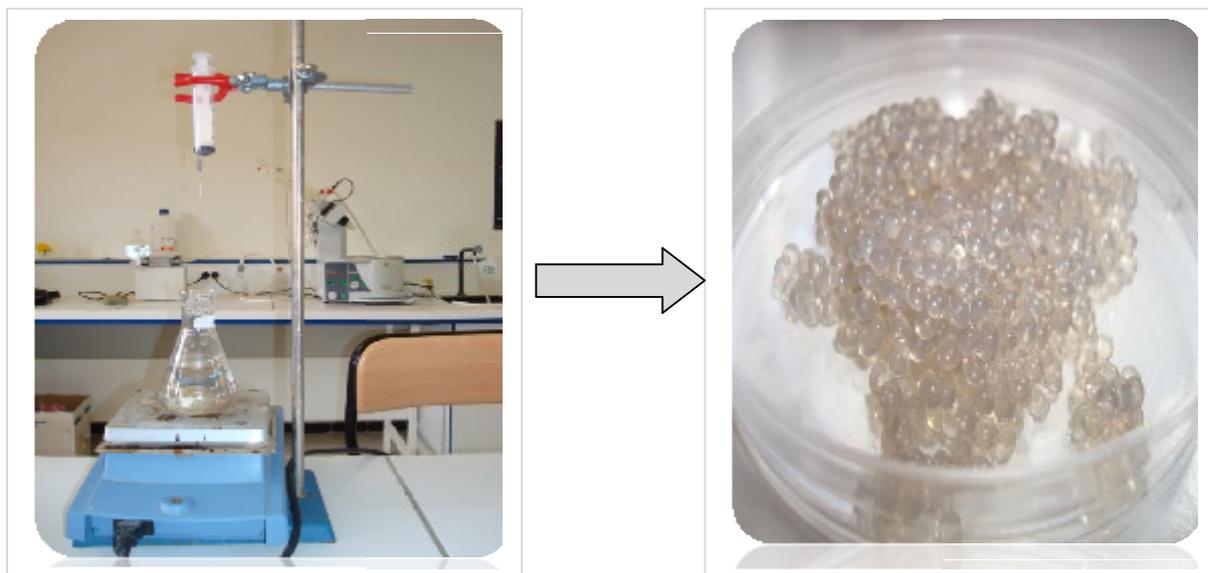


Figure 16 : Technique de l'immobilisation de la tyrosinase par inclusion dans l'alginate de calcium

III- Caractérisation de la tyrosinase soluble et de la tyrosinase immobilisée

III-1- Caractérisation de la tyrosinase soluble

III-1-1- Détermination de l'activité de la tyrosinase soluble

La cinétique de l'oxydation du phénol (concentration $C = 2,5 \text{ mM}$) par la tyrosinase libre a été effectuée dans un Erlenmeyer (réacteur « batch ») de 250 ml immergé dans un bain-marie réglé à 30°C et agité en continu manuellement, et dont le volume réactionnel est de 30 ml (1 ml de l'extrait brut de la tyrosinase à 29 ml de solution de phénol).

Toutes les minutes des prélèvements sont effectuées afin de suivre l'évolution de la formation de l'O-benzoquinone (suite à la biodégradation du phénol).

L'analyse se fait par une méthode spectrophotométrique à la longueur d'absorption maximale de 400 nm sur un spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU UV MIN-1240) [6, 11].

Un essai à blanc contenant seulement de la solution tampon phosphate (0,05 M-pH 6,0) et de l'extrait enzymatique.

La vitesse initiale est estimée à partir de la partie linéaire de la courbe « absorbance en fonction du temps » (figure 17 (a)) [124, 186].

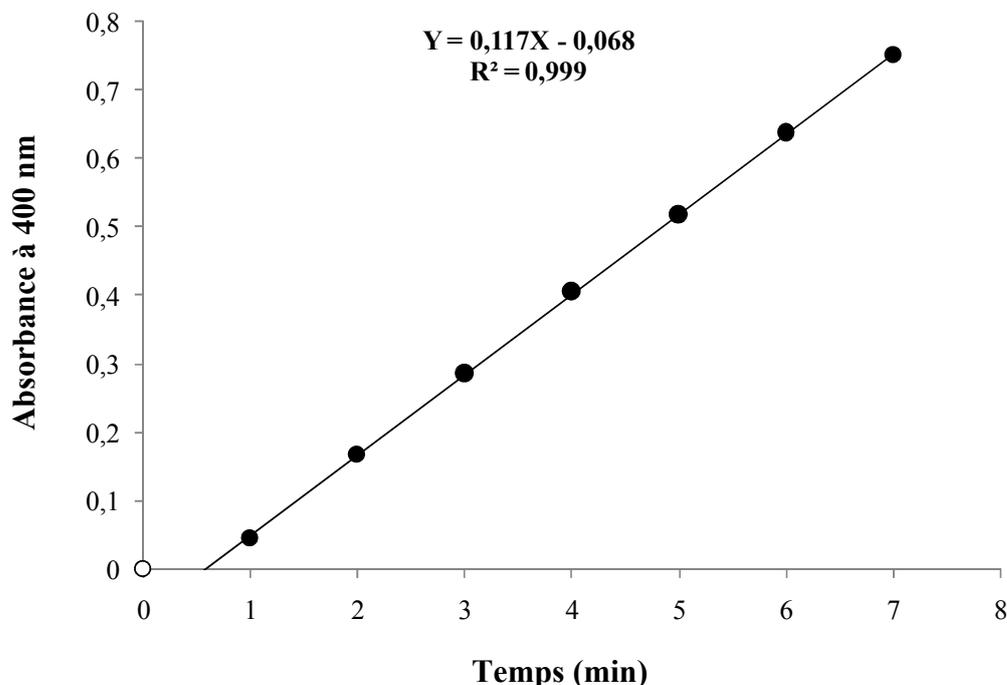


Figure 17 : Exemple de variation de l'absorbance au cours de l'oxydation du phénol par la tyrosinase soluble (tampon phosphate de sodium pH 6,0-0,05 M ; 30°C ; phénol 2,5 mM (29 ml); 1 ml d'extrait enzymatique) (a).

➤ *Essai d'activité tyrosinase*

L'activité tyrosinase de l'extrait brut a été mesurée en présence de la L-tyrosine (substrat) à 1 mM, à pH 6 (tampon phosphate 0,05 M) et à 30°C. Pour cela, dans un Erlenmeyer (réacteur « batch ») de 250 ml contenant 29 ml de la L-tyrosine (substrat) à 1 mM on ajoute 1 ml de l'extrait enzymatique brut (tyrosinase). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation en continue.

Des prélèvements ont été effectués chaque minute après l'ajout de l'enzyme afin de mesurer l'augmentation de l'absorbance à 475 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU UV MIN-1240) due à la formation de l'o-dopaquinone [124, 196].

L'essai à blanc contient seulement 29 ml de la solution tampon phosphate (0,05 M-pH 6,0) et 1 ml d'extrait enzymatique.

En spectrophotométrie une unité enzymatique (UE) est définie comme la quantité d'enzyme qui cause l'augmentation de l'absorbance de $0,001 \text{ min}^{-1}$ [89, 79, 134].

La vitesse initiale est estimée à partir de la partie linéaire de la courbe « absorbance en fonction du temps » [124, 186].

III-1-2-Etude de la stabilité de la tyrosinase soluble

L'activité PPO des extraits enzymatiques congelés à -15°C est déterminée chaque semaine pendant leurs stockage (comme c'est décrit précédemment dans III-1-1). Les conditions de mesure sont : pH 6 (tampon phosphate de sodium 0,05 M), Température 30°C , [Phénol] = 2,5 mM.

III-1-3-Effet de la concentration du substrat (phénol) sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase soluble

Dans les conditions standard (pH 6, tampon phosphate de sodium 0,05M, 35°C), on mesure les vitesses initiales d'oxydation du phénol par la tyrosinase libre pour les concentrations du substrat comprises entre 0.0625 et 10 mM.

Le milieu réactionnel contient le phénol (29ml) dilué dans 0,05M tampon phosphate de sodium pH= 6 et de 1ml d'extrait enzymatique.

III-1-4-Détermination des paramètres cinétiques de la tyrosinase

La constante de Michaelis-Menten (K_m), et la vitesse maximale (V_{max}) ont été déterminés avec phénol (0,0625-10 mM) comme substrat.

Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk [191].

III-1-5- Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase soluble

Dans des conditions standards (pH 6, tampon phosphate de sodium 0,05 M, 30°C , Volume du substrat 29 ml), on mesure la vitesse initiale d'oxydation ($\Delta\text{abs}_{400 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$) du phénol à 2,5 mM en présence des volumes croissants d'extrait brut de la polyphénol oxydase, à savoir : 0,2– 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1(ml)/1ml de mélange réactionnel.

III-1-6- Influence de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase soluble

Pour déterminer l'effet de la température sur l'activité de la tyrosinase libre ; on mesure la vitesse initiale ($\Delta A_{400\text{nm}} \cdot \text{min}^{-1}$) d'oxydation du phénol à différentes températures comprises dans la gamme 30 °C et 70°C aux conditions standards (29 ml du phénol à 2.5mM, tampon phosphate de sodium à 0,05 M-pH 6,0), 1 ml d'extrait enzymatique).

L'énergie d'activation de l'enzyme est déterminée, en portant sur un graphique la variation du logarithme décimal de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la température absolue (graphique d'Arrhénius) dans la mesure où la température n'entraîne pas la dénaturation de l'enzyme.

III.1.7. Etude de la stabilité thermique de l'enzyme soluble

Des solutions de l'extrait tyrosinase brut de 1,5 ml mis dans des tubes à hémolyses sont incubées dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30°C et 70°C pendant 10 minutes. Les extraits enzymatiques sont ensuite transférés dans de l'eau glacée puis leurs activités enzymatiques résiduelles sont déterminées à pH 6,0 (tampon phosphate de sodium à 0,05 M) et à 30°C ; en utilisant le phénol à 2,5 mM.

Le pourcentage de l'activité résiduelle de l'enzyme soluble a été calculé à partir de la formule suivante : [197].

$$(AR)\% = \frac{(A)_t}{(A)_o} \times 100 \quad \text{Pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle}$$

Où $(A)_o$ est l'activité de la tyrosinase soluble avant traitement thermique (activité de l'enzyme mesurée à 30°C) et $(A)_t$ est l'activité de la tyrosinase soluble après traitement thermique (activité résiduelle).

III-1.8. Effet de pH sur l'activité de la tyrosinase

L'étude de l'effet de pH a été effectuée dans du tampon : acétate de sodium (0,05M) entre les pH 4 et 5,6 et dans du tampon : phosphate de sodium (0,05M) entre les pH 6,0 et 8,0.

L'activité tyrosinase des différents extraits d'enzyme est mesurée aux conditions standards : (30°C, Volume de l'enzyme 1 ml, Volume du substrat 29 ml, [Phénol] = 2,5 mM).

III-2- Caractérisation de la tyrosinase immobilisée

III-2-1- Détermination de l'activité de la tyrosinase immobilisée

La cinétique de l'oxydation du phénol à 2,5 mM par la tyrosinase immobilisée par inclusion dans le gel d'alginate de calcium à 2,5% a été étudiée.

Dans un Erlenmeyer (réacteur « batch ») de 100 ml contenant 220 billes d'alginate. On ajoute 15 ml de phénol à 2,5 mM préparé dans du tampon acétate de sodium (0,05 M-pH 6,0).

Le milieu réactionnel est agité manuellement en continu dans un bain-marie réglé à 30°C.

Des prélèvements sont réalisés chaque 2 minute afin d'évaluer l'augmentation de l'absorbance à 400 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU UV MIN-1240) [6, 11]. L'essai à blanc contient seulement le phénol à 2,5 mM.

La vitesse initiale est estimée à partir de la partie linéaire de la courbe « absorbance en fonction du temps » (figure 18 (b)) [124, 186].

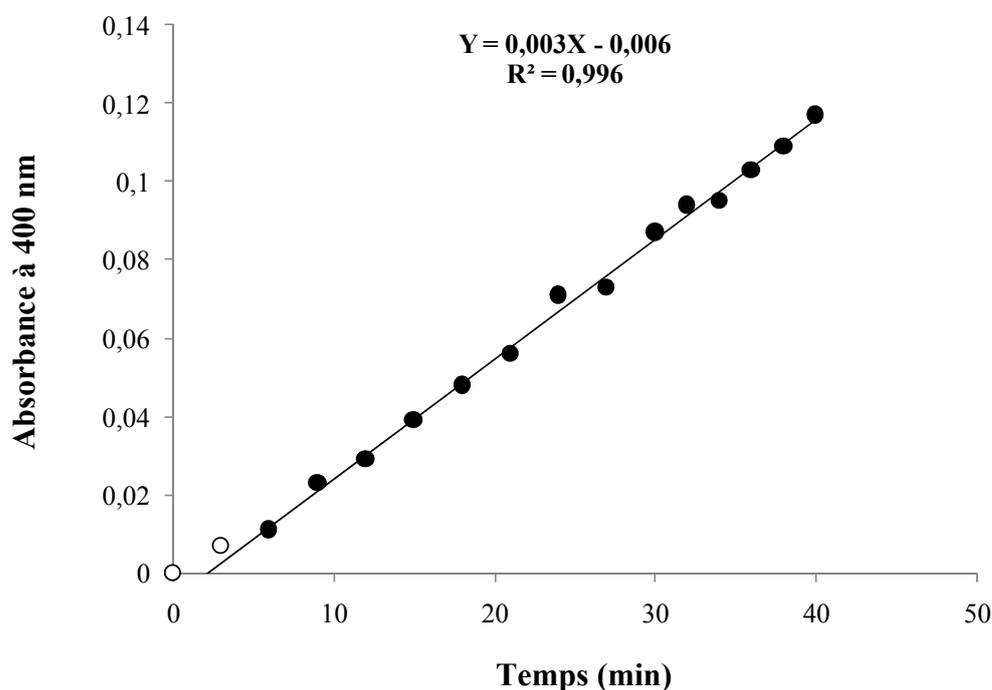


Figure 18 : Exemple de variation de l'absorbance au cours de l'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée (tampon acétate de sodium pH 6,0-0,05 M ; 35°C ; phénol 2,5 mM ; enzyme diluée 10 fois; diamètre des billes d'alginate de calcium 2.6 mm). (b)

III-2-2- Effet de la concentration du substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée

L'influence de la concentration du substrat sur la vitesse initiale a été étudiée aux conditions standards : Diamètre des billes 2,6 mm (220 billes), pH 6 (tampon acétate de sodium 0,05 M), 35°C, 10 ml de solution d'alginate à 2,5 % contenant 1 ml d'enzyme. Volume du substrat 15ml.

On mesure les vitesses initiales d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée avec des concentrations du substrat : 0,5 ; 1,5 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; et 10Mm comme. Le milieu réactionnel contient 220 billes d'alginate de calcium et 15ml de phénol préparé dans du tampon acétate de sodium (0,05M-pH6, 0).

III.2.3.Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée

L'influence de la concentration d'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol a été étudiée aux conditions standards : Diamètre des billes 2,6 mm (220 billes), pH 6 (tampon acétate de sodium 0,05 M), 30°C, [Phénol] = 2,5 mM. Les différentes dilutions de l'enzyme testées sont les suivantes: 0,25– 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2(ml)/10ml de mélange réactionnel.

III.2.4.Effet de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée

Afin de déterminer l'effet de la température sur la vitesse initiale ($\Delta A_{400nm} \cdot \text{min}^{-1}$) d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée, on mesure l'activité enzymatique aux températures comprises dans la gamme 30 C° et 70C°.

L'influence de la température sur la vitesse initiale d'oxydation a été étudiée aux conditions standards : Diamètre des billes 2,6 mm (220 billes), pH 6 (tampon acétate de sodium 0,05 M), 10 ml de solution d'alginate à 2,5 % contenant 1 ml d'enzyme. Volume du substrat 15ml, [Phénol] = 2,5 mM.

III.2.5.Etude de la stabilité thermique de l'enzyme immobilisée

La stabilité thermique de la tyrosinase immobilisée a été étudiée par l'incubation de 220 billes d'alginate de calcium à 2,5% d'un diamètre de 2,6 mm dans des tubes à hémolyse dans

un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30°C-70°C pendant 10 minutes. Après le traitement thermique, les tubes à hémolyse sont ensuite refroidis dans un bécher contenant l'eau glacée et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à (pH 6,0 (tampon acétate de sodium 0,05 M, 30°C) et en présence de phénol à 2.5 mM comme c'est décrit précédemment. Le pourcentage de l'activité résiduelle de la tyrosinase immobilisée est calculé par rapport à l'activité initiale de l'enzyme immobilisée non chauffé [197]. Selon l'équation suivante :

$$(AR)\% = \frac{(A)_t}{(A)_o} \times 100 \quad \text{Pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle}$$

Où $(A)_o$ est l'activité de la tyrosinase immobilisée avant traitement thermique (activité de l'enzyme mesurée à 30°C) et $(A)_t$ est l'activité de la tyrosinase immobilisée après traitement thermique (activité résiduelle).

III.2.6.Effet du pH sur l'activité enzymatique

L'étude de l'effet du pH a été effectuée dans du tampon acétate de sodium 0,05M entre les pH 4,0 et 5,6 et dans du tampon phosphate de sodium 0,05mM entre pH6, 0 et 12et, on mesure l'activité enzymatique aux conditions standards : Diamètre des billes 2,6 mm (220 billes), 30C°, 10 ml de solution d'alginate à 2,5 % contenant 1 ml d'enzyme. Volume du substrat 15ml, [Phénol] = 2,5 mM.

III.2.7.Effet du diamètre des billes d'alginate sur la vitesse initiale d'oxydation

On réalise des cinétiques d'oxydation du phénol (2,5mM) en utilisant différents diamètres des billes d'alginate de calcium : 2,4 ; 3,4 et 4mm et on mesure la vitesse initiale dans les conditions standards : (220 billes), pH 6 (tampon acétate de sodium 0,05 M),35C°, 10 ml de solution d'alginate à 2,5 % contenant 1 ml d'enzyme. Volume du substrat 15ml, [Phénol] = 2,5 mM.

III.2.8.Etude de la stabilité opérationnelle de l'enzyme immobilisée

Pour déterminer la stabilité opérationnelle des billes d'alginate ; on mesure l'activité enzymatique dans les conditions standards : Diamètre des billes 2,6 mm (220 billes), pH 6 (tampon acétate de sodium 0,05 M), T=35C°, 10 ml de solution d'alginate à 2,5 % contenant

1 ml d'enzyme. Volume du substrat 15ml, [Phénol] = 2,5 mM comme c'est décrit précédemment. L'activité des billes fraîchement préparées du premier cycle d'utilisation représente 100%.

Les billes sont réutilisées cinq fois avec renouvellement du milieu réactionnel (phénol à 2,5 mM). Après chaque cycle d'utilisation les billes d'alginate sont récupérées à l'aide d'un filtre, lavés à l'eau distillé puis avec le tampon acétate de sodium (0,05M-pH6).

Résultats et Discussions

I- Extraction de la tyrosinase d'*Agaricus bisporus*

Le procédé d'extraction développé par Gouzi et Benmansour (2007) [124], c'est avéré simple à mettre en œuvre et efficace (figure 19) pour extraire la tyrosinase à partir du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). L'extraction de l'enzyme nécessite tous d'abord la préparation d'une poudre d'acétone afin d'éliminer les phénols endogènes et les pigments [124]. L'extrait brut de la tyrosinase possède une activité monophénolase élevée vis-à-vis du phénol comme substrat et son activité volumique a été estimée à 1176 UE/ml (pH 6.0 ; 30°C).

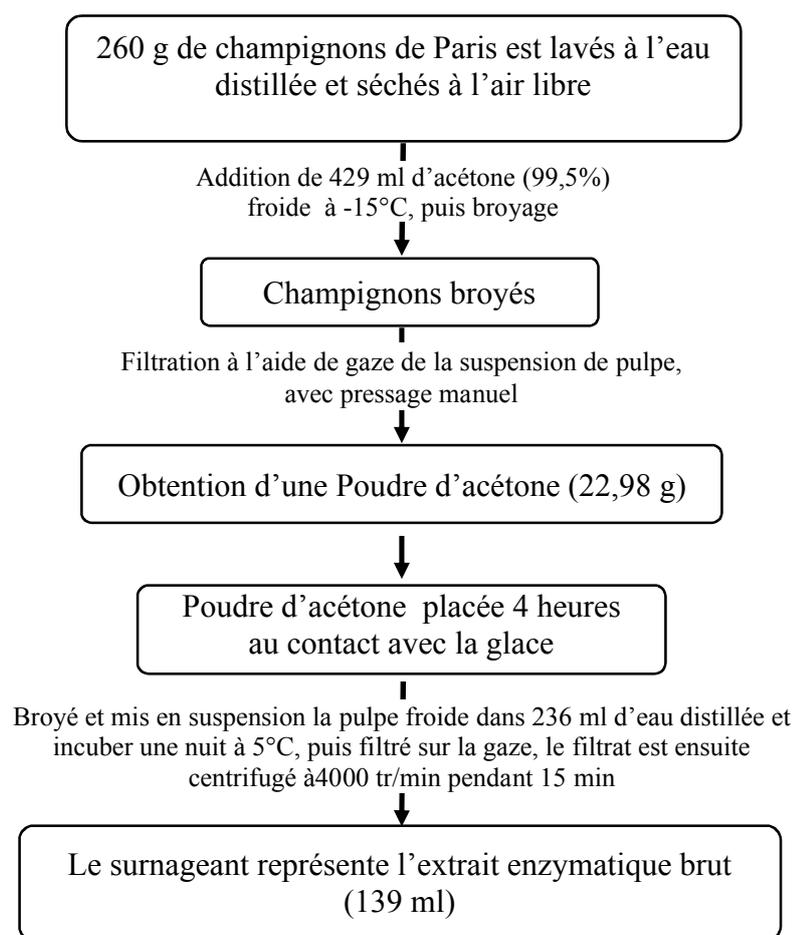


Figure 19: Protocole d'extraction de la tyrosinase de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

L'activité de la tyrosinase dans l'extrait brut a été testée pour leur activité monophénolase (crésolase). La L-tyrosine et le phénol sont utilisés comme substrats expérimentaux. Elle est positive en utilisant la L-tyrosine (activité monophénolase ou crésolase). Cette même remarque est valable lorsqu'on utilise le phénol.

La PPO est considéré comme tyrosinase vraie, car elle catalyse l'oxydation des mono- et des diphénols [92]. Smith et Krueger [107] ont démontré que les deux types d'activités se produisent dans le champignon.

Parmi les préparations de la tyrosinase, celles des pommes de terre, des pommes, des feuilles de betterave à sucre, des fèves, et des champignons possèdent les deux activités. Par contre celles des feuilles de thé, du tabac, de la mangue, des bananes, des poires, et des merises n'agissent pas sur les monohydroxyphénols [119,198].

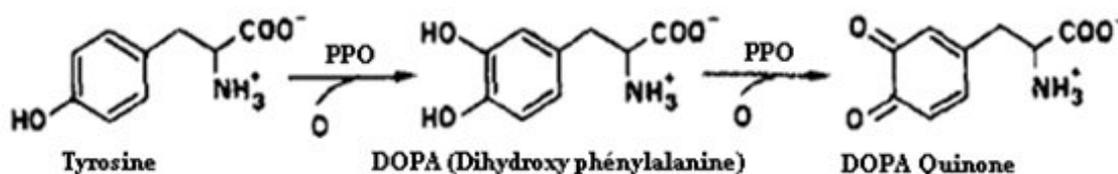


Figure 20 : Réaction catalysée par la polyphénol oxydase:

Hydroxylation et oxydation de la L-tyrosine en L-DOPA quinone respectivement [64].

Quand la crésolase est présente, son activité est habituellement beaucoup plus faible par rapport à l'activité catécholase [17]. La polyphénol oxydase a normalement un taux d'activité diphénol oxydase par rapport au monophénol hydroxylase très élevé [121]. Aucune préparation possédant seulement l'activité crésolase n'a été obtenue [75].

I.1.Essai d'activité de la tyrosinase

L'activité tyrosinase de l'extrait brut a été déterminée par la mesure de l'augmentation de l'absorbance (formation des o-dopaquinones) à 475 nm à l'aide d'un spectrophotomètre [124, 196] ; en présence de la L-tyrosine (substrat) à 1mM, à pH6 (tampon phosphate de sodium 0,05M) et à 30 °C. Les résultats expérimentaux sont représentés sur la figure suivante :

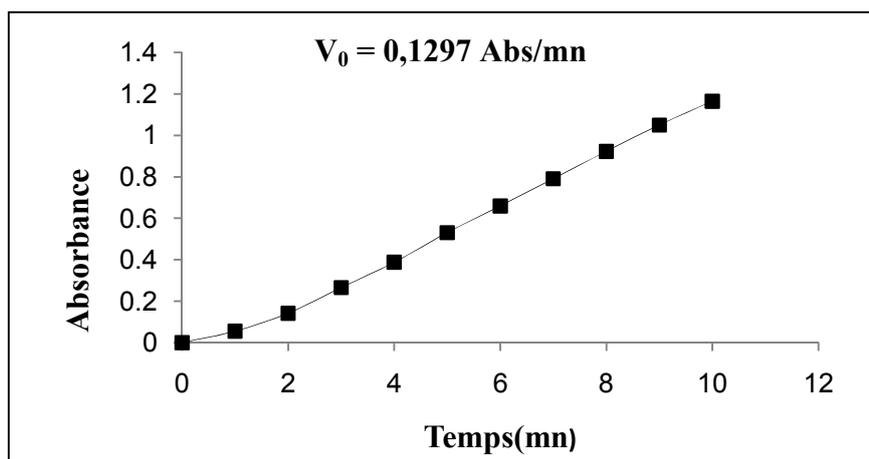


Figure 21 : Enregistrement par spectrophotométrie de l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase libre d'*Agaricus bisporus*.

On a observé que l'extrait brut est capable d'oxyder la L-tyrosine (activité monophénolase ou crésolase). L'enzyme à partir du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) a montré une large spécificité de substrat vers les substrats mono- phénoliques.

De ces observations, on peut affirmer que cette enzyme peut être classée comme une monophénol monooxygénase, ou par son nom classique la tyrosinase [199,200].

Des phénomènes remarquables liés à l'utilisation des monophénols comme substrats pour la tyrosinase ont été observés. La figure (21) montre que l'oxydation ne commence pas immédiatement lorsque l'enzyme est ajoutée mais elle est précédée par une période de retard ou période d'induction (τ) avant qu'une vitesse maximale de l'étape d'hydroxylation soit atteinte, à partir de laquelle, la vitesse d'oxydation s'accélère et la progression de la courbe devient linéaire [67, 126, 138, 201]. La vitesse initiale de la réaction est la tangente mesurée à la courbe d'activité après que la vitesse maximale soit atteinte.

La période d'induction est due à la condition obligatoire de fixation de l'oxygène moléculaire sur le site actif bicuivreux pour permettre à l'enzyme de convertir les substrats phénoliques en o-quinones correspondantes [201]. Son substrat naturel est considéré comme la tyrosine, pourtant il montre une période d'induction ou un temps de latence dans l'oxydation de ce substrat. Le temps de latence est expliqué par un mécanisme autocatalytique qui dépend de l'élaboration du dihydroxyphenylalanine (DOPA) dans la phase initiale de la réaction qui agit en tant qu'activateur de l'enzyme. Il y a deux théories mécanistiques principales d'autocatalyse de la tyrosinase : (a) activation allostérique par la L-DOPA pour l'hydroxylation de la L-tyrosine par la tyrosinase et (b) l'hypothèse de recrutement, qui

dépend de la réduction de deux électrons du site actif de l'enzyme par l'oxydation de dihydroxy substrats [202, 203].

II. Etude de la stabilité de la tyrosinase à -15°C :

Afin d'étudier la stabilité de la tyrosinase; les extraits bruts de l'enzyme ont été maintenues à -15°C dans plusieurs tubes eppendorf. Des prélèvements sont étudiés chaque semaine pour évaluer l'activité de la tyrosinase à 30°C, pH 6 (tampon phosphate de sodium 0,05M), 29ml du phénol à 2,5 mM et 1ml d'enzyme.

L'activité enzymatique relative a été calculée à partir de la formule suivante : [197].

$$(AR)\% = \frac{(A)_t}{(A)_o} \times 100 \quad \text{Pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle.}$$

Où $(A)_o$ est l'activité avant stockage de l'enzyme à -15°C (activité de l'enzyme mesurée à 30°C) et $(A)_t$ est l'activité après stockage de l'enzyme à -15°C.

D'après la Figure (22) on remarque que l'activité monophénolase de l'extrait brut de la tyrosinase diminue de 35% par rapport à son activité enzymatique initiale pendant la première semaine du stockage à -15°C au-delà de laquelle l'activité demeure stable. Cette diminution de l'activité enzymatique pourrait être expliquée par la présence des protéases et ou à l'effet inhibiteurs des produits d'oxydation (*o*-quinones) formés pendant l'extraction de l'enzyme [204].

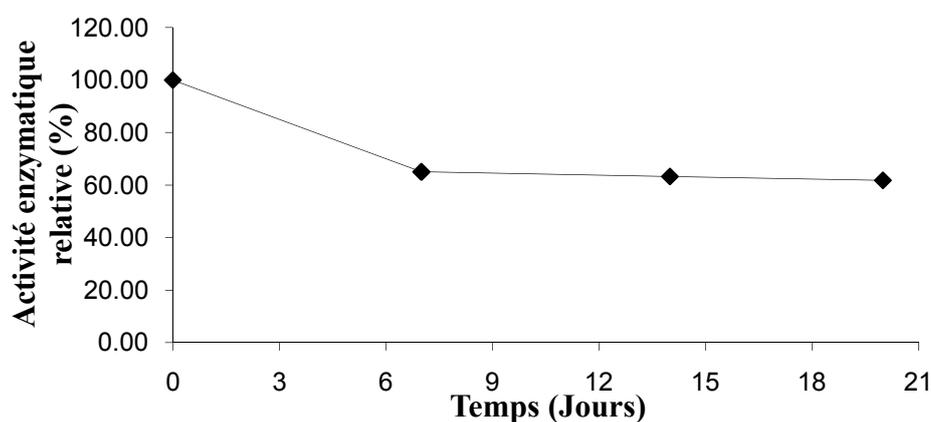


Figure 22: Stabilité de la tyrosinase du champignon de paris durant le stockage à -15°C.

Sharma et al. (2003) [205] ont montré que les extraits de tyrosinase du même champignon gardent leurs activités résiduelles lorsqu'ils sont stockés pendant une période de 28 jours est cela à -10 ou à 10°C.

Vámos-Vigyázó (1981) [119] et Richard-Forget et *al.* (1992) [206] ont déjà signalé La stabilité de la tyrosinase stockée aux températures inférieures à 0°C.

Patil et Zucker (1965) [103], ont signalé de leurs part que l'activité de la tyrosinase de la pomme de terre est stable lorsqu'elle est stocké à -15° C pendant plusieurs jours.

Les structures des protéines sont en général stabilisées à basses températures mais certaines enzymes montrent une perte d'activité pendant la baisse de la température. De telles enzymes sont souvent des oligomères ; leur instabilité, est généralement réversible, et elle est due à une dissociation des sous unités induite par la température. Cependant, les monomères aussi peuvent être dénaturés à froids [207].

III. Les paramètres cinétiques de la tyrosinase libre et de la tyrosinase immobilisée :

Les paramètres cinétiques (V_{max} et K_m) de l'oxydation du phénol par l'extrait brut de la tyrosinase a été étudié à pH 6,0, utilisant le tampon phosphate à 0.05 M et à 35°C. Nous avons observé que l'enzyme oxyde significativement le phénol dans la gamme des concentrations de substrats comprise entre 0.5 et 10 mM.

La Figure (23 A) montre que la cinétique d'oxydation du phénol par l'enzyme libre suit bien le modèle cinétique de Michaelis-Menten (Equation (1)).

Les paramètres cinétiques de la tyrosinase libre estimés à partir de la représentation de Michaelis-Menten (Equation (1)) sont : $K_m = 0,6$ mM et $V_{max} = 0,14$ Abs/min.

$$V_o = \frac{V_{max} [Phénol]}{K_m + [Phénol]} \quad \text{Équation (1)}$$

Le K_m et V_{max} sont respectivement 0,6 mM et 0,14 Abs/min, déterminés à partir de l'analyse du graphique de Lineweaver-Burk (1934) (Equation (2) (Figure 23B)).

$$\frac{1}{V_o} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \right) \left(\frac{1}{[Phénol]} \right) + \left(\frac{1}{V_{max}} \right) \quad \text{Équation (2)}$$

Fenoll et *al.* (2002) [22] ont trouvé que la constante de Michaelis-Menten (K_m) pour le phénol égale 0.70 mM, utilisant la tyrosinase de champignon de couche purifiée. On constate donc que la tyrosinase qu'elle soit brute ou purifiée donne des résultats comparables.

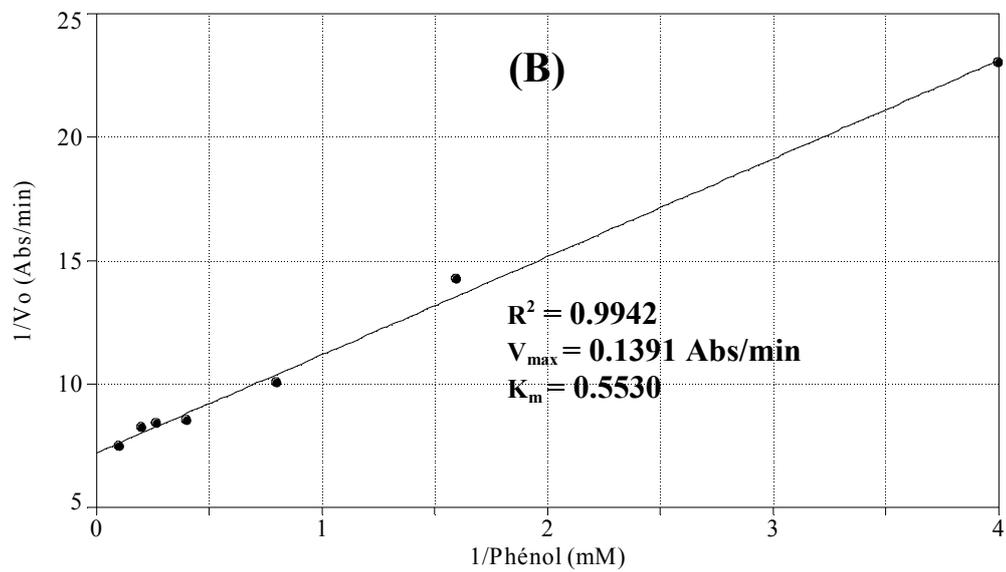
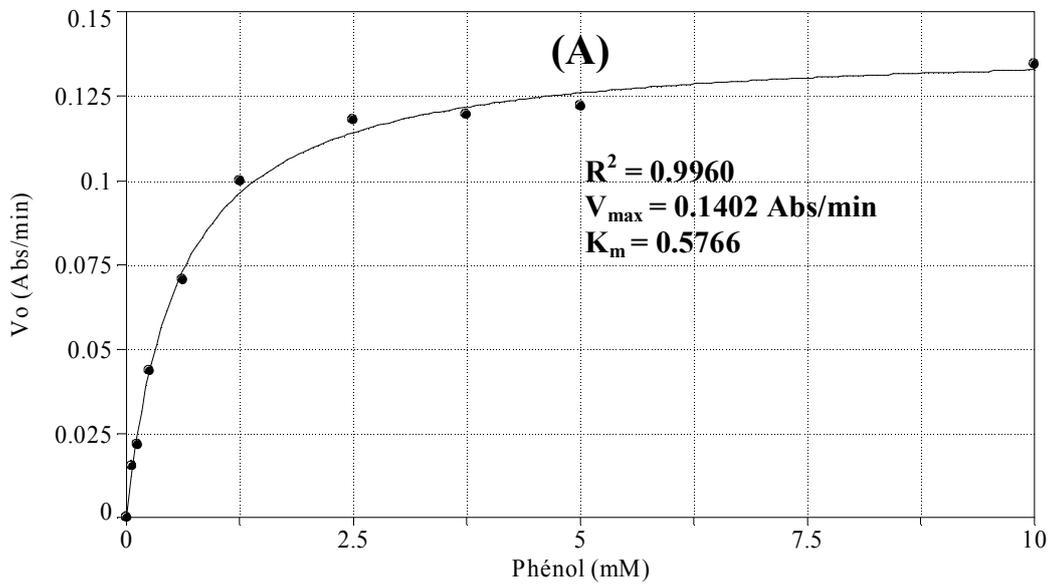


Figure 23: Effet de la concentration du substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase libre du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (pH 6.0 ; 35°C).
(A) Représentation graphique de Michaelis-Menten
(B) Représentation graphique de Lineweaver-Burk.

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité de la tyrosinase immobilisée par inclusion dans le gel d'alginate de calcium à 2,5% a été étudié dans une gamme de concentration en phénol comprise entre 0,5 à 10 mM. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants (tampon acétate de sodium 0,05 M-pH 6,0 à 35°C).

Nous avons observé que la tyrosinase immobilisée est sujette à un phénomène d'inhibition pour des concentrations de substrat supérieures à 5 mM. Par conséquent, nos résultats expérimentaux ont été ajustés par deux équations non linéaires (3) et (4). Les valeurs des paramètres cinétiques V_{\max} , K_m et K_s ont été calculées. Le coefficient de corrélation linéaire (r^2) montre que la PPO suit correctement une cinétique de Michaelis-Menten tenant compte du phénomène d'inhibition par excès de substrat dans la gamme des concentrations du phénol testées.

Les équations de vitesse impliquées dans l'inhibition par excès de substrat sont les suivantes :

$$V_0 = V_{\max} (S) / ((S) + K_m + (S)^n / K_s) \quad \text{Équation (3)}$$

Où K_s est la constante de dissociation du complexe inactif enzyme-substrat. L'équation (3) peut être écrite sous la forme :

$$(S) / V_0 = K_m / V_{\max} + (1 / V_{\max}) ((S) + (S)^n / K_s) \quad \text{Équation (4)}$$

$$1 / V_0 = 1 / V_{\max} + (K_m / V_{\max}) (1 / S) \quad \text{Équation (2) [185].}$$

La représentation graphique de l'équation (3) (Figure 24 A) indique que la tyrosinase immobilisée dans le gel d'alginate de calcium suit correctement un modèle cinétique de Michaelis-Menten tenant compte du phénomène d'inhibition par excès de substrat. L'activité enzymatique augmente avec l'augmentation de la concentration du phénol pour atteindre un maximum à 5 mM, au-delà de laquelle l'activité enzymatique diminue. Cette diminution d'activité enzymatique aux fortes concentrations de substrat peut être expliquée également par l'effet inhibiteur du produit (*o*-quinone) qui s'accumule dans le microenvironnement.

L'immobilisation de la tyrosinase provoque une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le phénol ($K_m=1,29$ mM) et une diminution de son activité catalytique ($V_{\max} = 0,005$ Abs/min).

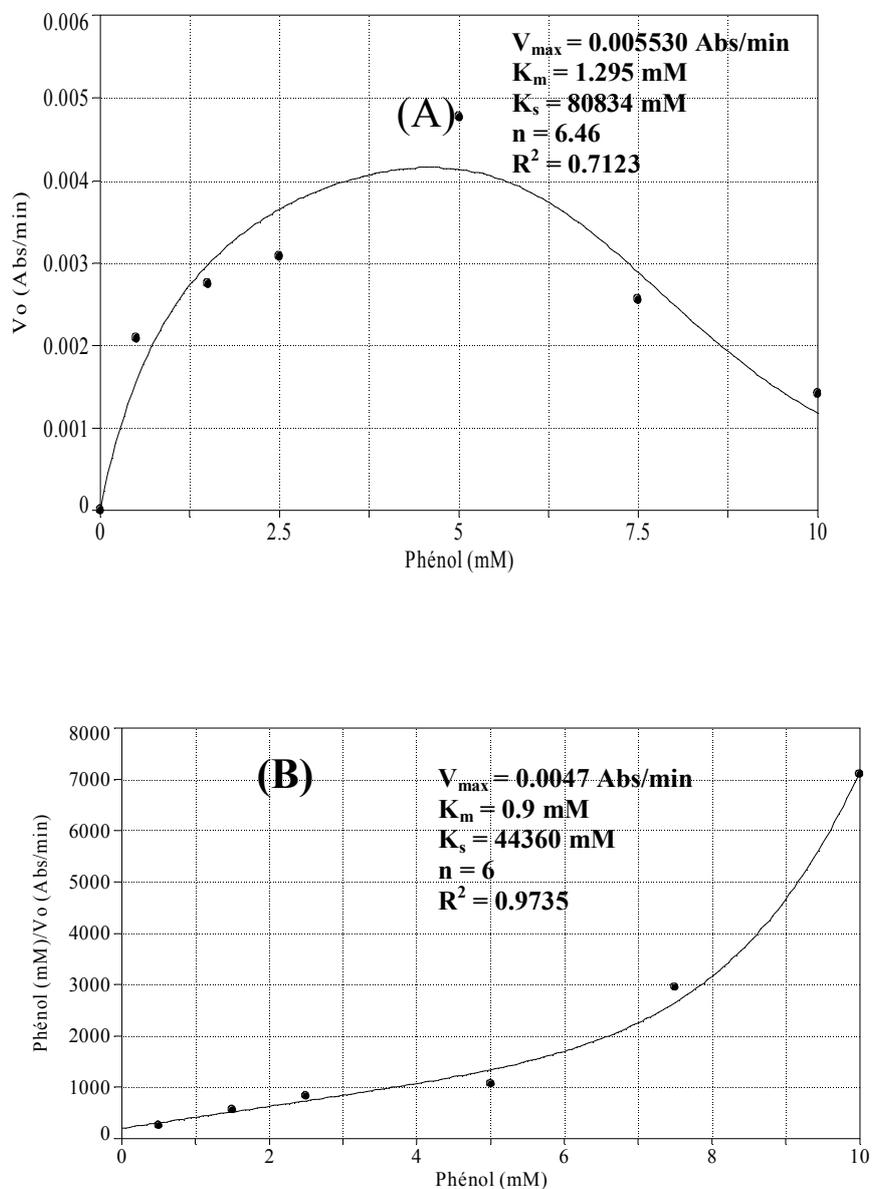


Figure 24 : Etude de l'effet de la concentration du substrat sur la vitesse initiale de l'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée dans le gel d'alginate de calcium à 2.5% (diamètre des billes 2.6 mm, pH 6 (tampon acétate de sodium 0.05 M), et à 35°C)

- (A) Représentation graphique de Haldane ;
- (B) Représentation graphique de Lineweaver-Burk.

La valeur du K_m apparente de la tyrosinase immobilisée est environ deux fois élevée par rapport à celle de l'enzyme libre. Par contre, la valeur du V_{max} de l'enzyme libre est 30 fois plus grande à celle de la PPO immobilisée. La valeur de K_m mesure l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Une valeur plus faible de K_m indique une affinité plus élevée pour son substrat et vice versa [208]. L'augmentation du K_m peut être due d'une part au changement de la conformation structurale de l'enzyme au cours du procédé d'immobilisation et d'autre part à la diminution de l'accessibilité du substrat à son site actif. De plus, la présence des charges électriques sur le support et sur le substrat se traduira par une variation de la constante de Michaelis-Menten apparente de l'enzyme immobilisée qui augmentera si les deux charges ont le même signe et diminuera si elles sont de signe opposé [209].

La représentation graphique de $(S)/v$ en fonction de (S) suit une loi hyperbolique. Donne une courbe devenant concave vers le haut aux valeurs élevées de (S) , où $(S)/K_s$ n'est plus négligeable (Figure 24 B).

Il s'avère que le substrat à des concentrations élevées, peut empêcher sa propre conversion en produit [165]. Cet effet inhibiteur est souvent attribué à une forte inhibition de l'enzyme par le produit de la réaction, et parfois à la compétition entre le produit et le substrat [210].

Un abaissement de la diffusion du substrat aussi bien du produit à l'intérieur et à l'extérieur des billes d'alginate [211], expliqué par les phénomènes de diffusion interne et externe qui provoquent un ralentissement de la réaction et par conséquent la diminution de V_{max} .

L'inhibition de l'enzyme par le substrat à des concentrations élevées a été rapportée pour la PPO de différentes sources végétales. On suppose qu'à des concentrations élevées de substrat, le complexe actif enzyme-substrat $[ES]$ et le complexe inactif $[ES_2]$ sont formés simultanément. On suggère qu'une deuxième molécule de substrat peut se fixer de façon non favorable sur le site actif de l'enzyme formant ainsi un complexe non réactif [57, 195].

Le changement des valeurs de la constante d'affinité de la PPO (K_m) dépend généralement de la source de l'enzyme, du substrat utilisé et également de l'état environnemental tel que le pH, la température et la concentration ionique [109, 212]. Le K_m est aussi fonction de la pureté de l'enzyme [154]. Pour les mêmes substrats, de grandes différences sont observées dans les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) selon la source (le genre, le cultivar et le tissu à partir de lequel l'enzyme a été extraite) et la pureté de l'enzyme [57]. Les PPO ont généralement de faible affinité (K_m élevé) vis-à-vis de leurs substrats [65].

IV. Effet de la concentration de la tyrosinase sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol :

L'effet de la concentration de la tyrosinase sur la vitesse d'oxydation du phénol par la tyrosinase libre et immobilisée a été effectué sur différentes dilutions d'extrait brut qui varient entre 0,2-1ml et 0,25-2ml pour l'enzyme libre et immobilisée respectivement. Les essais sont réalisés dans les conditions standards dont la concentration du phénol est 2,5 mM.

Les Figures (25) et (26) montrent que les vitesses initiales du phénol par la tyrosinase libre et par la tyrosinase immobilisée sont directement proportionnelles à la quantité d'enzyme introduite. D'une façon générale, il ya une relation linéaire entre la concentration de la tyrosinase et la vitesse initiale pour les deux formes d'enzymes (libre et immobilisée).

Donc, quand la concentration en phénol est saturante, la vitesse initiale est directement proportionnelle à la concentration d'enzyme. C'est la base de détermination de l'activité enzymatique dans un échantillon biologique [213].

La proportionnalité entre la vitesse initiale et la concentration en enzyme a une importance dans la pratique car elle permet d'estimer sa concentration dans un extrait sans qu'il soit nécessaire d'effectuer sa purification totale [214].

A partir de la relation de proportionnalité entre la vitesse initiale et la concentration de l'enzyme, on détermine habituellement la constante catalytique. Cette dernière correspond à la quantité d'enzyme qui convertit une mole de substrat par seconde et elle est donnée par l'équation suivante :

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_0} \quad (\text{Équation 5})$$

Avec :

V_{max} Vitesse maximale ou activité catalytique ;

K_{cat} Constante catalytique (temps⁻¹) ;

$[E]_0$ Concentration initiale en enzyme.

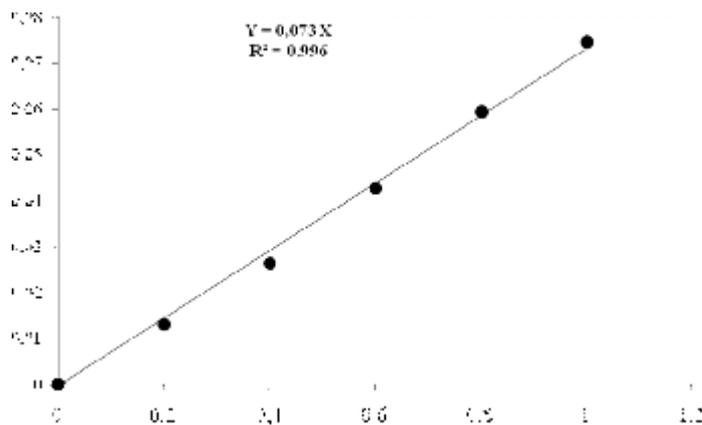


Figure 25: Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase libre (pH 6,0, 35°C ; phénol 2,5mM)

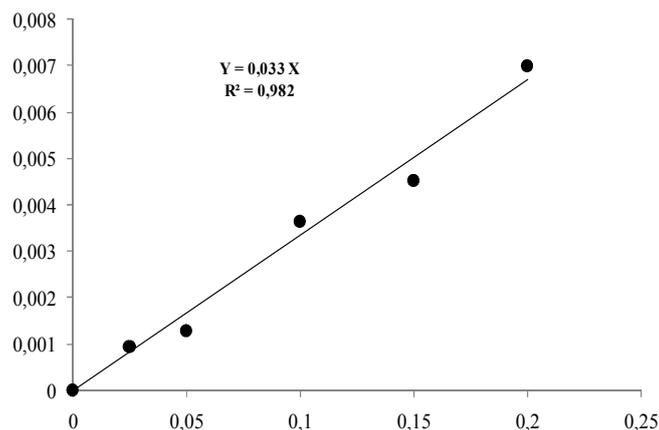


Figure 26: Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée (pH 6,0, 35°C ; phénol 2,5

Néanmoins, nous ne connaissons pas ici la concentration molaire de l'enzyme et nous ne pouvons donc pas calculer K_{cat} .

Dans la pratique, K_{cat} ne peut être obtenue par le calcul que si on dispose d'un modèle cinétique et de la valeur numérique des diverses constantes. De plus, la concentration de l'enzyme ($[E]_0$) ne peut être connue, même dans une préparation pure, car la protéine enzymatique n'est qu'une des composants d'un mélange dans des proportions inconnues et variables en fonction du temps, du mode de préparation de l'enzyme et de son origine, etc.

On peut caractériser la quantité d'enzyme présent par sa concentration, exprimée en terme de masse ou de moles mais seulement par le produit $K_{cat} \times [E]_0$, c'est à dire en terme V_{max} , activité catalytique par unité de masse de la préparation enzymatique, seule accessible expérimentalement [168].

V. Effet de la température sur l'activité de la tyrosinase libre et de la tyrosinase immobilisée

L'effet de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du phénol à 2,5mM par la tyrosinase libre et immobilisée a été étudié à différente température comprise entre 30 et 70°C, aux conditions standards.

La Figure (27) montre la variation de l'activité enzymatique relative en fonction de la température pour les deux formes d'enzyme libre et immobilisée respectivement. On constate qu'une activité maximale est obtenue à 45°C et à 55°C pour la tyrosinase libre et immobilisée, respectivement. Au-delà, on assiste à une perte d'activité de l'enzyme suite à une dénaturation thermique. On remarque que la tyrosinase immobilisée dans le gel d'alginate de calcium possède une stabilité thermique accrue par rapport à la tyrosinase libre.

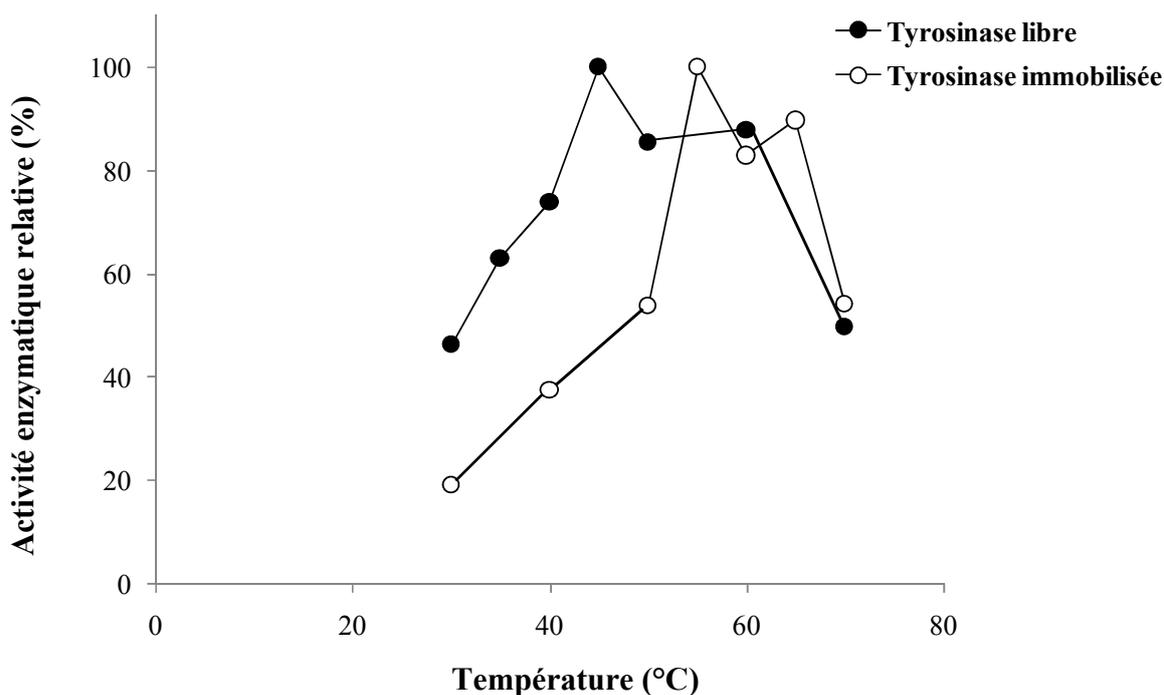


Figure 27: Effet de la température sur l'activité relative de la tyrosinase libre et immobilisée (phénol à 2,5 mM; pH 6,0).

La Figure (28) montre que les deux graphes issus de la relation d'Arrhenius pour la tyrosinase libre immobilisée sont linéaires dans la gamme des températures explorées expérimentalement.

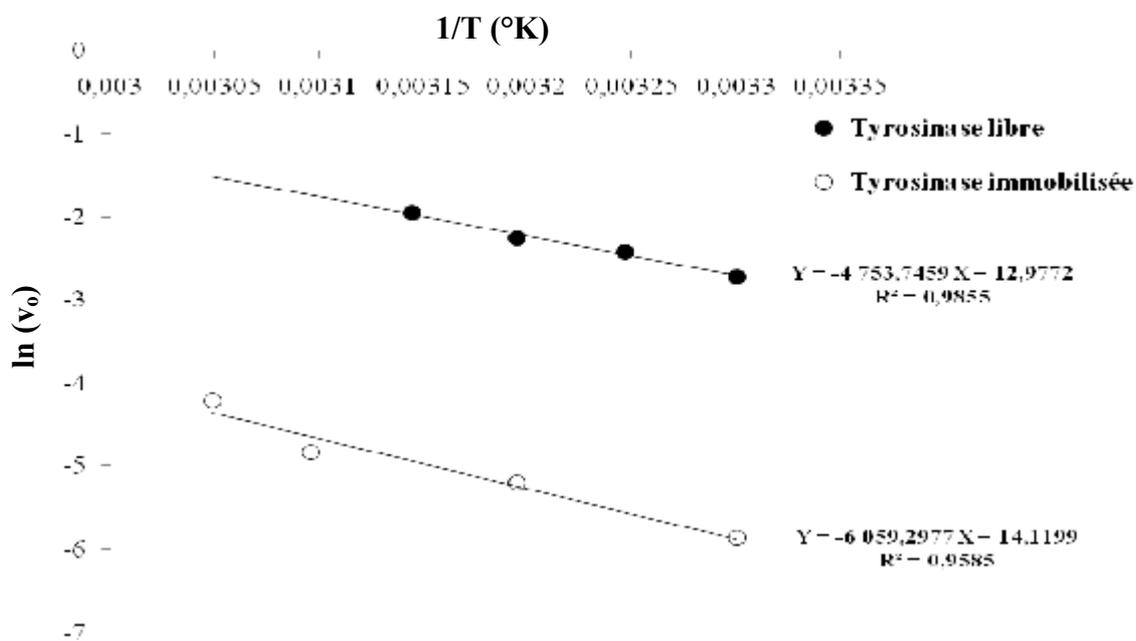


Figure 28 : Graphes d'Arrhenius pour la détermination de l'énergie d'activation de l'oxydation du phénol par la tyrosinase libre et la tyrosinase immobilisée dans le gel d'alginate de calcium.

L'activité maximale de la tyrosinase est définie comme étant le point d'équilibre entre l'effet d'accélération de la température sur l'enzyme a catalysé la réaction et l'effet de la destruction de l'enzyme par la chaleur [215].

La dénaturation des enzymes par la chaleur s'accompagne le plus souvent d'une perte d'activité qui est d'autant plus grande que la structure tertiaire de la protéine est complexe. Néanmoins, il y a une augmentation de la résistance d'enzyme immobilisée vis-à-vis de la dénaturation par la chaleur [209].

D'après Lehninger [188], la vitesse de la réaction enzymatique augmente avec la température dans l'intervalle de température où l'enzyme reste stable et garde sa pleine activité.

La pente des courbes $(-Ea/R)$ et nous permet de déterminer l'énergie d'activation de la réaction d'oxydation du phénol par les deux formes d'enzyme.

$$\ln V_o = \ln Z - Ea/RT \quad (\text{Équation 6})$$

Les énergies d'activation de la réaction de l'oxydation du phénol par la tyrosinase libre et immobilisée sont ainsi estimées à 39, 5 kJ/mol, et 50, 4 kJ/mol respectivement.

L'augmentation de l'énergie d'activation montre que la vitesse d'oxydation du phénol par la tyrosinase immobilisée est lente, nécessitant donc un apport d'énergie plus élevée.

La stabilité plus grande de l'enzyme immobilisée peut être attribuée aux effets stabilisateurs de l'immobilisation. Les interactions hydrophobes et d'autres interactions secondaires de l'enzyme immobilisée pourraient altérer la flexibilité conformationnelle rendant nécessaire des températures plus élevées pour que la molécule d'enzyme se réorganise afin d'atteindre une conformation appropriée pour son fonctionnement et de fixer le substrat [151].

VI. Etude de la stabilité thermique de la tyrosinase libre et immobilisée :

La stabilité thermique a été étudiée après incubation de l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée à des températures comprises entre 30 et 70°C pendant 10 min en absence du substrat. Les préparations enzymatiques sont ensuite équilibrées à 30°C afin de déterminer l'activité résiduelle aux conditions standards.

L'activité résiduelle de l'enzyme libre et immobilisée a été calculée à partir de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'activité résiduelle} \quad (AR)\% = \frac{(A)_t}{(A)_o} \times 100$$

Où $(A)_o$ est l'activité avant traitement thermique (activité de l'enzyme à 30°C) et $(A)_t$ est l'activité après traitement thermique.

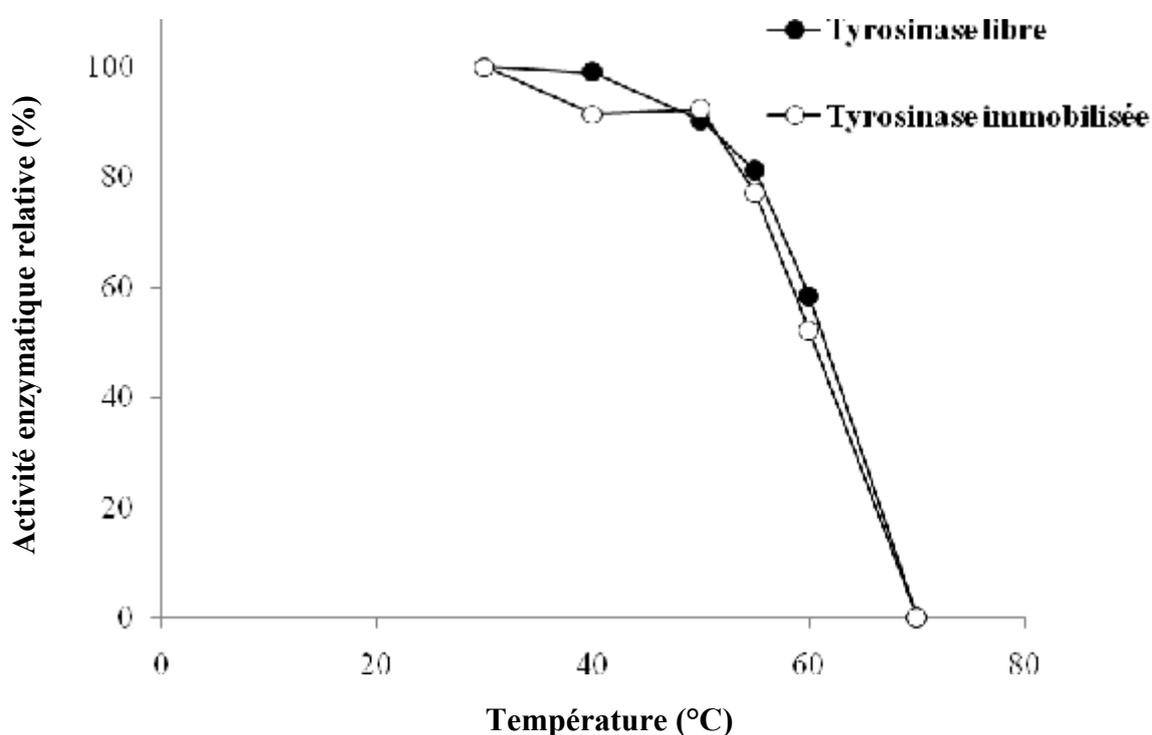


Figure 29: Graphique de la stabilité thermique de la tyrosinase libre et de la tyrosinase immobilisée après une durée d'incubation 10mn à chaque température (phénol à 2,5 mM; pH 6,0)

D'après la figure (29), on remarque qu'il y a une grande stabilité thermique de la tyrosinase immobilisée par rapport à la tyrosinase libre dans l'intervalle des températures comprises entre 30 et 50°C ou l'enzyme conserve presque la totalité de son activité initiale. Alors que l'enzyme n'était stable qu'entre 30 et 40°C. Au-delà de 40°C son activité diminue progressivement. À 60°C la tyrosinase libre ne garde que 40% de son activité initiale, cependant la tyrosinase immobilisée garde 50% de son activité initiale. Les deux formes

d'enzymes (libre et immobilisée) sont complètement inactivées à 70°C. Une étude réalisée par Munjal et Sawhney, (2002) [151] confirme ce résultat.

La diminution rapide de l'activité enzymatique de l'enzyme libre au-dessus de 40°C pourrait être due d'une part aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire ou de la destruction du site actif de l'enzyme [216] et d'autre part à la présence des formes multiples d'enzyme de la tyrosinase dont, certaines sont extrêmement thermolabiles [217].

C'est plus notable qu'aux températures relativement élevées dans lesquelles plusieurs faibles liaisons qui maintiennent la structure native de l'enzyme sont déstabilisées et solvatées. Par conséquent l'enzyme devient inactive. La dénaturation thermique est souvent accompagnée par la rupture des liaisons covalentes [218].

Doğan et *al.* [197] suggèrent qu'une diminution du pourcentage de l'activité résiduelle aux températures élevées peut être réellement due au déploiement de la structure tertiaire de l'enzyme pour former une structure secondaire qui est dépourvue d'activité catalytique.

La tyrosinase n'est pas une enzyme extrêmement thermostable. Les traitements thermiques de courtes durées aux températures de 70 à 90°C, de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas, suffisantes pour la destruction irréversible partielle ou totale de sa fonction catalytique [119, 57].

La thermotolérance dépend également de la spécificité de substrat, et au pH optimal, de la température, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et du cultivar [119].

Amiot et *al.* [219] ont proposé que "la tyrosinase ne soit pas une enzyme très thermostable".

L'immobilisation d'enzyme dans le gel d'alginate offre une amélioration considérable dans sa thermo stabilité. Cette dernière peut être provoquée par l'existence d'un environnement local d'enzyme immobilisée qui diminue son endommagement inversement si elle était libre.

VII. Effet du pH sur l'activité de la tyrosinase libre et immobilisée :

L'effet de pH sur l'activité enzymatique de la tyrosinase libre et immobilisée a été déterminé par une série d'expériences en mesurant la vitesse initiale de la réaction d'oxydation du phénol à différents pH : acétate de sodium (0,05M) entre les pH 4 et 5,6 et dans du tampon : phosphate de sodium (0,05M) entre les pH 6,0 et 8,0. Tout en maintenant les autres paramètres expérimentaux constants.

La Figure (30) montre l'influence du pH sur l'activité de la tyrosinase libre et immobilisée. Le graphe à une allure globale classique en forme de cloche.

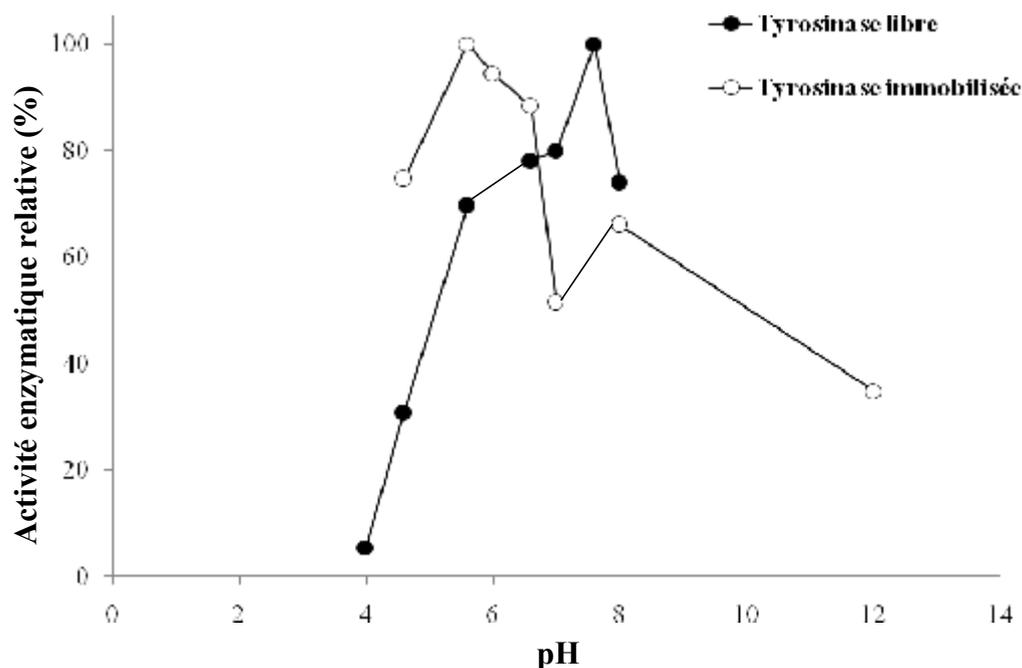


Figure 30: Effet du pH sur l'activité de la tyrosinase libre et de la tyrosinase immobilisée (phénol à 2.5 mM ; 35°C).

L'activité enzymatique maximale est marquée aux pH 5.5-7.5 pour la tyrosinase libre et la tyrosinase immobilisée, respectivement. Ce déplacement du pH optimal de deux unités vers le domaine acide peut être expliqué par l'effet répulsif entre le support d'immobilisation chargé négativement et l'ion phénolate aux pH alcalins limitant ainsi la diffusion du substrat.

Lorsque le milieu est acide le phénol portera une charge partielle positive et pourra être attiré par le support d'immobilisation de charge opposée. Une étude réalisée par Munjal et Sawhney, (2002) [151] confirme ce résultat.

Les réactions enzymatiques sont sensibles au pH du milieu car ce facteur influence le degré d'ionisation du substrat, du Co-substrat et de la molécule enzymatique. Cet effet dépend des groupements ionisables participant à la fixation du substrat, à l'acte catalytique et/ou au maintien des structures secondaire et tertiaire de la protéine ; ce qui peut être favorable ou défavorable à l'activité enzymatique [220].

Le pH optimum change avec la source d'enzyme et dépend également du substrat phénolique choisi pour l'analyse, mais il peut également être affecté par le type du tampon et la pureté de l'enzyme; la forme d'isoenzyme, l'espèce végétale (genre et le cultivar) ; l'origine du matériel, la méthode d'extraction, et de la maturité du fruit [57, 67, 119, 198, 221].

Des différences dans les optimums de pH de la tyrosinase avec divers substrats ont été rapportées. Elles changent de 4 à 7,8 selon l'origine du matériel, de la méthode d'extraction et du substrat [222]. Il a été signalé aussi que le pH optimum de la tyrosinase de quelques sources se produit également dans la gamme de pH 6 à 8 [110].

Aylward et Haisman [223] ont rapportés que pH optimal pour l'activité maximum de la tyrosinase varie 4 à 7 dépendant de la méthode d'extraction, des substrats, et de la localisation de l'enzyme dans la cellule. La tyrosinase obtenue à partir de plusieurs sources est inactives au-dessous de pH 4

VIII. Effet du diamètre des billes d'alginate sur l'activité de la tyrosinase immobilisée :

L'effet du diamètre des billes d'alginate de calcium sur la vitesse initiale de la tyrosinase immobilisée a été étudiée en utilisant différents diamètres des billes d'alginate : 2,4 ; 3,4; et 4mm. Tout en maintenant les autres paramètres expérimentaux constants.

D'après la Figure (31) on constate que l'activité de l'enzyme immobilisée varie en fonction de diamètre. L'activité de la tyrosinase immobilisée est maximale au diamètre 3.4 mm. De part et d'autre de ce diamètre on observe une diminution d'activité d'environ 30 %.

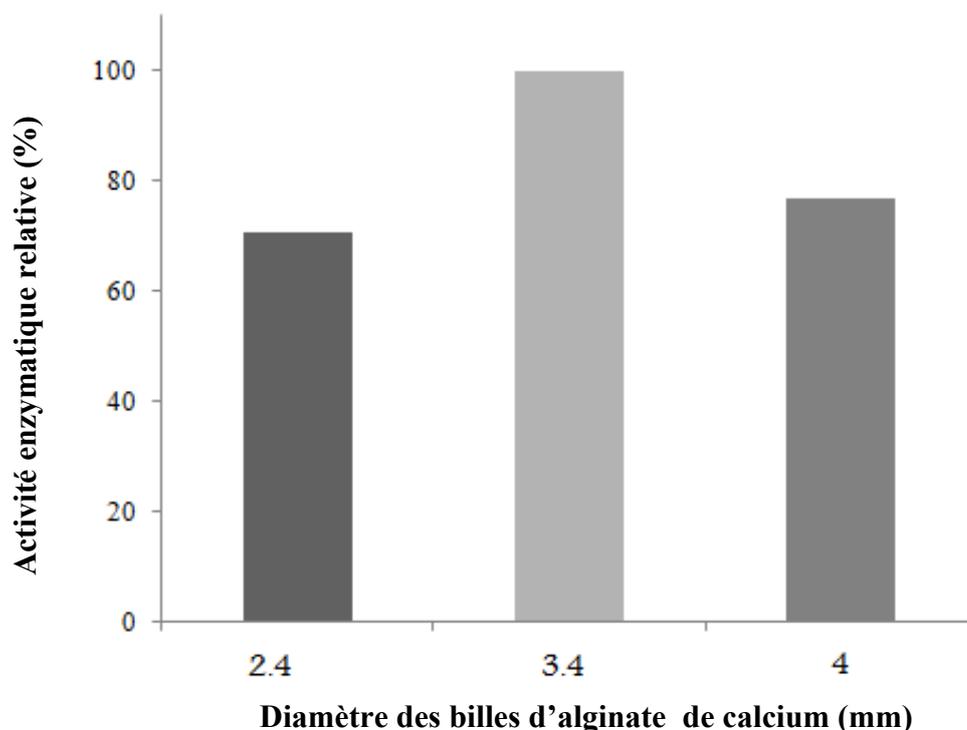


Figure 31 : Effet du diamètre des billes d'alginate l'activité de la tyrosinase immobilisée (phénol à 2.5 mM; pH 6.0 ; 35°C).

Dans le système à tyrosinase immobilisée, le phénol doit diffuser pour que la réaction d'oxydation puisse avoir lieu ; donc la dimension finale du support d'immobilisation a un effet significatif sur l'activité enzymatique. D'autres travaux ont montré que l'activité de l'enzyme immobilisée augmente avec l'abaissement de la dimension des billes et ceci est dû à la diminution de résistance du transfert de masse [163].

Bien que, et en pratique la diminution du diamètre des billes d'alginate peut réduire éventuellement la fuite d'enzyme [224]. Ces résultats peuvent être expliqués par la présence de limitations diffusionnelles qui provoquent l'établissement d'un gradient de concentration du phénol intraparticulaire.

Berset (1993) [225], rapporte qu'il est possible d'accroître la vitesse du transfert de matière en agitant plus fortement le milieu réactionnel ou en réduisant le diamètre des particules de support, ce qui diminue l'épaisseur de la couche limite.

VIII- Etude de la stabilité opérationnelle de la tyrosinase immobilisée :

La perte de l'activité catalytique de la tyrosinase immobilisée a été étudiée.

Malgré sa faible activité par rapport à l'enzyme libre, le gel d'alginate de calcium offre les avantages d'une manipulation aisée et d'un retrait facile de l'enzyme du milieu réactionnel. La tyrosinase immobilisée est robuste mécaniquement et peut être réutilisée avec succès.

D'après la Figure (32), on constate que l'activité de l'enzyme immobilisée varie en fonction du cycle d'utilisation. L'activité de la tyrosinase immobilisée augmente presque deux fois après son deuxième cycle d'utilisation. Après le cinquième cycle de réutilisation des billes d'alginate de calcium contenant la tyrosinase immobilisée, l'activité enzymatique revient à sa valeur initiale.

On a constaté qu'après 2 cycles de réutilisation de l'enzyme immobilisée le diamètre des billes d'alginate a augmenté suite au gonflement du gel ce qui accélère la diffusion interne du substrat et son accessibilité envers l'enzyme (Figure 33). Par conséquent, l'activité enzymatique sera élevée. L'activité de l'enzyme immobilisée revient à sa valeur initiale à partir du 3^{ème} cycle à cause de l'effet inhibiteur des *o*-quinones qui s'accumulent à l'intérieur du gel d'alginate.

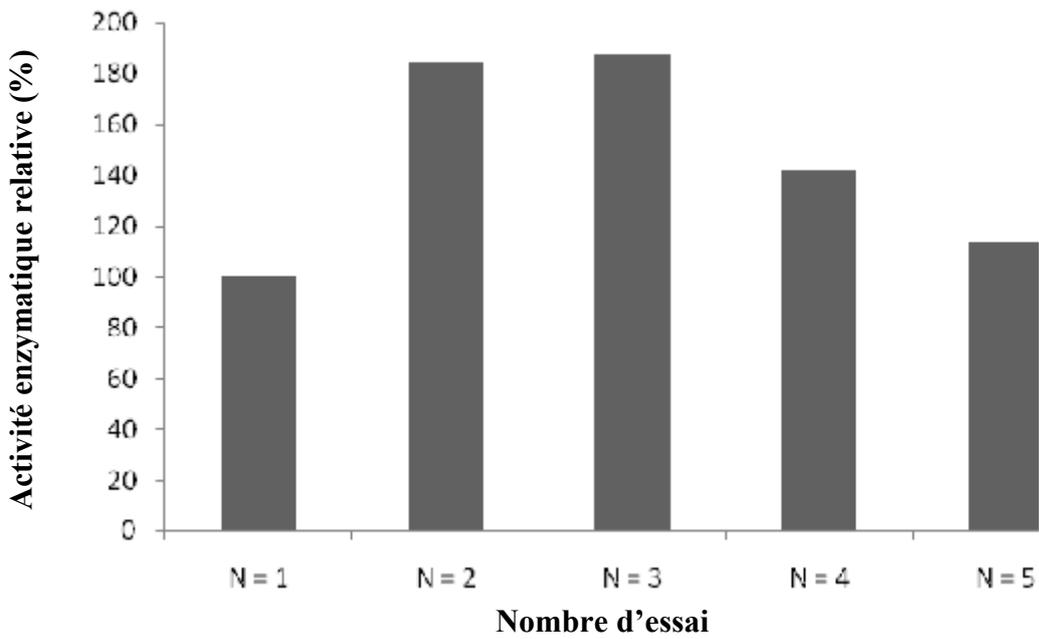
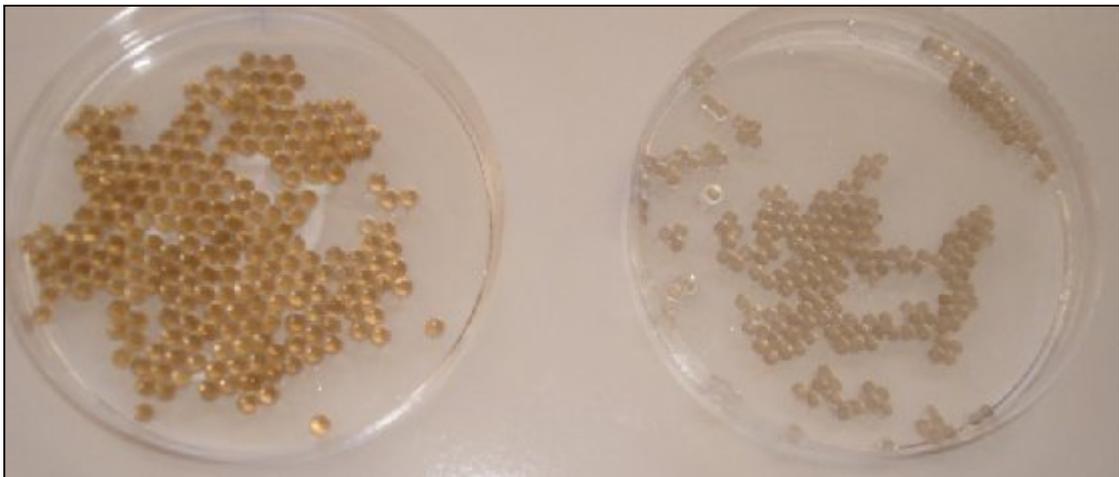


Figure 32 : Stabilité de l'activité de la tyrosinase immobilisée après son réutilisation pour l'oxydation du phénol à 2.5 mM.



5 cycles de réutilisation de la tyrosinase immobilisée.

1 cycle de réutilisation de la tyrosinase immobilisée.

Figure 33: L'aspect des billes d'alginate récupérées après recyclage de la tyrosinase immobilisée.

Conclusion

En conclusion, la tyrosinase a été extraite à partir du champignon de paris (*Agaricus bisporus*) selon une méthode facile à mettre en œuvre. L'extrait brut du champignon possède une activité monophénolase élevée en présence du phénol comme substrat. La tyrosinase était relativement stable pendant son stockage à -15°C. L'activité de la tyrosinase libre est maximale à 45°C et aux pH voisins de la neutralité. La tyrosinase a une grande affinité vis-à-vis du phénol comme substrat.

L'immobilisation de la tyrosinase par inclusion dans le gel d'alginate a provoquée une diminution de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du phénol, une baisse de son activité catalytique et également un déplacement de son pH optimal vers le domaine acide. En outre, l'immobilisation offre à l'enzyme une meilleure thermostabilité.

Cette étude n'est qu'une approche sur la cinétique d'oxydation du phénol en *o*-quinones par la tyrosinase libre et par la tyrosinase immobilisée dans un réacteur « batch » ayant pour but de connaître le comportement cinétique de l'enzyme en systèmes homogène et hétérogène. Cependant, la simple comparaison dans les conditions opératoires identiques (pH, concentration de substrat...) de l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée est insuffisante ; car la caractérisation de la cinétique de l'enzyme immobilisée nécessite la maîtrise de toutes les données concernant le micro-environnement.

Ce travail mérite d'être approfondi par l'exécution des opérations suivantes :

- Purification poussée de l'enzyme à l'aide d'une chromatographie d'affinité sur gel de séphadex.
- L'immobilisation de l'enzyme sur d'autres supports et l'emploi d'une méthode pour éliminer le produit d'oxydation du phénol (*o*-quinone).

Références bibliographiques

- [1]. Crecchio, C; Ruggiero, P; and Pizzigallo, M.D.R. 1993. Polyphenoloxidases Immobilized in Organic Gels: Properties and Applications in the Detoxification of Aromatic Compounds. *Biotechnology and Bioengineering*, 48, 585-591.
- [2]. Shao, J; Ge, H; and Yang, Y. 2007. Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-SiO₂ gel for removal of aqueous phenol. *Biotechnol Lett.* 29:901-905.
- [3]. I.Keisuke. 1999. Characterisation of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. These de doctorat. McGill University, Montreal.
- [4]. Seetharam, G.B; Saville, B.A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Research* 37, 436-440.
- [5]. Ikehata, K; Nicell, J.A. 2000. Characterization of tyrosinase for the aqueous phenols. *Bioresource Technology* 74, 191-199.
- [6]. Bevilaqua, J.V; Cammarota, M.C; Freire, D.M.G; and Sant'Anna Jr G.L. 2002. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19, 151-158.
- [7]. Seung-Goo, L; Seung_Pyo, H; Moon-Hee, S. 1996. Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable β -tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology.* 19:374-377.
- [8]. Gandía-Herrero, F; Jiménez-Atiéndzar, M; Cabanes, J; Garcia-Carmona, F and Escribano, J. 2005. Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.*, 386, 601-607.
- [9]. Ensuncho, L; Alvarez-Cuenca, M; Legge, R.L. 2005. Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. *Bioprocess Biosyst Eng.* 27: 185-191.
- [10]. Gianfreda, L; Sannino, F; Rao, M.A; Bollag, J-M. 2003. Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. *Water Research* 37, 3205-3215.
- [11]. Shao, J; Ling-Ling, H; and Yu-Min, Y. 2008. Immobilization of polyphenol oxidase on alginate- SiO₂ hybrid gel: stability and preliminary applications in the removal of aqueous phenol. *J Chem Technol Biotechnol* 10, 2086-2089.
- [12]. Tong, Z; Quingxiang, Z; Hui, H; Quin, L; and Zhang, Y. 1997. Removal of toxic phenol and 4chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase. *Chemospher* 34, 893-903.

- [13]. Karam, J; Nicell, J.A. 1997. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol* 69, 141-153.
- [14]. Casañola-Martín, G.M; Khan, M.T.H; Marrero-Ponce, Y; Ather, A; Sultankhodzhaev, M.N and Torrens, F. 2006. New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 324-330.
- [15]. Faria, R.O. Moure? V.R; and Mitchell, D.A. 2007. The biotechnological Potential of Mushroom Tyrosinases. *Food Technol. Biotechnol*, 45, 287-294.
- [16]. Steffens, J.C; Harel, E; Hunt, M.D; Thipyapong, P. 1998. Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87). 223-250.
- [17]. Jolivet, S; Arpin, N; Wichers, H.J and Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102, No. 12, 1459-1483.
- [18]. Klibanov, A.M. 1986. Enzymes that work in organic solvents. *Chemtech.* 34, 354-359.
- [19]. Aberg, C.M; Chen, T; Olumide, A; Raghavan, R.S and Payne, G.F. 2004. Enzymatic Grafting of Peptides from Casein Hydrolysate to Chitosan. Potential for Value-Added By products from Food-Processing Wastes. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 788-793.
- [20]. Burton, S.G. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today* 22. 459-487.
- [21]. Chen, X; Cheng, G and Dong, S. 2001. Amperometric tyrosinase biosensor based on a sol-gel-derived titanium oxide-copolymer composite matrix for detection of phenolic compounds. *Analyst*, 126, 1728-1732.
- [22]. Fenoll, L.G; Rodriguez-Lopez, J.N; Garcia-Molina, F; Garcia-Canivas, F; Tudela, J. Michaelis constants of mushroom tyrosinase with respect to oxygen in the presence of monophenols and diphenols. 2002. *The international Journal of Biochemistry and Cell biology* 34, 332-336.
- [23]. Orenes-Pinero, E; Garcia-Carmona, F; Sanchez-Ferrer, A. 2006. Kinetic characterization of activity of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 158-163.

- [24]. Khan, A.A; Husain, Q. 2007. Decolorization and removal of textile and non-textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent by using potato (*Solanum tuberosum*) soluble and immobilized polyphenoloxidase. *Bioresource Technology* 98, 1012–1019.
- [25]. Busc, G; Berardinelli, S ; Resini, C ; Arrighi, L. 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *Journal of Hazardous Materials* 160, 265-288.
- [26]. Horch, R; Spilker, G; and Stark, G.B. Phenol burns and intoxications. 1994. 45-50.
- [27]. Environnement et Santé Canada .2000. Liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport d'évaluation : Phénol. Publ. No de cat. En40-215/45F. ISBN 0-662-84220-0.
- [28]. RAPPORT D'ETUDE N^o 06DR058. 2008. Seuils de toxicité aigue (phenol). INERIS-DRC-ETSC-N^o470218-05DR058.
- [29]. C. Horn, Phénol, [www2.gtz.de/uvp/publika/French/Vol363\(1989\).htm](http://www2.gtz.de/uvp/publika/French/Vol363(1989).htm).
- [30]. M. Mortier, P. Vansina, B. Gielens .2004. Phénol. Check-list, SPF Emploi, Travail et Concertation Sociale, Contrôle du Bien-être au Travail, Division du contrôle des risques chimiques. CRC/CL/0011-F version 1.0. SPF Emploi, crc@meta.fgov.be.
- [31]. A. PICHARD.2005. Phénol. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS–DRC-01-25590-01DR021. N^o2-1.
- [32]. Phénols et Quinones. 2001. Cours de chimie générale et organique - G. Dupuis - Lycée Faidherbe de LILLE.
- [33]. RISK ASSESSMENT. 2002. Phénol. CAS-No.: 108-95-2 .EINECS-No.: 203-632-7.
- [34]. BCERC COTC Fact Sheet – Phenols, [www.bccrc.org/cotc\(2007\).htm](http://www.bccrc.org/cotc(2007).htm).
- [35]. Nadavala, S.K; Swayampakula, K; Boddu, V.M; Abburi. 2009. Biosorption of phenol and o-cholorophenol from aqueous solutions on to chitosan-calcium alginate blended beads. *Journal of Hazardous Materials* 162, 482-489.
- [36]. Health and Safety Guide No. 88. 1994. PHENOL HEALTH AND SAFETY GUIDE. IPCS-INCHEM. ISBN 92 4 151088 9 -ISSN 0259-7268.
- [37]. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR PHENOL.2008. ATSDR. Atlanta, Georgia 30333.
- [38]. Yamada, K; Akiba, Y; Shibuya, K; Kashiwada, A; Matsuda, K; and Hirata, M. 2005. Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog* 21, 823-829.

- [39]. Nuhoglu, A; Yalcin, B. 2005. Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry* 40, 1233-1239.
- [40]. A. Namane. 2006. Adsorption- biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilise sur du charbon actif en grains. Thèse de Doctorat, ENP El Harrach, Alger.
- [41]. Les normes européennes. C.I.eau. [www.cieau\(2005\).com](http://www.cieau(2005).com).
- [42]. Edward, L; Baker, M.D; Philip, J; Landrigan, M.D. 1978. Phenol Poisoning Due to Contaminated Drinking Water.
- [43]. Romanovskaya, I.I; Shesterenko, Y.A; and Sevast'yanov, O.V. 2009. Elimination of Phenol with the Use of Tyrosinase of Fungi. *Journal of Water Chemistry and Technology*, 31, 135-138.
- [44]. JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 26. 2006. WWW. JORADP. DZ.
- [45]. Oueslati, M.A; Haddad, M; et Biake, G. 1998. Elimination du phenol par deux plantes aquatiques : *Juncus fontanesii* (Gay) et *Lemna minor* L. *Revue des science de l'eau* , 555-568.
- [46]. Toscano, G; Colarieti, M.L; Greco, G; Jr. 2003. Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives. *Enzyme and Microbial Technology* 33, 47-54.
- [47]. Lopez-Molina, D; Hiner, A.N.P; Tudela, J; Garcia-Canovas, F; Rodriguez-Lopez, J.N. 2003. Enzymatic removal of pheols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Enzyme and Microbial Technology* 33, 738-742.
- [48]. Wada, S; Ichikawa, H; and Tatsumi, K. 1993. Removal of Phenols from Wastewater by Soluble and Immobilized Tyrosinase. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 854-858.
- [49]. Voet, D and Voet, J.G. 1990. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York. Chichester. Brisbane. Toronto. Singapore, 1223 pages.
- [50]. Bandhyopadhyay, K; Das, D; Bhattacharyya; Maiti, B.R. 2001. Reaction engineering studies on biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* MTCC 1194 immobilized on calcium alginate. *Biochemical Engineering Journal* 8, 179-186.
- [51]. Erhan, E; Keskinler, B; Akay, G; Algur, O.F. 2002. Removal of phenol from water by membrane-immobilized enzymes. *Journal of Membrane Science* 206, 361-373.

- [52]. Rodakiewicz-Nowark. 2000. Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media. *Topics in Catalysis* 11/12, 419-434.
- [53]. Ikehata, K; and Nicell, J.A. 2000. Color and Toxicity Removal following Tyrosinase-Catalyzed Oxidation of Phenols. *Biotechnol. Prog.*, 16, 533-540.
- [54]. S. Cheriot. 2007. Rôle de la réaction de maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatic des phénols et des lipides. Thèse de doctorat. *F-75141 Paris*.
- [55]. S. Bernillon. 2005. Stratégie d'étude de produits de l'oxydation de polyphénols par LC/MS : application au jus de pomme. Thèse de doctorat. N° 3069, Université de Rennes I.
- [56]. Siegbahn, P.E.M. 2003. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem* 8: 567-576.
- [57]. Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science), 217-273.
- [58]. Decker, H and Terwilliger N. 2000. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology* 203, 1777-1782.
- [59]. Solomon, E.I; Sundaram, U.M and Machonkin T.E. 1996. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2563-2605.
- [60]. Solomon, E.I; Chen, P; Metz, M; Lee, S-K; and Palmer, A.E. 2001. Oxygen Binding, Activation and Reduction to Water by Copper Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 4570-4590.
- [61]. Chen, P and Solomon, E.I. 2004. O₂ activation by binuclear Cu sites: Noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms. *Pnas. Perspective*.101. 13105-13110.
- [62]. Fenoll, L.G; Peñalver, M.J; Rodríguez-López, J.N; García-Ruiz, P.A; García-Cánovas, F and Tudela, J. 2004. Deuterium Isotope Effect on the oxidation of Monophenols and o-Diphenols by Tyrosinase. *Biochem. J.* 380, 643-650.
- [63]. Hatcher, L.Q and Karlin, K.D. 2004. Oxidant types in copper-dioxygen chemistry: the ligand coordination defines the Cu_n-O₂ structure and subsequent reactivity. *J Biol Inorg Chem.* 9: 669-683.

- [64]. Whitaker, J.R. 1995. Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman and Hall, 1995. 271-307.
- [65]. Mayer, A.M.; HAREL, E. 1991. Phenoloxidasés and their Significance in Fruit and Vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science. 373-398.
- [66]. Siegbahn, P.E.M. 2004. The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem*. 9: 577-590.
- [67]. Sánchez-Ferrer, Á; Rodríguez-López, J.N; García-Cánovas, F; García-Carmona, F. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1247. 1-11.
- [68]. Fenoll, L.G; Rodríguez-López, J.N; Varón, R; García-Ruiz, P.A; García-Cánovas, F and Tudela, J. 2000. Action Mechanism of Tyrosinase on *meta*-and *para*-Hydroxylated Monophenols. *Biol. Chem.*, 381, 313-320.
- [69]. Nelson, R.M and Mason, H.S. 1970. Tyrosinase (mushroom). In *Methods in Enzymology* (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.), 17, 626-632. Academic Press, New York.
- [70]. Schoenbein, C.F. 1856. On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine* 11, 137-141.
- [71]. Lerch, K. 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β -monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. Marcel Dekker, New York, Basel, 143-86.
- [72]. Bonner, Jr W.D. 1956. Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*, 8: 427-452.
- [73]. Keilin, D and Mann, T. 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.*, Vol. 125, pp. 187-204.
- [74]. Rescigno, A; Sollai, F; Pisu, B; Rinaldi, A and Sanjust, E. Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 17 (4), 207-218.
- [75]. Dawson, C.R and Magee, R.J. 1955. Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*, 2. 817-831.

- [76]. Tomás-Barberán, F.A and Espín, J.C. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81, 853-876.
- [77]. Hammond, J.B.W and Nichols, D.A. 1976. Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.: changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. *Journal of General Microbiology*., 93, 309-320.
- [78]. Sugumaran, M; Dali, H; Semensi, V; and Hennigan, B. 1987. Tyrosinase-catalyzed Unusual Oxidative Dimerization of 1,2-Dehydro-*N*-acetyldopamine. *The Journal of Biological Chemistry*. 262, 10546-10549.
- [79]. Rivas, N.D.J and Whitaker, J.R. 1973. Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*. 52, 501-507.
- [80]. Liu, Z; Deng, J; Li, D. 2000. A new tyrosinase biosensor based on tailoring the porosity of Al₂O₃ sol-gel to co-immobilize tyrosinase and the mediator. *Analytica Chimica Acta*. 407, 87-96.
- [81]. Metzler, D.E. 1977. *Biochemistry. The chemical Reactions of Living Cells*. Academic Press, INC, New York San Francisco London, 1129 pages.
- [82]. Mayer, A.M. 1987. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants-Recent progress. *Phytochemistry*, 26, 11-20.
- [83]. Granata, A; Monzani, E; Bubacco, L; and Casella, L. 2005. Mechanistic Insight into the Activity of Tyrosinase from Variable-Temperature Studies in an Aqueous/Organic Solvent. *Chem. Eur. J*. 12, Issue 9, 2504-2514.
- [84]. Cho, Y.K and Ahn, H.K. 1999. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato : I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry* 23. 577-592.
- [85]. Rodakiewicz-Nowak, J and Ito, M. 2003. Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 78, Issue 7, 809-816.
- [86]. Dicko, M.H; Hilhorst, R; Gruppen, H; Laane, C; Van Berkel, W.J.H; and Voragen, A.G.J. 2002. NOTE & TIPS. Zymography of Monophenolase and o-Diphenolase Activities of Polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry* 306, 336-339.

- [87]. Thomas, P and Janave, M.T. 1986. Isoelectric Focusing Evidence for Banana Isoenzymes with Mono and Diphenolase Activity. *Journal of food science*. 51, 384-387.
- [88]. Van Gelder, C.W.G; Flurkey, W.H and Wichers, H.J. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45, 1309-1323.
- [89]. Chen, L and Flurkey, W.H. 2002. Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry*. 5, 109-120.
- [90]. Piao, L.Z; Park, H.R; Park, Y.K; Lee, S.K; Park, J.H and Park, M.K. 2002. Mushroom Tyrosinase Inhibition Activity of Some Chromones. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 309-311.
- [91]. Beelman, R.B and Simons, S.S. 1996. Influence of Selected Cultural Factors on Relative Tyrosinase Activity in Cultivated Mushrooms. *World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products WSMBMP. The 2nd ICMBMP*. 1-9.
- [92]. Palmer, J.K. 1963. Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology*. 508-513.
- [93]. Sojo, M.M; Nuñez-Delicado, E; García-Carmona, F; and Sánchez-Ferrer, A. 1998. Partial Purification of a Banana Polyphenol Oxidase Using Triton X-114 and PEG 800 for Removal of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4924-4930.
- [94]. Ôba, K; Iwatsuki, N; Uritani, I; Alvarez, A.M; and Garcia, V.V. 1992. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes in Banana Bud. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1027-1030.
- [95]. Yang, C-P; Fujita, S; Ashrafuzzaman, M.D; Nakamura, N; and Hayashi, N. 2000. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Pulp. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2732-2735.
- [96]. Cho, Y.K and Ahn, H.K. 1999b. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato : II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry* 23. 593-605.
- [97]. Marri, C; Frazzoli, A; Hochkoeppler, A; Poggi, V. 2003. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry* 63, 745-752.

- [98]. Pathak, S.U and Ghole, V.S. 1994. Affinity purification and properties of polyphenol oxidase from *Solanum Tuberosum* AFFINITY . Phytochemistry, 36, 1165-1167.
- [99]. Matheis, G. 1987a. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 11, 5-12.
- [100]. Matheis, G. 1987b. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic Browning and Potato Constituents. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 11, 33-41.
- [101]. Golbeck, J.H and Cammarata, K.V. 1981. Spinach Thylakoid Polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme.. Plant Physiol. 67, 977-984.
- [102]. Ziyen, E and Pekyardimci, Ş. 2003. Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). Turk J Chem 27, 217-225.
- [103]. Patil, S.S and Zucker, M. 1965. Potato Phenolases, purification and properties. The Journal Of Biological Chemistry. 240, 3938-3943.
- [104]. Duckworth, H.W and Coleman, J.E. 1970. Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. The Journal of Biological Chemistry. 245, 1613-1625.
- [105]. Frieden, E and Ottesen, 1959. A Simplified method for the purification of mushroom polyphenol oxidase. Short Communications. 34, 248-251.
- [106]. Papa, G; Pessione, E; Leone, V; and Giunta, C. 1994. *Agaricus Bisporus* Tyrosinase-I. Progress made in preparative methods. Int. J. Biochem. 26. 215-221.
- [107]. Smith, J.L and Krueger, R.C. 1962. Separation and Purification of the Phenolases of the Common Mushroom. The Journal of Biological Chemistry. 237, 1121-1128.
- [108]. Papa, G; Pessione, E; Leone, V; and Giunta, C. 1994. *Agaricus Bisporus* Tyrosinase-II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase. Int. J. Biochem. 26, 223-228.
- [109]. Ziyen, E; Pekyardimci, S. 2004. Purification and Characterization of Pear (*Pyrus communis*) Polyphenol oxidase. Turk J Chem. 28. 547-557.

- [110]. Yağar, H; Sağıroğlu, A. 2002. Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince. *Turk J Chem.* 26, 97-103.
- [111]. Wong, T.C; Luh, B.S; and Whitaker, J.R. 1971. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes of Clingstone Peach. *Plant Physiol.* 48, 19-23.
- [112]. Chevalier, T; Rigal, D.D; Mbéguié-A-Mbéguié, D; Gauillard, F; Richard-Forget, F; and Fils-Lycaon, B.R. 1999. Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, 119, 1261-1269.
- [113]. Shi, C; Dai, Y; Xia, B; Xu, X; Xie, Y; and Liu, Q. 2001. The Purification and Spectral Properties of Polyphenol Oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 381a-381h.
- [114]. Anderson, J.W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, 7, 1973 - 1988.
- [115]. Claus, H and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29. Issue 1, 3-14.
- [116]. Yamaguchi, M; Hwang, P.M & Campbell, J.D. 1970. Latent o-diphenol oxidase in mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Canadian Journal of Biochemistry* 48, 198-202.
- [117]. Zhang, X and Flurkey, W.H. 1997. Phenoloxidases in *Portabella Mushrooms*. *Journal Of Food Science.* 62, 97-100.
- [118]. Della Longa, S; Ascone, I, Bianconi, A; Bonfigli, A; Congiu Castellano, A; Zarivi, O and Miranda, M. 1996. The Dinuclear Copper Site Structure of *Agaricus bisporus* Tyrosinase in Solution Probed by X-ray Absorption Spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 21025–21030.
- [119]. Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- [120]. Kim, J.Y; Seo, Y.S; Kim, J.E; Sung, S-K, Song, K.J, An, G; Kim, W.T. 2001. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Science*, 161. 1145-1152.

- [121]. Vaughn, K.C and Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112. Copenhagen.
- [122]. Rast, D.M; Baumgartner, D; Mayer, C; Hollenstein, G.O. 2003. Cell wall-associated enzyme in fungi. *Phytochemistry*, 64. 339-366.
- [123]. Kong, K-H; Hong, M-P; Choi, S-S; Kim, Y-T; and Cho, S-H. 2000. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 113-118.
- [124]. Gouzi, H and Benmansour, A. (2007). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International journal of chemical reactor engineering*, 5, 1-11.
- [125]. Atlow, S.C; Bonadonna-Aparo, L; Klibanov, A.M. 1984. Dephenolization of Industrial Wastewaters Catalyzed by Polyphenol Oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 599-603.
- [126]. Robb, D.A. 1984. Tyrosinase. *In copper Proteins and Copper Enzymes*, ed. R. Lontie. CRC Press, Boca Raton, Florida, 207-241.
- [127]. Mayer, A.M and Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 18, 193-215.
- [128]. Bonner, W.D. 1955. *Plant Physiol.*, 30, XXX.
- [129]. Malkin, B.D; Thickman, K.R; Markworth, C.J; Wilcox, D.E; and Kull, F.J. 2001. Inhibition of Potato Polyphenol oxidase by Anions and Activity in Various Carboxylate Buffers (Ph 4.8) at Constant Ionic Strength. *J. Enzyme Inhibition*, 16, 135-145.
- [130]. Muller, L.A; Hinz, U; and Zrýd, J-P. 1996. Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*, 42. 1511-1515.
- [131]. Warrington, J.C and Saville, B.A. 1999. Tyrosinase Inactivation Organic Solvents. *Biotechnology And Bioengineering*, 65, 325-333.
- [132]. Jolley, R.L; Evans, LH; Makino, N; and Mason, H.S. 1974. Oxytyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 249, No. 2, pp. 335-345.
- [133]. Strothkamp, K.G; Jolley, R.L and Mason, H.S. 1976. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical and biophysical research* .70, 519-524.

- [134]. Fan, Y and Flurkey, W.H. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry* 65, 671-678.
- [135]. Haghbeen, K; Saboury, A.A; Karbassi, F. 2004. Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1675. 139-146.
- [136]. Shipovskov, S; Levashov, A. 2003. Tyrosinase: Polybrene Noncovalent Complexes in Water-Ethanol Mixtures. *Biotechnology and bioengineering*. 84, 258-263.
- [137]. Klabunde, T; Eicken, C; Sacchettini, J.C and Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *nature structural biology*, 5, 1084-1090.
- [138]. Huang, X-H; Chen, Q-X, Wang, Q; Song, K-K; Wang, J; Sha, L; Guan, X. 2006. Inhibition of the activity of mushroom tyrosinase by alkylbenzoic acids. *Food Chemistry* 94. 1-6.
- [139]. Rodríguez-López, J.N; Ros, J.R; Varón, R and García-Cánovas, F. 1993. Oxygen Michaelis constants for tyrosinase. *Biochem. J.* 293, 859-866.
- [140]. Rodríguez-López, J.N; Tudela, J; Varón, R; García-Carmona, F; and Garcia-Cánovas, F. 1992. Analysis of a Kinetic Model for Melanin Biosynthesis Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 267, 3801-3810.
- [141]. Valero, E; Varón, R and García-Carmona, F. 2002. Tyrosinase-Mediated Oxidation of Acetaminophen to 4-Acetamido-o-Benzoquinone. *Biol. Chem*, 383, 1931-1939.
- [142]. Espín, J.C; Varón, R; Tudela, J; and Garcia-Cánovas, F. 1997. Kinetic study of the oxidation of 4-hydroxyanisol catalyzed by tyrosinase. *Biochemistry and molecular biology international*. 41, 1265-1276.
- [143]. Eicken, C; Krebs, B and Sacchettini, J.C. 1999. Catechol oxidase – structure and activity. *Catalysis and regulation. Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.
- [144]. Nosanchuk, J.D; Casadevall, A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis, *Cell Microbiol*. 5, 203-223.
- [145]. Sun, W-Q., Payne, G.F., Moas W, S.G.L., Chu, J.H., Wallace, K.K. 1992. Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater. *Biotechnol. Prog.* 8, 179-186.

- [146]. Yağar, H and Sağıroğlu, A. 2002. Non-covalent immobilization of Quice (*Cydonia oblonga*) Polyphenol oxidase on alumina.. *Acta Chim. Slov.* 49, 893-902.
- [147]. Burton, S.G. 2001. Development of bioreactors for application of biocatalysts in biotransformations and bioremediation. *Pure Appl. Chem*, 73, 77-83.
- [148]. Durán, N; Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in waste-water and soil treatment: a review, *Appl. Catal. B: Environ.* 28, 83-99.
- [149]. Carvalho, G.M.J., Alves, T.L.M., Freire, D.M.G. 2000. L-DOPA production by immobilized tyrosinase. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 84, 791-800.
- [150]. Chu, H-L; Yeh, D-B and Shaw, J-F. 1993. Production of L-DOPA by banana leaf polyphenol oxidase. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 34, 57-60.
- [151]. Munjal, N and Sawhney, S.K. 2002. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatine gels. *Enzyme and Microbial Technology*. 30, 613-619.
- [152]. Ros, J.R; Rodríguez-López, J.N; and García-Cánovas, F. 1993. Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* 295, 309-312 (Printed in Great Britain).
- [153]. Vieira, I.D.C and Fatibello-Filho, O. 1999. L-Cysteine determination using a polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure. *Analytica Chimica Acta* 399. 287-293.
- [154]. El-Bayoumi, M.A and Frieden, E. 1957. A Spectrophotometric Method for the Determination of the Catecholase Activity of Tyrosinase and Some of its Applications. 79, 4854-4858.
- [155]. Pena, N., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. 2001. Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase-modified reticulated vitreous carbon electrodes. *Talanta*, 55, 179-187.
- [156]. Wang, G; Aazaz, A; Peng, Z; Shen, P. 2000. Cloning and overexpression of a tyrosinase gene *mel* from *pseudomonas maltophilia*, *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 23-27.

- [157]. Ingebrigtsen, J; Kang, B; & Flurkey, W.H. 1989. Tyrosinase activity and isoenzymes in developing mushrooms. *Journal of Food Science* 54, 128-131.
- [158]. Marconi, W. 1989. Immobilized enzymes: Their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. *Reactive Polymers*, 11, 1-19.
- [159]. Ates, S; Cortenlioglu, E; Bayraktar, E; Mehmetoglu, U. 2007. Production of L-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 638-687.
- [160]. Palmieri, G; Glardina, P; Desiderio, B; Maezullo, L; Giamberini, M; and Sannia, G. 1994. A new enzyme immobilisation procedure using copper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme Microb. Technol*, 16.
- [161]. Duran, N; Rosa, M.A; Annible, A; Gianfreda, L. 2002. Application of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 907-931.
- [162]. M.An. 1999. Domestic Wastewater Treatment Using Immobilized Sludge Process. Thèse de Magistère. University of British Columbia.
- [163]. Won, K; Kim, S; Kim, K.J; Park; H.W; and Moon, S.J. 2005. Optimisation of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads, *Process Biochemistry* 40, 2149-2154.
- [164]. B. Doumèche (2002). Fundamental phenomenological description and experimental Optimisation of gel-stabilized biocatalysts in a two-phase system. These de doctorat. RWTH-Aachen, Allemagne.
- [165]. Chaplin, M. 2002. Enzyme technology.
- [166]. Durand, G; et Monsan, P. 1982. Biochimie appliqué: Les enzymes production et utilisation industrielle: *Bordas*, Paris.
- [167]. Milovanovic A; Bozica N.and Vujcicb Z. 2007. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads, *Food chemistry* 104, 81-86.
- [168]. Coutouly, G. 1991. Génie enzymatique : *Masson et Doin, Paris*.
- [169]. Figrella. J et Zonsains. F. 1992. Biotechnologie principes et méthodes.
- [170]. Chibata, T. 1990. Immobilized biocatalyst.
- [171]. Brusk, F; Breford, J; and Vorlop, K-D. 1998. Bioencapsulation, alginate et extrusion par coupure de jet.
- [172]. Loncle, D. 1992. Génie enzymatique.
- [173]. Pelmont, J. 1993. Enzymes: Office des publications universitaires; Alger. 24-27.

- [174]. Linden, G; et Lorient, D. 1994. Biochimie agroindustrielle : Valorisation alimentaire de la production agricole : *Masson*; Paris.
- [175]. Alais, C; et Linden, G. 1997 Abrégé de biochimie alimentaire : *Masson*, Paris. 31-33
- [176]. Bruneton, J. 1993. Pharmacognosie phytochimie, Plantes médicinales : 2^{ème} Edition, *Technique et Documentation-Lavoisier*.
- [177]. Kallepalli, R. 1995. Recovery of copper by copolymer gel and polymer regeneration by electrowinning and exchange technologies.
- [178]. Wang.N.S. 1996. Experiment N.O. 7B Enzyme immobilization protocol entrapment in alginate gel.
- [179]. Bergamasco, R; Bassetti, F.J; de Moraes, F.F; and Zanin, G.M. 2000. Characterization Of Free And Immobilized Invertase Regarding Activity And Energy Of Activation, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17 (N^o 4-7).
- [180]. Ohmri, Y; Kurokawa, Y. 1994. Preparation of fibre-entrapped enzyme using cellulose acetate-titanium-iso-propoxide composite as gel matrix: Elsevier Science B.V. 205-208.
- [181]. Garde, V.L. 1997. Enzyme en agroalimentaire: *Technique et Documentation*.
- [182]. Scriban, R. 1993 *Biotechnologie*; Edition : *Lavoisier*; Paris.
- [183]. Reatz, E; et Bauer, W. 2001. Fermentations et technology enzymatique. Université de Lausanne.
- [184]. Motulsky H; Christopoulos, A. 2003. Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad PRISM. Version 4.0.
- [185]. Burtis, C.A; Ashwood, E.R; Bruns, D.E. 2008. Fundamentals of clinical chemistry. 6^{ème} Edition. ISBN: 978-0-7216-3865-2.
- [186]. Valero, E; Carrion, P; Varon, R; and Garcia-Carmona, F. 2003. Quantification of acetaminophen by oxidation with tyrosinase in the presence of Bresthorn's hydrazone. *Analytical Biochemistry* 318, 187-195.
- [187]. Scchi, G; Bouchy, M; Foucaut, J-F; Zahraa, O. 1996. Cinétique et catalyse : *Technique et Documentation*; Paris.
- [188]. Lehninger, AL. 1977. Biochimie. Flammarion Medecine-Sciences, second édition, France, 1088 pages.
- [189]. Patnaik, P.R. 2002. Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 198-200.

- [190]. Amaya-Delgado, L; Hidalgo-Lara, M.E; and Montes-Hocasitas, M.C. 2006. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads, *Food chemistry* 99, 299-304.
- [191]. Lineweaver, H and Burk, D. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. 56, 658-666.
- [192]. Boyer, A. 1993. Kinetic Analysis of an Enzyme, Tyrosinase. *Journal of Chemical Education*.
- [193]. Raisonnier, A.2002. *Enzymologie élémentaire*. Université de Paris.VI.
- [194]. Sanjay, G; and Sugunan S. 2005. Invertase immobilised on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching, *Cataysis Communications* 6, 81-86.
- [195]. Palmer, T. 1985. UNDERSTANDING ENZYMES. Second Edition. Ellis Horwood Series. British Library. Chichester, England. 161, 162, 297, 299, 314-331,
- [196]. Palumbo, A; Misuraca, G; D'ischia, M; and Prota, G. 1985. Effect of metal ions on the kinetics of tyrosine oxidation catalysed by tyrosinase. *Biochem. J.* 228, 647-651.
- [197]. Doğan, S; Turan, Y; Ertürk, H; and Arslan, O. 2005. Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem*, 53, 776-785.
- [198]. Xu, J; Zheng, T; Meguro, S. 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Catanea henryi*). *J Wood Sci* 50: 260-265.
- [199]. Wichers, H.J; Peetsma, GJ; Malingré, T.M and Huizing, H.J. 1984. Purification and properties of a phenol oxidase derived from suspension cultures of *Mucuna pruriens*. *Planta* 162: 334-341.
- [200]. Zhang, J; Kjonaas, R; Flurkey, W.H. 1999. Does *N*-hydroxyglycine inhibit plant and fungal laccases?. *Phytochemistry* 52. 775-783.
- [201]. Cooksey, C.J; Garratt, P.J; Land, E.J; Ramsden, C.A and Riley, P.A. 1998. Tyrosinase kinetics: failure of the auto-activation mechanism of monohydric phenol oxidation by rapid formation of a quinomethane intermediate. *Biochem. J.* 333, 685-691.

- [202]. Cooksey, C.J; Garratt, P.J; Land, E.J; Pavel, S; Ramsden, C.A; Riley, P.A; and Smit, N.P.M. 1997. Evidence of the Indirect Formation of the Catecholic Intermediate Substrate Responsible for the Autoactivation Kinetics of Tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 26226-26235.
- [203]. Long, T.J; Och, F.F; and Alben, J.O. 1971. Spectrophotometric Determination of Monophenolase Activity of Tyrosinase Isozymes. *Archives of biochemistry and biophysics*. 146. 64-70.
- [204]. Espin, J.C; Van Leeuwen, J; Wichers, H.J. 1999. Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. *J. Ag. Food Chem.* 47, 3509-3517.
- [205]. Sharma, N.M; Kumar, S; and Sawhney, S.K. 2003. A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38, 137-141.
- [206]. Richard-Forget, F.C; Goupy, P.M; Nicolas, J.J. 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning: 2. Kinetic studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 2108-2113.
- [207]. Travers, F and Barman, T. 1995. Cryoenzymology: How to practice kinetic and structural studies. *Biochimie*, 77, 937-948.
- [208]. Singh, N; Singh, R; Kaur, K; Singh, H. 1999. Studies of the physico-chemical properties and polyphenoloxidase activity in seeds from hybrid sunflower (*Helianthus annuus*) varieties grown in India. *Food Chemistry* 66. 241-247.
- [209]. Durand, G; et Monson, P. 1974. Actualité scientifique et technique N^o 05 les enzymes immobilisées.
- [210]. Mayer, A.M; Harel, E. 1994. Phenoloxidasés and their significance in fruits and vegetables. In: *Food Enzymology. Volume II* (Ed: Fox, PF) Elsevier Applied Science, London, 163-187.
- [211]. Vu, T. K. H; and Le, V. V. M.2008. Biochemical studies on the Immobilization of the Enzyme invertase (EC.3.2.1.26) in Alginate Gel and its Kinetics, *ASEAN Food journal* 15 (1): 73-78.

- [212]. Dogan, M and Dogan, S. 2003. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *Chaubardii* var. *chaubardii*). *J Food Chem*, 39, 1-9.
- [213]. Wilson, K and Walker, J. 1996. Practical biochemistry Principles and techniques. Fourth edition. Cambridge low price editions. Cambridge university press. 586 pages.
- [214]. Weil, J-H. 2001. Biochimie générale. 9^e édition DUNOD, Paris, 655.
- [215]. Joslyn, M.A and Ponting, J.D. 1951. Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.* 3, 1–44.
- [216]. Khatun, S; Absar, N; and Ashraduzzaman, M. 2001. Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4 (9): 1129-1132.
- [217]. Yemenicioğlu, A. 2002. Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.
- [218]. Tuena de Gómez-Puyou, M and Gómez-Puyou, A. 1998. Enzymes in Low Water Systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 53-89.
- [219]. Amiot, M.J; Flueriet, A; Chenynier, V; Nicolas, J. 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: *Phytochemistry of fruits and vegetables*. (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) Clarendon Press, Oxford, 51-85.
- [220]. Soro, Y. R. 2007. Purification et caractérisation de l'alpha-glucosidase du suc digestif de *Archachatina ventricosa* (Achatinidae); Application à la synthèse de polyglucosylfructosides, INSA de Toulouse N^o d'ordre : 890, 183 pages.
- [221]. Gundogmaz, G; Dogan, S and Arslan, O. 2003. Some Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Obtained from Various *Salvia* Species (*Salvia viridis* L., *Salvia virgata* Jacq. And *Salvia tomentosa* Miller). *Food Sci Tech Int.* 9, No. 4, 0309-7.
- [222]. Yamamoto, K-I; Yoshitama, K and Teramoto, S. 2002. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Callus Cultures of *Portulaca grandifolia*. *Plant Biotechnology*, 19, 95-101.
- [223]. Alyward, F and Haisman, D.R. 1969. Oxidation system in fruits and vegetables-their relation to the quality of pressured products. *Adv. Food Res*, 17, 1-76.

[224]. Dey, G; Singh, B; and Banerjee, R. 2003. Immobilization of α -Amylase Product by *Bacillus circulans* GRS 313. *Brazilian Archives Of Biology and Technology*, 46(2), 157-176.

[225]. Berset C. 1993. Enzymes immobilisées. *In* Biotechnologie, coordonnateur : R. Scriban, 4^{ème} Edition, Paris, France, Tec et Doc-Lavoisier, pages 365-392.

Annexe

Préparation des solutions tampons :

- **Tampon phosphate de sodium pH 5,6 – 8 :**
 - Préparer les solutions suivantes :
 1. 0,05M Na_2HPO_4 (8,9 g/l)
 2. 0,05M KH_2PO_4 (6,8 g/l)
 - Mélanger les solutions précédentes pour avoir les pH suivantes :

Tableau 2 : Préparation du tampon phosphate de sodium.

pH	Na_2HPO_4 (ml)	KH_2PO_4 (ml)
5,6	950	50
6,0	875	125
7,0	390	610
7,6	137,5	862,5
8,0	55	945

- **Tampon acétate de sodium pH 4 – 5,6 :**
 - Préparer les solutions suivantes :
 1. 0,05M acide acétique (2,88 g/l)
 2. 0,05M acétate de sodium (6,8 g/l)
 - Mélanger les solutions précédentes pour avoir les pH suivantes :

Tableau 3 : Préparation du tampon acétate de sodium.

pH	acide acétique (ml)	acétate de sodium (ml)
4	820	180
4,6	510	490
5	296	704
5,6	96	904

ملخص :

محتوى هذا البحث يتمثل في أكسدة الفينول بطريقة إنزيمية ، و ذلك باستعمال Tyrosinase (EC : 1.14.18.1) الحر والمثبت بالاحتواء على دعامة من الجينات الكالسيوم. نشاط الإنزيم الحر مستقر نسبيا لمدة 20 يوما خلال التخزين في درجة حرارة -15⁰م. تم استخراج Tyrosinase من فطر باريس (*Agaricus bisporus*) ويقاس نشاطه الإنزيمي باستعمال جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotomètre) المضبوط على طول موجة 400 نانومتر بإضافة (الفينول) كمادة تفاعل أولية للأنزيم. أنجزت دراسة لمختلف الخصائص الحركية للأكسدة للنظامين. لوحظ أن ثابت K_m ل Michaelis-Menten للأنزيم المحلل (1,3mM) أكبر منه في Tyrosinase الحر (0,6 mM) ، في حين أن V_{max} أقل ب 30 مرة. لوحظ تغير ال PH ودرجة الحرارة المناسبين من 7.6 إلى 5.6 ومن 45 إلى 55⁰C على التوالي بالنسبة ل Tyrosinase الحر والمثبت ، وقد أظهر ال Tyrosinase ثبات حراري كبير بعد التحميل ، كما أن نشاطه الإنزيمي الأقصى قد حدد عندما يكون قطر العريك 3.4 ملليمتر .

مفاتيح : فطر باريس ، *Agaricus bisporus* ، Tyrosinase ، استخراج ، التثبيت بالاحتواء ، الجينات .

Résumé :

L'objectif de ce travail est d'étudier la cinétique d'oxydation du phénol par la tyrosinase (EC : 1.14.18.1) libre et immobilisée dans du gel d'alginate de calcium.

La tyrosinase est extraite à partir du champignon Paris (*Agaricus bisporus*), et son activité enzymatique est mesurée par spectrophotométrie à 400 nm en présence du phénol comme substrat. L'enzyme libre est relativement stable pendant 20 jours de stockage à -15°C.

Une étude des différents paramètres opératoires sur les cinétiques d'oxydation du phénol par les deux systèmes enzymatiques a été faite. La constante de Michaelis-Menten (K_m) pour l'enzyme immobilisée (1,3 mM) est environ deux fois plus élevée par rapport à celle de l'enzyme libre (0,6 mM). Par contre, la vitesse maximale (V_{max}) est 30-fois moins élevée.

Le pH et la température optimaux sont déplacés de 7,6 à 5, 6 et de 45 à 55⁰C, pour la tyrosinase libre et la tyrosinase immobilisée, respectivement. L'enzyme immobilisée semble être plus thermostable et son activité est maximale pour des billes d'alginate d'un diamètre de 3,4 mm.

Mots clés : Champignon Paris, *Agaricus bisporus*, Tyrosinase, extraction, immobilisation, alginate, cinétique.

Abstract:

The aim of this work is to study the kinetics of phenol oxidation by the tyrosinase (EC: 1.14.18.1) soluble and immobilized in beads calcium alginate.

Tyrosinase is extracted from mushroom (*Agaricus bisporus*), and its enzymatic activity is measured by spectrophotometric method at 400 nm using phenol as substrate. Soluble tyrosinase is relatively stable during twenty days of storage at -15°C.

A study of various operating parameters on the kinetics of oxidation of phenol by the both systems was investigated. The value of the Michaelis-Menten (K_m) for the immobilized enzyme (1, 3 mM) is about two times higher compared to that of the soluble enzyme (0, 6 mM). Nevertheless, the maximum velocity (V_{max}) is 30-times lower.

The optimal pH and temperature are shifted from 7, 6 to 5,6 and from 45 to 55°C, for soluble and immobilized tyrosinase, respectively. The immobilized enzyme showed a highest thermal stability and its activity is maximal for alginate beads with a diameter of 3,4 mm.

Keywords: Mushroom, *Agaricus bisporus*, Tyrosinase, extraction, immobilization, alginate, kinetic.