

1. Définition

On appelle ' brunissement enzymatique ' la transformation enzymatique dans ses premières étapes et en présence d'oxygène de composés phénoliques en polymères colorés le plus souvent bruns ou noirs en passant par des teintes intermédiaires de rose ou rouge. Les pigments sombres formés sont désignés par le terme général de mélanines (Yoruk et Marshall, 2003; Jeantet *et al.*, 2006) ; par opposition au brunissement de Maillard qui est de type non enzymatique (Walker et Ferrar, 1998).

2. Déclenchement, conséquences et catalyse du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique peut avoir lieu lors de la croissance des fruits, c'est l'exemple de la datte (de Man, 1999; hui, 2004 ; Eidhin *et al.*, 2005 ; Mann, 2008) ou durant l'endommagement mécanique lors du traitement et des manipulations post récolte (de Man, 1999; Mann, 2008), également lors de la conservation et des transformations technologiques (parage, découpage, broyage pour la préparation des jus, déshydratation, conservation au froid et congélation) (Jeantet *et al.*, 2006). La formation des pigments bruns n'est cependant pas toujours indésirable ; un certain degré de brunissement est en effet recherché lors de la maturation des fruits secs (dattes, pruneaux et raisins) (Jeantet *et al.*, 2006).

Ce phénomène se traduit par l'oxydation et la polymérisation des composés phénoliques comme résultat de l'activité enzymatique de phénoloxydases (PPO) et/ou de peroxydases (POD) pouvant conduire à la formation de pigments bruns.

Après tout traitement endommageant les cellules, comme la blessure suite à la conservation au froid conduisant à des dommages de la membrane des organites tels que les vacuoles, les composés phénoliques vacuolaires peuvent alors se mettre en contact avec la PPO ; ce qui conduit à leur oxydation rapide (de Rigal, 2001) et alternativement, les cellules peuvent réagir au froid par dépôt de composés phénoliques dans les parois cellulaires, qui vont alors réagir avec la PPO déjà présente dans les apoplastes (Chazarra *et al.*, 2001 ; Nguyen *et al.*, 2003).

Ce phénomène est accompagné de la perte des qualités nutritionnelles, fonctionnelles et organoleptiques, se traduisant par l'assombrissement, la diminution de la fermeté et l'altération de la saveur (Zawistowsky *et al.*, 1991). Toutefois, le brunissement dans d'autres cas comme dans le traitement du thé noir (Eskin 1990; Ullah, 1991), le café (Amorim et Melo, 1991) et le cacao (Lee *et al.*, 1991; Lopez et Dimick 1991) est bénéfique dans une certaine mesure car il améliore la qualité des boissons à travers les produits savoureux formés (Yoruk et Marshall, 2003).

Le brunissement enzymatique s'installe au sein de la datte après sa récolte et augmente avec des teneurs élevées en eau de ce fruit ; cela constitue l'un des facteurs de désordre physiologique de la datte conduisant à une altération de sa qualité et par conséquent une diminution de sa valeur marchande (Yahia et Kader, 2011). Sachant que les phénols oxydés lors du brunissement sont responsables en partie de la saveur et de la couleur des fruits et légumes (Shahidi et Naczk, 2004). La formation de pigments jaunes et bruns au sein des fruits au cours des réactions de brunissement enzymatique est commandée par les niveaux de phénols, le taux d'activité de la PPO et la présence

d'oxygène (Spanos et Wrolstad, 1992 ; Barrett *et al.*, 2005). Il existe de nombreux substrats naturels, mono, di-ou polyphénoliques du brunissement enzymatique (Vamos-Vigyazo, 1981 ; Cheftel et Cheftel, 1984 ; Jeantet *et al.*, 2006) dont les plus importants sont les dérivés du pyrocathécol, les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique, les flavonoïdes, les tanins et les lignines (Jeantet *et al.*, 2006).

Si les *o*-diphénols sont impliqués dans le brunissement enzymatique de pratiquement tous les fruits et légumes, la nature et la teneur des phénols endogènes non substrats est aussi déterminante dans l'intensité du brunissement. En effet, ces derniers peuvent participer aux réactions secondaires et plus précisément aux réactions d'oxydation couplées avec les quinones (Richard-Forget, 1997).

Le rôle possible de la PPO en tant que promoteur de l'activité de la POD est suggéré du fait que le peroxyde d'hydrogène est généré au cours de la réaction d'oxydation des composés phénoliques catalysée par la PPO (Tomas-Barberan et Espin, 2001). En effet, il a été confirmé que la PPO et la POD sont largement détectées dans de nombreux fruits et légumes et sont étroitement liées au changement enzymatique de couleur avec la perte conséquente des propriétés sensorielles et de la qualité nutritionnelle (Robinson, 1991; Duarte *et al.*, 2002).

Le produit initial de l'oxydation est habituellement le O-quinone qui est hautement instable, ce dernier subit une polymérisation pour donner des pigments bruns de haut poids moléculaire (Barrett *et al.*, 2005).

3. Polyphénoloxydase (PPO)

La principale enzyme responsable de la réaction de brunissement est la polyphénoloxydase (Mayer et Harel, 1979 ; Tomas-Barberan et Espin, 2001) ; même si un effet de synergie possible entre la polyphénoloxydase et la peroxydase a été suggéré (Tomas-Barberan et Espin, 2001). La PPO est éventuellement l'enzyme la plus étudiée dans les fruits et légumes (Chakraverty *et al.*, 2003). En effet, La liste des espèces végétales dont la PPO a été décrite et caractérisée, au moins en partie, se développe de façon constante (Mayer, 2006). Le rôle de la PPO dans les phénomènes de brunissement est si bien documenté, qu'il n'a pas besoin d'être examiné plus (de Rigal, 2001).

3.1. Nomenclature, distribution et localisation subcellulaire

Une pléthore d'études montre que la polyphénoloxydase également connue sous le nom de tyrosinase, polyphénolase, phénolase, catéchol-oxydase, crésolase, catécholase ou ortho-diphénol oxydase est largement trouvée dans la nature (Vamos-Vigyazo, 1981 ; Whitaker 1994, 1996).

La PPO existe sous deux formes avec, comme critère de différenciation, la spécificité vis-à-vis des substrats phénoliques (Walker et Ferrar, 1998) :

La laccase (EC 1.10.3.2) qui catalyse l'oxydation aussi bien d'*o*- que de *p*-diphénols. Elle est sécrétée en abondance par les champignons au cours de leur croissance (Perry *et al.*, 1993). Cette activité est absente chez les fruits et légumes, bien qu'elle ait été détectée chez la pêche (Harel *et al.*, 1970) et l'abricot (Dijkstra et Walker, 1991), vraisemblablement suite à une contamination bactérienne.

L'autre forme est la catécholoxydase à laquelle on attribue deux types d'activités. L'activité crésolasique, renommée monophénol monooxygénase (EC 1.14.18.1) qui est capable d'hydroxyler les monophénols en *o*-diphénols ; ces derniers sont alors oxydés en *o*-quinones. L'activité

crésolasique est connue depuis longtemps chez les champignons (Varoquaux, 1978), mais a été détectée plus récemment chez la pomme de terre, la pêche, le raisin, la pomme, l'avocat et la salade (Nicolas *et al.*, 1994 ; Espin *et al.*, 1995 et 1997). Le deuxième type d'activité est l'activité catécholase (EC 1.10.3.1) qui catalyse l'oxydation d'o-diphénols en o-quinones. Mathew et Parpia (1971) ainsi que Nicolas *et al.* (1994) donnent à l'activité catécholasique le rôle prédominant dans le brunissement enzymatique des fruits et légumes.

Par ailleurs, c'est le terme de polyphénoloxydase qui est généralement utilisé. Les différents noms qui ont été associés à la PPO reflètent la capacité de cette enzyme à utiliser de nombreux composés phénoliques comme substrats différents (Matsui *et al.*, 2007).

Les enzymes PPO sont généralement présentes dans la plupart des tissus végétaux (Vamos-Vigyazo 1981; Zawistowski *et al.*, 1991; Sherman *et al.*, 1991, 1995 ; Fraignier *et al.*, 1995; Haruta *et al.*, 1999). Ces enzymes ont souvent été trouvées localisées dans les chloroplastes, où elles sont associées aux membranes internes des thylakoïdes. On les trouve aussi dans le cytoplasme et dans les vésicules se trouvant entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire (Obukowicz et Kennedy, 1981). De nombreux auteurs notent la présence de formes solubles de PPO qui semblent augmenter avec le taux de maturité du fruit (Marques *et al.*, 1995).

3.2. Structure, propriétés et rôle physiologique

La PPO est une oxydoréductase contenant du cuivre comme groupement prosthétique (Kavrayan et Aydemir, 2001 ; Mayer, 2006). La structure du site actif de l'enzyme, dans laquelle le cuivre est lié par six ou sept résidus histidine et un résidu cystéine unique est hautement conservée (Mayer, 2006). Les masses moléculaires apparentes des polyphénoloxydases sont comprises entre 12 et 400 kDa (Zawistowski *et al.*, 1991). Ces différences de taille s'expliquent notamment par l'existence de formes polymériques de l'enzyme ; actuellement, les auteurs s'accordent pour donner une masse moléculaire apparente voisine de 40 à 45 kDa pour les formes monomériques (de Rigal, 2001). Malgré que certains auteurs comme Lourenço *et al.* (1990) et Yemenicioglu *et al.* (1997) trouvent que la PPO n'est pas très résistante à la chaleur ; d'autres à l'instar de Robinson (1991), Weng *et al.* (1991) et Barrett *et al.* (2005) voient qu'elle est thermiquement résistante.

Le pH optimum de la PPO varie considérablement avec la plante source, mais est généralement dans la plage de 4,0 à 8,0 (Yoruk et Marshall, 2003). Les pH et températures optimaux ainsi que la constante d'affinité apparente des polyphénoloxydases de différentes plantes vis-à-vis de certains substrats sont présentés dans le tableau 17.

En dehors de son rôle majeur dans le brunissement ; une bonne partie est encore inconnue sur la fonction physiologique de la PPO dans les plantes (Mayer, 2006). Par ailleurs, il a été reporté que l'un des principaux objectifs de la recherche sur la PPO a été son rôle potentiel dans le mécanisme de défense chez les plantes. En effet, sa synthèse avec la peroxydase constitue un moyen d'induction de défense contre les pathogènes (J'Aiti *et al.*, 2009).

L'activité de la PPO a également un impact sur la saveur et l'arôme des produits horticoles, puisque les composés phénoliques jouent un rôle dans le goût amer, sucré, piquant, ou astringent des fruits, de légumes et d'épices (Tomas-Barberan et Espin, 2001).

Chapitre IV. Brunissement Enzymatique

Tableau 17. Caractéristiques des polyphénoloxydases de certaines plantes

Plante	Substrat	Km (mM)	Température optimale (°C)	pH optimal	Référence
Pomme	Catéchol	34	15	7,0	Oktay <i>et al.</i> (1995).
	4-méthyl catéchol	3,1			
Artichaut	Catéchol	10,2	25	6,0	Aydemir <i>et al.</i> (2004)
	4-méthyl catéchol	12,4			
Banane	Catéchol	8,5	30	7,0	Unal (2007)
Brocoli	Catéchol	12,3	-	5,7	Gawlik-Dziki <i>et al.</i> (2007)
	4-méthyl catéchol	21	-		
Raisin	Acide chlorogénique	3,2	25	5,0	Rapeanu <i>et al.</i> (2006)
	Catéchine	4,3	-		
Mangue	Catéchol	6,3	30	7,0	Wang <i>et al.</i> (2007)
Fraise	Catéchol	5,9	25	5,0	Dalmadi <i>et al.</i> (2006)
Vanille	Catéchol	85	37	3,4	Waliszewski <i>et al.</i> (2009)
	4-méthyl catéchol	10,6	37	3,0	
Datte Deglet Nour	4-méthyl catéchol	-	35	6,4	Daas Amiour et Hambaba(2016)
Datte Ghars	4-méthyl catéchol	-	40	7,2	Daas Amiour et Hambaba(2016)

3.3. Mécanisme réactionnel et substrats

En présence d'oxygène, la PPO catalyse l'hydroxylation de monophénols aux *o*-diphénols (l'activité crésolase) et l'oxydation des *o*-diphénols à leurs *o*-quinones correspondants (l'activité catécholase) (Robb, 1984) (Figure. 4). Les PPOs sont capables d'insérer de l'oxygène dans une position ortho à un groupe hydroxyle existant dans un cycle aromatique, suivi de l'oxydation du diphénol à la quinone correspondante ; l'oxygène moléculaire est utilisé dans la réaction (Mayer, 2006) (Figure 5).

Le brunissement enzymatique s'observe chez les végétaux riches en composés phénoliques (Cheftel et Cheftel, 1984 ; Jeantet *et al.*, 2006). En effet, le degré de brunissement dépend de la teneur en phénols et de l'activité de la polyphénoloxydase (PPO) (Zawistowsky *et al.*, 1991).

Le brunissement post-récolte des fruits est principalement dû à la rupture des anthocyanes et l'oxydation des composés phénoliques (Whitaker, 1994, 1995; Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995).

Une large gamme de composés phénoliques est oxydée par la PPO (Sapers, 1993). Les différents substrats de la PPO mis en évidence dans plusieurs travaux de recherche sur le brunissement enzymatique sont donnés dans le tableau 18 et la figure 6.

3.3.1. Acides phénols

Les acides phénoliques constituent l'une des principales classes de métabolites secondaires ; ces composés contiennent un cycle benzène hydroxylé avec un ou plusieurs groupes carboxyle attachés directement ou indirectement à ce cycle (Baliga *et al.*, 2011). Ils sont représentés par les acides hydroxybenzoïques et les acides cinnamiques (Vermerris et Nicholson, 2006) (Figure 7 a et b).

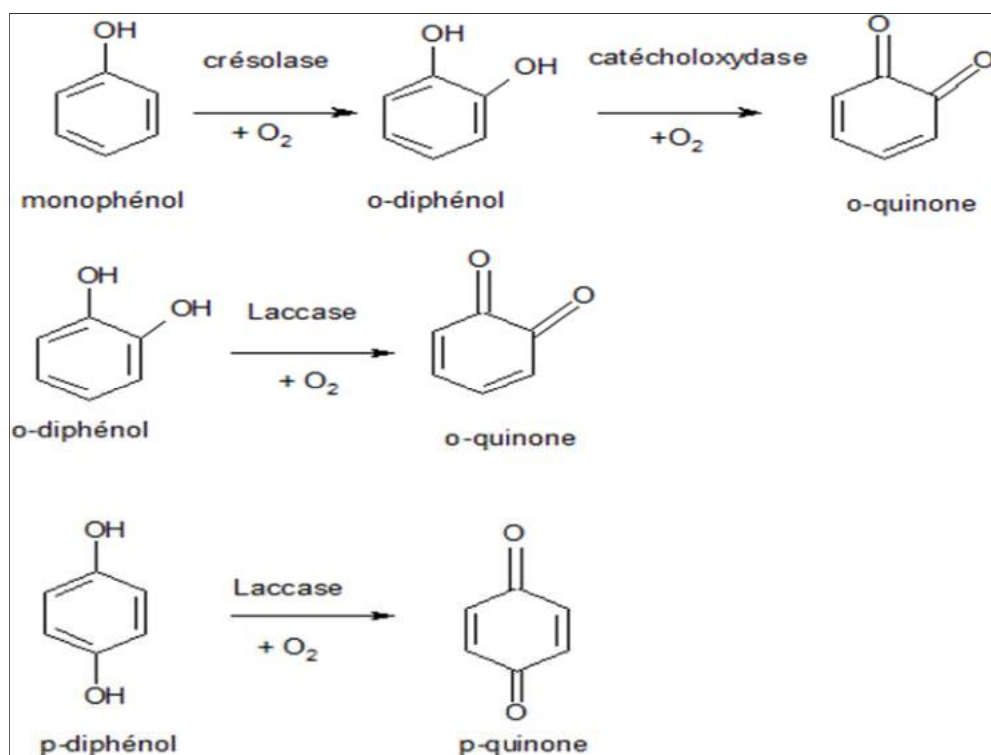


Figure 4. Les réactions catalysées par la polyphénoloxydase (de Rigal, 2001).

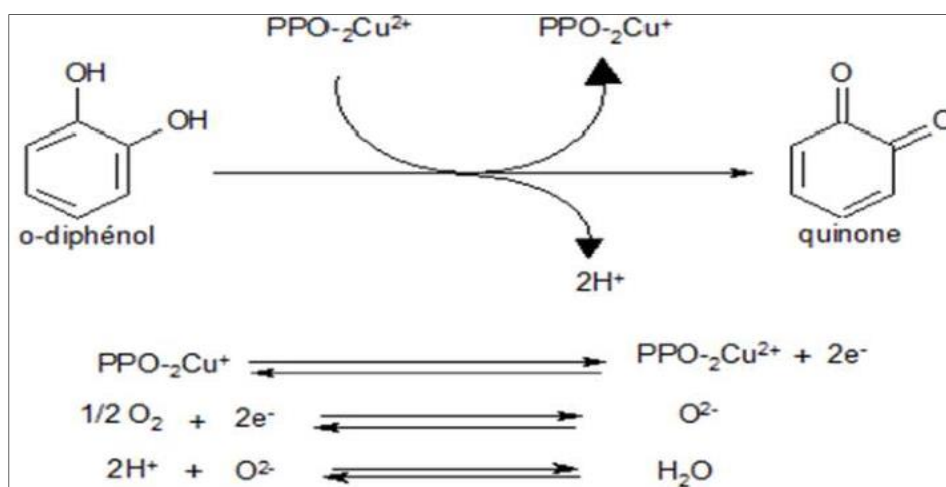


Figure 5. Mécanisme d'action des polyphénoloxydases (Marshall *et al.*, 2000).

L'acide chlorogénique (ester de l'acide caféique) apparaît largement dans les fruits, il est le substrat principal impliqué dans le brunissement enzymatique des tissus des fruits coupés ou endommagés suite à une exposition à l'air (Barrett *et al.*, 2005). L'acide chlorogénique et la catéchine sont des substrats ayant une plus grande affinité pour la PPO (Janovitz-Klapp *et al.*, 1990; Oszmianski et Lee, 1990). D'autre part, Marshall *et al.* (2000) ont signalé que dans la banane le principal substrat de la PPO est la dopamine ; tandis que dans la datte c'est l'acide 3-O-cafféoylshikimic (l'acide dactyliférique) (Paliyath *et al.*, 2008).

Les acides hydroxycinnamiques sont aussi des substrats des polyphénoloxydases (Grotewold, 2006).

Chapitre IV. Brunissement Enzymatique

En effet, la laccase transforme les acides caféique et *p*-coumarique du raisin blanc en quinones (Salgues *et al.*, 1986; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

3.3.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont comptés parmi les plus abondants groupes de produits naturels présents dans les plantes (de la Rosa *et al.*, 2010). Ce sont des composés phénoliques à 15 atomes de carbone ayant une structure de base de C6-C3-C6 et c'est sur l'arrangement du C3 qu'on se base généralement pour faire la classification des flavonoïdes (Vermerris et Nicholson, 2006).

Les flavonoïdes constituent les substrats les plus fréquents du brunissement enzymatique (de Man, 1999).

Tableau 18 : Substrats des polyphénoloxydases de quelques fruits (Marshall *et al.*, 2000).

Source	Substrats phénoliques
Pomme	Acide chlorogénique, catéchol, catéchine, acide caféique, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), acide 3,4-dihydroxy benzoïque, 4-méthyle catéchol, leucocyanidine, acide <i>p</i> -coumarique, flavonols glycosides.
Abricot	Acide isochlorogénique, acide caféique, 4-méthyle catéchol, acide chlorogénique, catéchine, épicatechine, pyrogallol, catéchol, flavonols, acide <i>p</i> -coumarique et dérivés.
Avocat	4-méthyle catéchol, dopamine, pyrogallol, catéchol, acide chlorogénique, acide caféique, DOPA.
Banane	Dopamine, leuco-delphinidine, leucocyanidine.
Cacao	Catéchines, leucoanthocyanidines, anthocyanines, complexes tanins.
Raisin	Catéchine, acide chlorogénique, catéchol, acide caféique, DOPA, tanins, flavonols, acide protocatéchuïque, résorcinol, hydroquinone, phénol.
Mangue	Dopamine, 4-méthyle catéchol, acide caféique, catéchol, catéchine, acide chlorogénique, tyrosine, DOPA, <i>p</i> -crésol.
Pêche	Acide chlorogénique, pyrogallol, 4-méthyle catéchol, catéchol, acide caféique, acide gallique, catéchine, Dopamine.
Poire	Acide chlorogénique catéchol, catéchine, acide caféique, DOPA, acide 3,4-dihydroxy-benzoïque, <i>p</i> -crésol.
Prune	Acide chlorogénique, catéchine, acide caféique, catéchol, DOPA.

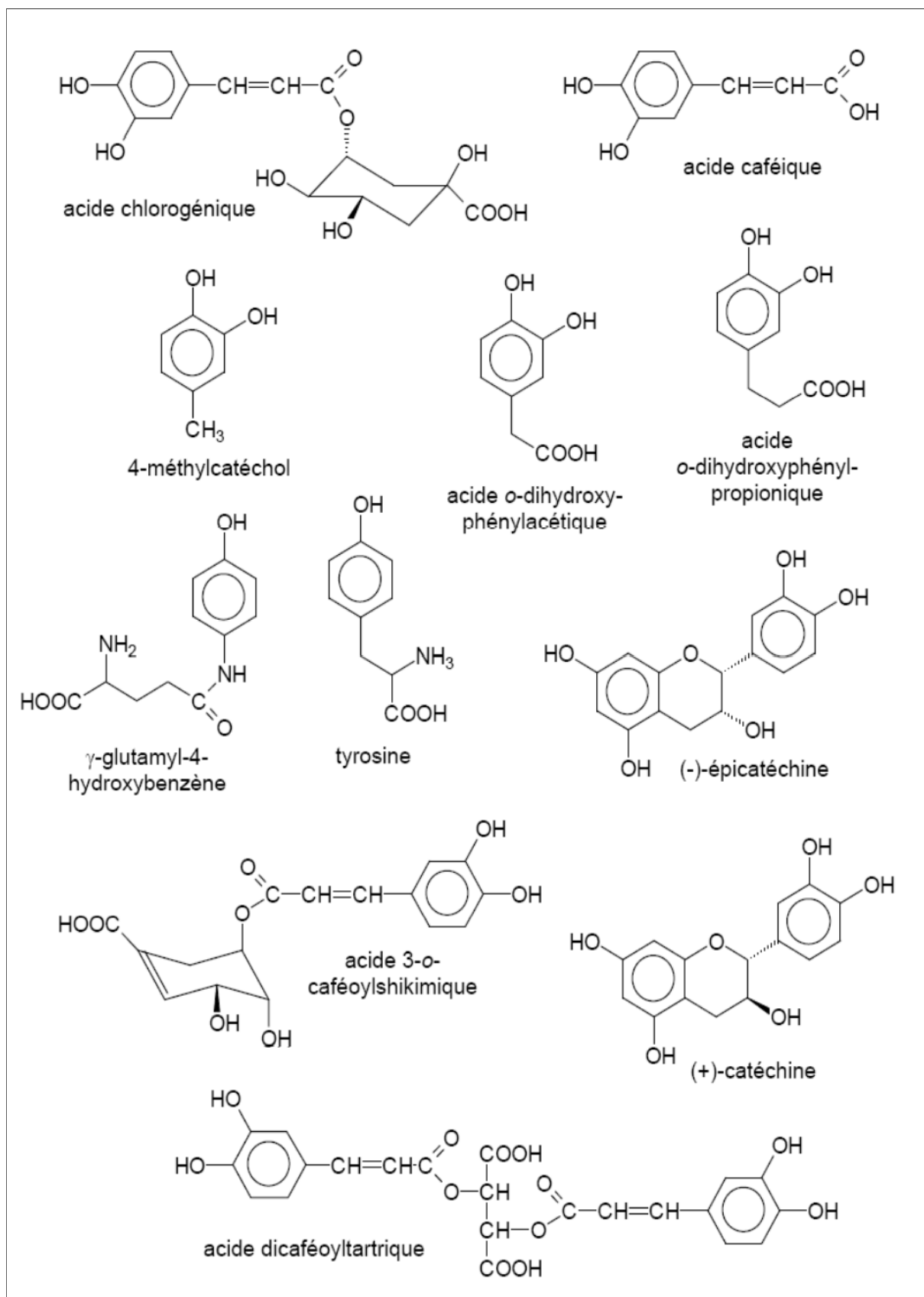


Figure 6. Structure de quelques composés phénoliques substrats de la polyphénoloxydase (de Rigal, 2001).

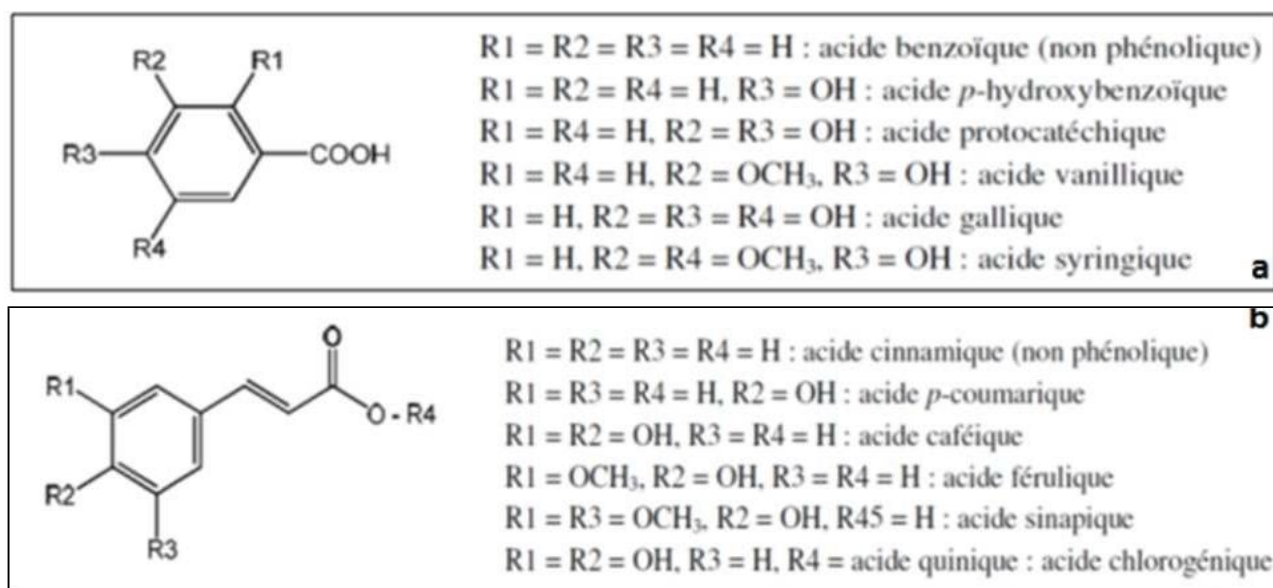


Figure 7. Structures chimiques d'acides hydroxybenzoïques (a) et hydroxycinnamiques (b) (Chanforan, 2010).

Parmi les flavonoïdes, les substrats majeurs impliqués dans le brunissement enzymatique, sont les flavonols, flavanols et anthocyanidines (Marshall *et al.*, 2000) et dont les plus connues structures sont représentées dans les figures 8 (a et b) et 9.

Il a été reporté que la catéchine, l'épicatéchine sont des substrats naturels communs des PPOs de différents fruits (Macheïx *et al.*, 1990).

En effet, l'épicatéchine a été identifiée comme substrat endogène des PPOs du litchi et de longanes (Sun *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2008). D'autres flavonoïdes tels que l'ériodictyol, la myricétine et fisétine peuvent également être oxydés par la PPO (Jiménez *et al.*, 1998; Jiménez et Garcia- Carmona, 1999; Jiménez-Atienzar *et al.*, 2005).

Les anthocyanes constituent une importante classe de flavonoïdes. Ce sont des pigments présents dans la sève des plantes. Ils sont responsables de la couleur rouge, bleue et violette de plusieurs fruits et légumes (de Man, 1999 ; Vermerris et Nicholson, 2006).

Les anthocyanes ne sont pas de bons substrats de la PPO en raison de leur structure. En effet, on pense que leur fragment glucidique qui est habituellement une ou deux molécules de glucose, galactose ou rhamnose (de Man, 1999) peut causer un encombrement stérique contre l'attaque de la PPO et dont l'élimination de ce fragment par l'action de la β glucosidase conduit à la formation d'anthocyanidines oxydables par la PPO (Zhang *et al.*, 2005). Ils sont mêmes considérés comme les principaux flavonoïdes responsables du brunissement enzymatique des végétaux (Jeantet *et al.*, (2006). Par conséquent, la présence de la PPO active dans les tissus végétaux peut causer d'importante perte d'anthocyanidines et de production de quinones aboutissant à la perte de la couleur, de la saveur et de la valeur nutritive (WescheiEbeling et Montgomery, 1990; Kader *et al.*, 1998).

Par ailleurs, les anthocyanes peuvent réagir avec les produits d'oxydation hautement réactives, *o*-quinones, pour donner des produits bruns (Zhang *et al.*, 2005).

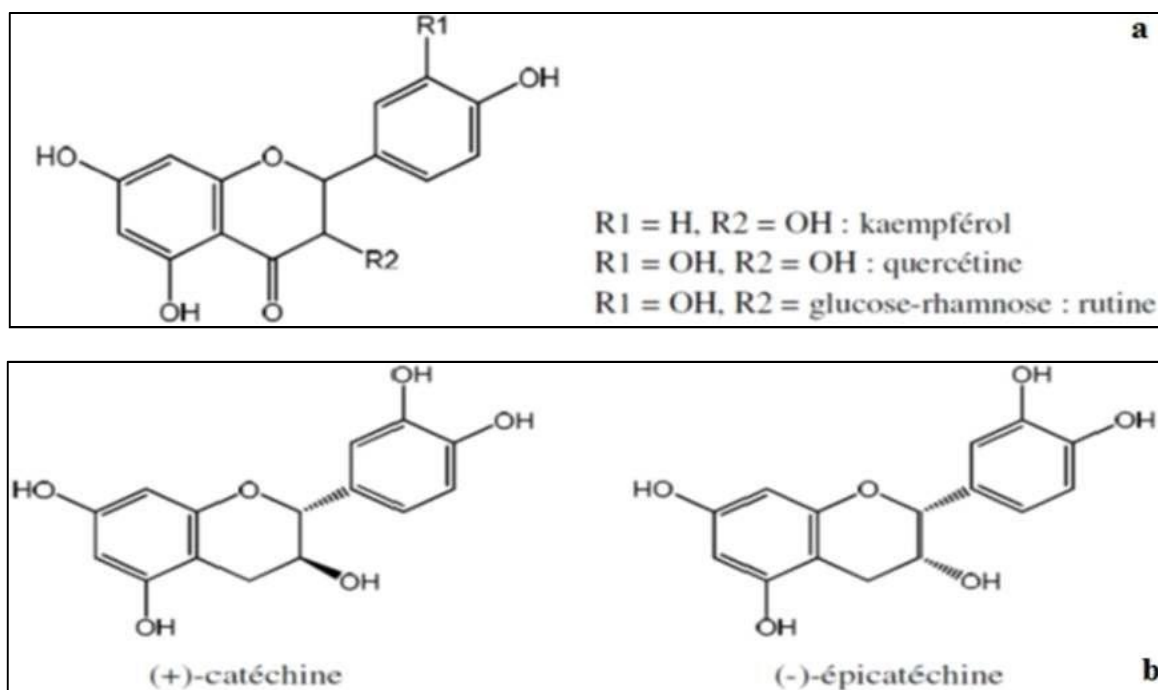
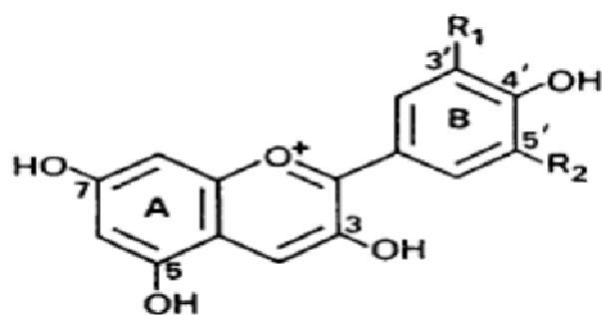


Figure 8. Structures chimiques des principaux flavonols (a) et flavanols (b) (Chanforan, 2010).



$R_1 = H$	$R_2 = H$	Pélargonidine
$R_1 = OH$	$R_2 = H$	Cyanidine
$R_1 = OH$	$R_2 = OH$	Delphinidine
$R_1 = OCH_3$	$R_2 = H$	Péonidine
$R_1 = OCH_3$	$R_2 = OH$	Pétunidine
$R_1 = OCH_3$	$R_2 = OCH_3$	Malvidine

Figure 9. Structures chimiques des anthocyanidines des fruits (de Man, 1999).

4. Produits de la réaction du brunissement

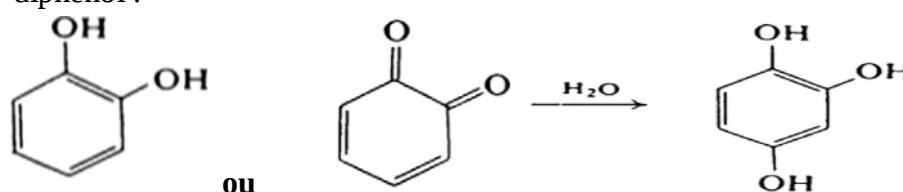
Le brunissement enzymatique conduit à la formation d'o-quinones de couleur jaune, très instables et qui réagissent soit avec des polymères de haut poids moléculaire ou forment un complexe macromoléculaire avec des acides aminés et des protéines (Macheix *et al.*, 1990 ; Sapers, 1993; Whitaker, 1994, 1995; Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995 ; Ramaswamy and Riahi, 2003). La polymérisation non-enzymatique de ces composés intermédiaires donne lieu à des pigments désignés par le terme général de mélanines. Leur teinte finale est brune ou noire, mais il existe des

Chapitre IV. Brunissement Enzymatique

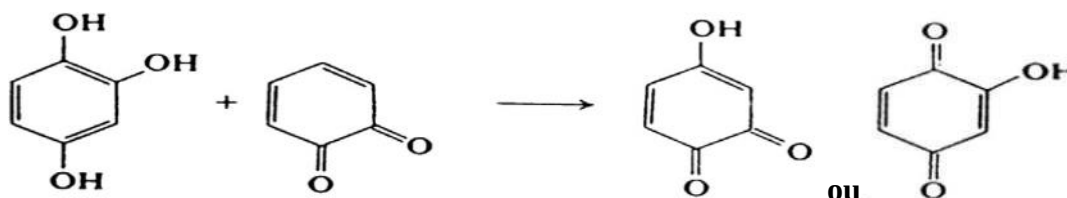
intermédiaires de couleurs diverses : rose, rouge, bleue-noire (Cheftel et Cheftel, 1984 ; Tomas-Barberan et Espin, 2001; Ramaswamy et Riahi, 2003).

La formation des quinones est à la fois dépendante de l'enzyme et de l'oxygène ; une fois que cela a eu lieu, les réactions suivantes se produisent spontanément et ne dépendent plus de la présence de la PPO ou de l'oxygène. Joslyn et Ponting (1951) ont résumé ces réactions chimiques qui peuvent expliquer la formation des mélanines brunes (Mesquita et Queiroz, 2013) :

La première réaction est considérée comme une hydroxylation secondaire de l'o-quinone ou d'un excès de l'o-diphénol :



Les composés résultant (trihydroxybenzènes triphénoliques) réagissent avec les o-quinones pour former les hydroxyquinones :



Les hydroxyquinones subissent une polymérisation et sont progressivement convertis en polymères rouges bruns, et enfin aux mélanines brunes qui apparaissent sur le site de la blessure du tissu végétal (Matheis and Whitaker 1984; Whitaker, 1994).

5. Peroxydases (POD)

Les peroxydases firent partie des premières enzymes étudiées après observation de l'apparition d'une coloration intense en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de gaïacol et d'extraits animaux ou végétaux (Delannoy *et al.*, 2004). En effet, l'implication de la POD dans le brunissement est rapporté par de nombreux chercheurs (Lopez-Serrano et Ros-Barcelo, 1996; Richard-Forget et Gauillard, 1997; Chisari *et al.*, 2007).

5.1. Nomenclature, distribution et localisation subcellulaire

L'activité de la peroxydase a été identifiée chez les plantes (cytochrome c peroxydase, l'ascorbate peroxydase, ...), les micro-organismes et les animaux (myélo-peroxydase, la lacto-peroxydase, la thyroïdo- peroxydase, ...) (Welinder, 1992 ; Ghoul et Chebil, 2012).

Les plantes contiennent les peroxydases des classes I et III, selon la classification proposée par Welinder (1992).

Les nombreuses isoenzymes des peroxydases des plantes peuvent différer par leurs propriétés physico-chimiques, leur structure et leur fonction.

Le nombre et la concentration des peroxydases des plantes varient en fonction du type tissulaire, de l'âge de la plante, des conditions de stress abiotique et biotique et, dans ce dernier cas, de l'agent pathogène impliqué dans l'interaction avec l'hôte (Martinez, 1997).

Les peroxydases ont été détectées dans tous les organes de la plante et à différents stades de développement (Kushad *et al.*, 1999; Fraignier *et al.*, 2000; Hiraga *et al.*, 2000; Welinder *et al.*, 2002 ; Lopez-Molina *et al.*, 2003).

Au niveau cellulaire, les peroxydases de la classe III sont majoritairement présentes dans les parois (Blee *et al.*, 2001 ; Takabe *et al.*, 2001). En effet, elles sont sécrétées dans la paroi ou dans le milieu environnant (Delannoy *et al.*, 2004).

Outre la paroi et l'apoplasme qui semblent être des lieux privilégiés de leur action, les peroxydases de type I se localisent dans la vacuole (Theilade *et al.*, 1993 ; Andrews *et al.*, 2002 ; Passardi *et al.*, 2004) et les mitochondries (Sukalovic et Vuletic, 2003).

5.2. Mécanisme réactionnel et substrats

La peroxydase (POD; EC 1.11.1.7) est impliquée dans le brunissement enzymatique des fruits et légumes depuis que les diphénols peuvent fonctionner comme substrats réducteurs dans sa réaction (Robinson, 1991; Nicolas *et al.*, 1994 ; Chisari *et al.*, 2007).

La peroxydase est un groupe d'enzymes qui catalyse des réactions d'oxydation en réduisant le peroxyde d'hydrogène à de l'eau tout en oxydant une variété de substrats (Robinson, 1991) ; ces derniers sont des donneurs d'hydrogène, comme les composés phénoliques, les nitrites, l'acide ascorbique et les amines (Paliyath *et al.*, 2008) en plus des précurseurs de lignine, de l'auxine ou certains d'autres métabolites secondaires (Higara, 2001). La réduction de l' H_2O_2 est réalisée donc en prenant des électrons à partir de ces diverses molécules donneuses (Higara, 2001).

C'est à cause de son rôle de catalyse de l'oxydation des composés phénoliques, en présence du peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation de produits de dégradation bruns, que la POD est censée être impliquée dans la détérioration de la couleur et de la saveur des produits horticoles (Terefe *et al.*, 2014). Les enzymes n'agissent pas au sein de fruits intacts en raison de la séparation physique de l'enzyme et du substrat. Les dommages mécaniques, la pourriture, la sénescence conduisent à la désorganisation cellulaire et initient la décomposition (de Man, 1999).

La réaction de peroxydation implique plus précisément :

- Un substrat oxydant ou des molécules contenant un groupement peroxyde ; les peroxydes typiques utilisés en combinaison avec les peroxydases sont le peroxyde d'hydrogène, en général et dans certains cas, le peroxyde d'éthyle ou de méthyle et le benzyle peroxyde (Delannoy *et al.*, 2004 ; Ghoul et Chebil, 2012).
- Deux substrats réducteurs différents, ou non, qui sont pour la plupart de petits composés aromatiques tels que des phénols, des hydroquinones, des amines aromatiques, ce qui constitue un groupe très vaste de molécules (Delannoy *et al.*,

2004). Cela autorise une très grande combinaison de substrats et ce d'autant plus facilement que la spécificité des peroxydases est en général faible (Delannoy *et al.*, 2004).

La POD oxyde en outre les phénols en utilisant les quinones comme substrat (Richard-Forget et Gaillard, 1997). Ainsi, l'activité de la POD dépend de la PPO pour son rôle dans le brunissement enzymatique.

En raison de leur très grande diversité de substrats, il est difficile, voire impossible, de dégager une réaction typique des peroxydases végétales. Néanmoins, elles partagent toutes un schéma réactionnel similaire, en trois étapes, qui transforme le substrat en sa forme radicalaire extrêmement réactive (Delannoy *et al.*, 2004) :

6. Contrôle et prévention du brunissement enzymatique

En raison des effets néfastes de la réaction de brunissement se produisant au sein d'importants produits alimentaires, son contrôle est une grande priorité pour les producteurs. Les techniques actuelles de contrôle peuvent utiliser les deux méthodes physiques et chimiques,

souvent en synergie (Almeida et Nogueira, 1995). Les procédures de contrôle optimales diffèrent avec la différence des produits alimentaires ; notant que si peu de mesures universelles de contrôle sont disponibles (Walker et Ferrar, 1998).

En général, les méthodes physiques d'inhibition du brunissement enzymatique impliquent l'élimination ou la diminution de l'activité de l'enzyme ou de la réactivité des substrats au sein des fruits et légumes. Le traitement physique majeur utilisé dans l'industrie est la chaleur, par l'intermédiaire du processus de pasteurisation, qui inactive les enzymes et stoppe le brunissement enzymatique (de Rigal, 2001). Malheureusement, les traitements thermiques ne sont pas appropriés dans de nombreux systèmes, car les phénolases des fruits sont relativement stables à la chaleur et les traitements thermiques peuvent altérer les qualités organoleptiques du produit, comme la texture et la couleur (de Rigal, 2001).

La réfrigération peut être utilisée comme alternative pour limiter temporairement le brunissement enzymatique (Barrett *et al.*, 2005).

Les procédés chimiques de contrôle de brunissement enzymatique impliquent toujours l'addition d'inhibiteurs de brunissement ; ceci est souvent accompli en trempant le produit alimentaire (habituellement les fruits) dans une solution de l'inhibiteur.

Une variété d'adsorbants a été utilisée pour éliminer les réactants impliqués dans le brunissement enzymatique. En effet, l'argile bentonite a des qualités d'adsorption protéique et a longtemps été utilisé pour réduire l'activité phénolase (Macheix *et al.*, 1991). Des adsorbants tels que la gélatine, le charbon actif et la

polyvinyl-polypyrrolidone ont été utilisés pour éliminer les substrats phénoliques solubles à partir de jus et d'extraits végétaux (Macheix *et al.*, 1991 ; Barrett *et al.*, 2005).

Un autre procédé d'élimination des substrats de phénolase est de limiter la disponibilité d'O₂, parce qu'il est un substrat requis. Ceci peut être obtenu par emballage sous vide ou dans une atmosphère enrichi en CO₂ ou en N₂ (Macheix *et al.*, 1990 ; de Rigal, 2001).