الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المعهد الوطني للعلوم الفلاحية الحراش (الجزائر)

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE EL-HARRACH (ALGER)

THESE

de Doctorat d'Etat

en Sciences Agronomiques

Par

BENCHABANE Ahmed

Composition biochimique de la datte *(Deglet-nour)*: évolution en fonction de la maturation et formation de la couleur et des arômes

Soutenue le 24 Avril 2007 devant le jury composé de :

M. SELSELET-ATTOU G.	Professeur	Président
M. BELLAL M.M.	Professeur	Directeur de thèse
M. THIBAULT J.F.	Directeur de Recherche	Examinateur
M. AZZOUT B.	Professeur	Examinateur
M. ASSAMI M.K.	Maître de Conférence	Examinateur

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المعهد الوطني للعلوم الفلاحية الحراش (الجزائر)

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE EL-HARRACH (ALGER)

THESE

de Doctorat d'Etat

en Sciences Agronomiques

Par

BENCHABANE Ahmed

Composition biochimique de la datte *(Deglet-nour)*: évolution en fonction de la maturation et formation de la couleur et des arômes

Soutenue le 24 Avril 2007 devant le jury composé de :

M. SELSELET-ATTOU G.	Professeur	Président
M. BELLAL M.M.	Professeur	Directeur de thèse
M. THIBAULT J.F.	Directeur de Recherche	Examinateur
M. AZZOUT B.	Professeur	Examinateur
M. ASSAMI M.K.	Maître de Conférence	Examinateur

Remerciements...

Ce travail a été réalisé à l'Institut National Agronomique d'Alger, au Département de Technologie Alimentaire et de Nutrition Humaine.

Je remercie Monsieur BELLAL Mohand Mouloud, Professeur à l'I.N.A, de m'avoir encouragé, conseillé et soutenu tout au long de ce travail.

Je remercie Monsieur SELSELET-ATTOU Ghalem, Professeur à l'Université de Mostaganem, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et présider ce jury.

J'exprime aussi toute ma gratitude à Monsieur Jean-François THIBAULT, Directeur de Recherche, Président du centre I.N.R.A. de Nantes, responsable de l'équipe Polysaccharides pariétaux à l'Unité de Recherche Biopolymères, Interactions, Assemblages, pour ses orientations, ses conseils et d'avoir toujours su trouver le temps nécessaire pour m'accueillir, durant de nombreuses années, dans son laboratoire avec confiance. Ses remarques pertinentes et ses orientations lors de la rédaction de ce document m'ont été d'un apport considérable. Il me fait l'honneur de faire partie de ce jury, qu'il trouve ici l'expression de mon éternelle reconnaissance.

Je remercie Monsieur AZZOUT Belkacem, Professeur à l'I.N.A, pour l'honneur qu'il me fait de juger ce travail. Depuis le début de ma carrière, ses encouragements, sa bonne humeur et son originalité m'ont beaucoup apporté, je lui en suis gré.

Je remercie Monsieur ASSAMI Mustapha Kamel, Maître de Conférence à l'I.N.A, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce jury, sa disponibilité et sa sollicitude sans retenue m'ont été d'un grand apport moral.

L'occasion m'est donnée pour remercier mon ami Monsieur AOUSSAT Abderrahmane, Docteur-ingénieur, Chargé de Cours à l'I.N.A, pour avoir toujours été à mes côtés dans tous les moments difficiles par sa présence et son soutien indéfectible. Il n'a ménagé aucun effort pour m'encadrer, me conseiller, m'orienter et me faire bénéficier de ses qualités humaines qui m'ont beaucoup apporté. Encore une fois, merci Dahmane.

Merci aux étudiants qui m'ont accompagné pendant ces années de recherche avec énergie, entouthiasme et envie pour porter haut ...la datte algérienne. Merci à Monsieur MEFTAH Fayçal de Guémar (El-Oued) pour avoir fait avec moi les premiers pas à la découverte de ce fruit et de m'avoir toujours préparé les échantillons avec minutie. Merci à Monsieur Max REYNES, du CIRAD-FLHOR de Montpellier, pour sa gentillesse, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour l'intérêt qu'il porte à la datte. Merci à Monsieur Christian AYMARD, du Département des Cultures Pérennes du CIRAD de Montpellier, pour son savoir-faire et pour m'avoir fait partager ses connaissances en enzymologie. Merci à Madame Estelle BONNIN, pour son aide et ses conseils et à Madame Marie-Jeanne CRÉPEAU pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Enfin, j'adresse mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué à ce travail.

A Farida, Aniss et Sabri

Biochemical composition of date *(Deglet-nour)*: evolution during ripening, color and aroma formation

Abstract:
The biochemical composition of the Deglet-nour date undergoes modifications during its ripening. Water content of the date is associated with an increase of the total sugar content and a decrease of proteins, lipids, minerals, carotenoids and phenolic compounds.
With more than 10%, the content of Deglet-nour date is rich in total fibres. Among these fibres, a particular interest was carried to pectins. The extraction and the fractionation of pectic substances were achieved as a function of the ripening of the date contained about 2 % of total pectins.
Extracts of the pectic fractions (PSE, PSO, PSH) are characterized by a high contents of neutral sugars (more than 15% DW) and by low rates of Gal A (less than 5O % DW), during the various ripening stages, in contrast with the values found in other fruits where the Gal A content is about 65 to 80% DW and neutral sugars is 10% DW.
These results contribute to a better knowledge of the date pectic substances.
The enzymatic degradation of these pectic substances by the polygalacturonases (PG), the pectineméthylestérases (PME) and the cellulases is illustrate by an increase of the PG and PME activities increased during date ripening with a maximal activity at the last ripening stage. The cellulases activities are the same as PG and PME activities.
The date PG is an exo-polygalacturonase, which the temperature and the pH of its optimum activity are respectively 40 °C and 5, this activity is inhibited by $CaCl_2$. The temperature and the pH of optimum PME activity are respectively 50 °C and 7, 4; there is no inhibition by $CaCl_2$. The temperature and the pH of optimum cellulases activity are respectively 50 °C and 5. These activities were relatively low in comparison with other fruits.
During the ripe stage, the invertase activity of invertase, in relation with the date water content decrease whereas the other enzymes are active.
The date color evolution during ripening can be explained by the presence of soluble forms of polyphénoloxydase (PPO) which increase with the fruit ripening.
In addition, the plants carbonyl compounds are considered as flavors resulting, mainly from the biocatalyse by the lipoxygenase with the essential fatty acids like precursors.
The linoleic acid hydroperoxydes lead by scission to the formation of aldehyds, which are the main component responsible of the rancid odor. The aldehyd use as quality index of the Deglet-nour date can be suggested.
In the same idea, volatile compounds of the Deglet-nour date, which have similarities with a dozen compounds already attributed to the flavor of different date varieties, show important differences in the composition of the final bouquet.
A priori, these differences are in relation to the method of extraction adopted, namely the SDE (Simultaneous Distillation Extraction). The latter allowed, starting from 20 g of dates and a low volume of solvent, obtaining an aromatic extract sufficient for qualitative and quantitative analyses.
With 20 g of dates and a low volume of solvent, the extraction method (SDE) gave an aromatic extract sufficient for qualitative and quantitative analyses.
The CG-SM identified a high number of volatile compounds (60), acetaldehyde is the major volatile compound to which the aromatic grade is attributed. This grade has to be taking into account knowing the little of studies carried out on the flavors of date.

Key words: biochemical composition, ripening, pectins, enzymes, color, aroma, date, *Phoenix dactylifera*.

Résumé :

Au cours de la maturation de la datte Deglet-nour, la composition biochimique de la datte subit des modifications. A une diminution de la teneur en eau est associée une augmentation de la teneur en sucres totaux et une chute des protéines, des lipides, des minéraux, des caroténoïdes et des composés phénoliques.
Avec une teneur de plus de 10 %, la datte Deglet-nour est riche en fibres totales Parmi ces fibres, un intérêt particulier est porté aux pectines qui représentent environ 2 % de la datte.
Les fractions pectiques (PSE, PSO, PSH) extraites se caractérisent par des teneurs élevées en oses neutres (> 15 % MS) et par des taux faibles en Gal A (< 5O % MS) ; et cela au cours des différents stades de la maturation, contrairement aux valeurs proposées pour d'autres fruits où il n'est pas rare d'obtenir des teneurs en Gal A de l'ordre de 65 à 80 % MS et des taux d'oses neutres de 10 % MS.
Ces résultats contribuent à une meilleure connaissance des substances pectiques de ce fruit.
La dégradation enzymatique de ces pectines par les polygalacturonases, responsables avec les pectineméthylestérases et les cellulases du ramollissement, est illustrée par les activités PG et PME qui augmentent au cours de la maturation pour atteindre une activité maximale au dernier stade de maturation ; il en est de même pour les cellulases. La PG de la datte est une exo-polygalacturonase qui présente une activité optimale à une température de 40°C, un pH égal à 5 et une inhibition par le $CaCl_2$; celle des PME à une température de 50 °C, un pH égal à 7,4 et aucune inhibition par le $CaCl_2$ et celle des cellulases à une température de 50 °C et un pH égal à 5. Ces activités sont relativement faibles comparées à celles d'autres fruits
Durant le stade mûr, l'activité de l'invertase, en étroite relation avec la teneur en eau de la datte, diminue alors que les autres enzymes sont actives.
L'évolution de la couleur au cours de la maturation peut être expliquée par la présence de formes solubles de polyphénoloxydases qui augmentent avec le taux de maturité du fruit
Par ailleurs, chez les végétaux, les composés carbonylés sont considérés comme des arômes issus, principalement, de la biocatalyse par la lipoxygénase avec les acides gras essentiels comme précurseurs. Les hydroperoxydes de l'acide linoléique conduisent par scission à la formation d'aldéhydes, constituant majoritaires de l'odeur rance. Leur utilisation comme indice de qualité chez la datte Deglet-nour peut être suggérée.
Dans ce sens, les composés volatils de la datte Deglet-nour, bien qu'ayant des similitudes avec une dizaine de composés déjà attribués à l'arôme de différentes variétés de dattes, montrent des différences importantes dans la composition du bouquet final. A priori, ces différences sont en relation avec la méthode d'extraction adoptée, la Distillation-Extraction Simultanées. Cette dernière a permis, à partir de 20 g de dattes et d'un faible volume de solvant, l'obtention d'un extrait aromatique suffisant pour des analyses qualitatives et quantitatives.
Le nombre élevé de composés volatils identifiés par CG-SM (60), dont l'acétaldéhyde est le composé majeur auquel est attribuée la note aromatique de la datte, est à prendre en considération sachant le peu d'études effectuées sur les arômes de la datte.

Mots clés : composition chimique, maturation, pectines, enzymes, couleur, arômes, datte, *Phoenix dactylifera*.

التركيب الكيميائي الحيوي لثمر " دقلة نور" : تطويره خلال النضج , تركيب اللون و العطر

ملخص :

خلال نضج ثمر "دقلة نور" تسجل تحولات في التركيب الكيميائي الحيوي يتزامن انخفاض في نسبة الماء مع ارتفاع في التقدير الكمي للسكريات و إخفاق لكمية البروتينات .
بتقدير كمي يعادل 10% يعد دقلة نور غني بالألياف عموما و بالبكتين على الخصوص حيث تمثل 2 % من الثمر.
إن استخلاص و تقسيم المكونات البكتينية على شكلPSE ,PSO و PSH خلال مراحل تطوه سمح بتسجيل خصوصيات بكتين الثمر مقارنة ببكتين الفواكه الأخرى.
ثم التعرف على نشاط الانزيمات المسئولة على ترطيب دقلة نور و فقدانها للقوام و حددت خصائص هذه الأخيرة أي البكتين-مثيل استراز(PME) و المتعددة الغلكتيروناز(PG) من جهة و السليلاز(Cellulase) من جهة أخرى.
لقد سجل ارتفاع في نشاط الانزيمات خلال النضج ليبلغ ذروته في الطور الأخير.
خلال الطور الناضج يسجل إخفاق لنشاط الانفيرتاز(Invertase) و تنشيط للانزيمات الأخرى .
إن تطور اللون خلال النضج ناجم عن تواجد المتعددة الفينول اكسيداز(PPO) على شكلها المذاب الذي يناسب طرديا مع نسبة نضوج الثمر.
إن مكونات العطر الطيارة لثمر "دقلة نور" تتميز باختلافات كمية مقارنة بعطر أصناف أخرى من الثمر حيث يفسر بتقنية التقطير و الاستخلاص المتبعة(S.D.E) .
إن العدد الكبير لمكونات العطر الطيارة المتعرف عليها بطريقة CG-SM أي ستون و الذي تعين فيه الاستلدهيد كمركب أساسي في تحديد نكهة ثمر "دقلة نور" , جدير بالاهتمام نظرا لندرة الدراسات في هذا المجال.

مفاتيح : ثمر- نضج- تركيب كيميائي حيوي- بكتين- انزيمات- لون- عطر.

Sommaire ...

INTRODUCTION **1**

PREMIÈRE PARTIE :
ÉTUDE DES PETITES MOLÉCULES DE LA DATTE :
SUCRES, ACIDES AMINÉS ET MINÉRAUX

CHAPITRE I : LES SUCRES

Données bibliographiques **4**
1.1. La teneur en eau 4
1.2. Les sucres 4
1.3. L'invertase 6
Matériel et Méthodes **8**
2.1. Matériel végétal 8
2.2. Teneur en matière sèche 9
2.3. Analyse quantitative des sucres 9
2.4. Analyse qualitative des sucres 9
2.4.1. Caractérisation par chromatographie sur couche mince (C.C.M) 9
2.4.2. Caractérisation par chromatographie en phase gazeuse (C.P.G) 9
2.5. Extraction et caractérisation de l'invertase 10
2.5.1. Extraction 10
2.5.2. Mesure des activités 10
2.5.3. Conditions et effecteurs 10
Résultats et discussion **11**
3.1. Teneurs en eau et en sucres 11
3.2. Evaluation de l'activité invertasique au cours de la maturation 12
3.3. Caractérisation des invertases 14
3.3.1. Effet du pH 14
3.3.2. Effet de la température 14
Discussion **15**

CHAPITRE II : LES ACIDES AMINÉS

Données bibliographiques **17**
Matériel et méthodes **19**
2.1. Matériel végétal 19
2.2. Dosage des acides aminés totaux 19
Résultats et discussion **20**
3.1. Teneurs en acides aminés totaux 20

CHAPITRE III : LES MINÉRAUX

Données bibliographiques **22**
Matériel et Méthodes **23**
2.1. Matériel végétal 23
2.2. Détermination de la teneur en cendres totales 23
2.3. Dosage des éléments minéraux 23
2.3.1. Détermination de l'azote total 23
2.3.2. Dosage des autres éléments minéraux 23

Résultats et discussion **24**
3.1. Evolution de la fraction minérale et des cendres au cours de la maturation 24

DEUXIÈME PARTIE :

ÉTUDE DES MACROMOLÉCULES DE LA PAROI, DES PROTÉINES ET DES LIPIDES

CHAPITRE I : LES MACROMOLÉCULES DE LA PAROI

Données bibliographiques **25**
1.1. Généralités 25
1.2. Les enzymes de la paroi 26
Matériel et méthodes **28**
2.1. Matériel végétal 28
2.2. Teneur en matières sèche 28
2.3. Teneur en protéines 28
2.4. Fractionnement des composés de la paroi 28
2.5. Extraction et dosage des substances pectiques 30
2.5.1. Obtention du MIA 30
2.5.2. Extractions fractionnées 30
2.5.2.1. Pectines solubles dans l'eau (PSE) 30
2.5.2.2. Pectines solubles dans l'oxalate (PSO) 30
2.5.2.3. Pectines solubles dans l'acide (PSH) 30
2.6. Dosage de l'acide galacturonique 30
2.7. Dosage du méthanol et détermination du degré de méthylation 30
2.8. Dosage des oses neutres 30
2.9. Extraction et caractérisation des enzymes 31
2.9.1. Les polygalacturonases 31
2.9.1.1. Extraction 31
2.9.1.2. Mesure des activités 31
2.9.1.3. Détermination de la nature des polygalacturonases 31
2.9.1.4. Conditions et effecteurs 32
2.9.2. Les pectineméthylestérases 33
2.9.2.1. Extraction 33
2.9.2.2. Mesure des activités 33
2.9.2.3. Conditions et effecteurs 33
2.9.3. Les cellulases 34
2.9.3.1. Extraction 34
2.9.3.2. Mesure des activités 34
2.9.3.3. Conditions et effecteurs 34
Résultats et discussion **36**
3.1. Teneur en composés pariétaux totaux 37
3.2. Détermination des substances pectiques 37
3.2.1. MIA 37
3.2.2. Fractions pectiques 37
3.3. Les polygalacturonases 39
3.3.1. Evaluation de l'activité des polygalacturonases en relation avec les teneurs en protéines totales et solubles 39

3.3.2. Caractérisation des polygalacturonases 40
3.3.2.1. Nature des PG 40
3.3.2.2. Effet de la température 40
3.3.2.3. Effet du pH 40
3.3.2.4. Effet du $CaCl_2$ 41
3.4. Les pectineméthylestérases 41
3.4.1. Evaluation de l'activité des pectineméthylestérases en relation avec les teneurs en pectines totales et solubles 41
3.4.2. Caractérisation des pectineméthylestérases 42
3.4.2.1. Effet du pH 42
3.4.2.2. Effet de la température 42
3.4.2.3. Effet du NaCl 42
3.4.2.4. Effet du $CaCl_2$ 43
3.5. Les cellulases 43
3.5.1. Evaluation de l'activité des cellulases au cours de la maturation 43
3.5.2. Caractérisation des cellulases 44
3.5.2.1. Effet du temps 44
3.5.2.2. Effet du pH 44
3.5.2.3. Effet de la température 44
3.6. Relation entre les cellulases, les polygalacturonases et les pectineméthylestérases 45

CHAPITRE II : LES PROTÉINES ET LES LIPIDES

Données bibliographiques **47**
1.1. Les protéines 47
1.2. Les lipides et la lipoxygénase 47
1.2.1. Généralités 47
1.2.2. La lipoxygénase 48
Matériel et méthodes **49**
2.1. Matériel végétal 49
2.2. Teneur en protéines 49
2.3. Détermination des lipides totaux 49
2.4. Détermination des acides gras 49
2.5. Extraction et caractérisation de la lipoxygénase 49
2.5.1. Choix de la méthode 49
2.5.2. Principe 50
2.5.3. Extraction 50
2.5.4. Mesure des activités 50
2.6. Estimation de l'altération des dattes après stockage 51
2.6.1. Dosage des composés secondaires 51
2.6.2. Dosage des composés carbonylés 51
Résultats et discussion **52**
3.1. Les protéines 52
3.2. Les lipides et la lipoxygénase 52
3.2.1. Evolution des lipides totaux et des acides gras totaux au cours de la maturation 53
3.2.2. Evolution des lipides totaux et des acides gras totaux au cours du stockage 53
3.2.3. Evaluation de l'activité lipoxygénasique au cours de la maturation et du stockage 55

3.2.3.1. Les composés secondaires de l'oxydation par la lipoxygénase 56
3.2.3.1.1. Les composés secondaires détectés par spectrophotométrie UV (270 nm) 56
3.2.3.1.2. Les composés secondaires détectés par spectrophotométrie UV (285 nm) 56

TROISIÈME PARTIE : LA COULEUR DE LA DATTE

CHAPITRE I : LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES ET LE BRUNISSEMENT DE LA DATTE

Données bibliographiques **59**
1.1. Les composés phénoliques 59
1.1.1. Généralités 59
1.1.2. Les acides phénols et les coumarines 59
1.1.2.1. Les acides benzoïques 59
1.1.2.2. Les acides cinnamiques 59
1.1.2.3. Les coumarines 60
1.1.3. Les flavonoïdes 60
1.1.3.1. Les anthocyanes 60
1.1.3.2. Les tanins 60
1.1.3.2.1. Les tanins condensés (flavan-3-ols) 60
1.1.3.2.2. Les tanins hydrolysables 61
1.1.3.2.3. Complexation des tanins avec les protéines et les polysaccharides 61
1.1.4. Les composés phénoliques de la datte 61
1.2. Le brunissement de la datte 62
1.2.1. Les polyphénoloxydases 63
1.2.2. Le brunissement de la datte proprement dit 63
Matériel et Méthodes **65**
2.1. Matériel végétal 65
2.2. Méthodes 65
2.2.1. Extraction et caractérisation des polyphénoloxydases 65
2.2.1.1. Extraction 65
2.2.1.2. Mesure des activités 65
2.2.2. Conditions et effecteurs 65
2.2.2.1. Le pH 65
2.2.2.2. La température 66
2.2.2.3. L'intensité de la coloration 66
2.2.2.4. Les composés phénoliques solubles totaux 66
2.2.2.5. Les tanins condensés 66
2.2.2.6. L'acide ascorbique 67
Résultats et discussion **68**
3.1. Evaluation de l'activité PPO au cours de la maturation 68
3.2. Conditions et effecteurs 68
3.2.1. Le pH 68
3.2.2. La température 69

3.3. Autres facteurs influençant l'activité PPO 69
3.3.1. Les composés phénoliques solubles totaux 69
3.3.2. Les tanins condensés 70
3.3.3. L'acide ascorbique 71
3.3.4. L'intensité de la coloration 71
3.4. Evolution des facteurs influençant l'activité PPO au cours du stockage 72

CHAPITRE II : LES CAROTÉNOÏDES

Données bibliographiques **74**
1.1. Généralités 74
1.2. Classification des caroténoïdes 74
1.2.1. Les caroténoïdes hydrocarburés 75
1.2.2. Les caroténoïdes oxygénés 75
1.3. Les caroténoïdes de la datte 75
Matériel et Méthodes **76**
2.1. Matériel végétal 76
2.2. Méthodes 76
2.2.1. Dosage des caroténoïdes totaux 76
2.2.1.1. Extraction 76
2.2.1.2. Saponification 76
2.2.1.3. Mesure et calcul de la concentration 77
Résultats et discussion **78**
3.1. Evolution des caroténoïdes totaux au cours de la maturation 78

QUATRIÈME PARTIE :
LES ARÔMES DE LA DATTE

Données bibliographiques **80**
1.1. Généralités 80
1.2. Les méthodes d'extraction 82
1.2.1. Analyse des vapeurs de l'espace de tête 82
1.2.2. Extraction par solvant 83
1.2.3. Entraînement à la vapeur 83
1.2.4. Distillation Extraction Simultanées 84
1.3. Les arômes de la datte 87
Matériel et méthodes **88**
2.1. Matériel végétal 88
2.2. Méthodes 88
2.2.1. Distillation Extraction Simultanées 88
2.2.1.1. Préparation de l'échantillon 88
2.2.1.2. Fonctionnement de l'appareil 88
2.2.2.1.3. Extraction 88
2.2.2.1.4. Concentration 89
2.2.2. Analyse qualitative des extraits par CPG 89
2.2.3. Analyse qualitative des extraits par CG-SM 89
Résultats et discussion **90**
3.1. Bilans d'extractions de la SDE 90
3.2. Analyse qualitative des extraits par CPG 90

3.2.1. Chromatogrammes des étalons 90
3.2.2. Extrait aromatique au dichlorométhane 90
3.2.3. Extrait aromatique à l'éther 90
3.2.4. Extrait aromatique à l'hexane 91
3.2.5. Résultats de la SDE 91
3.3. Analyse de l'extrait aromatique par CG-SM 91

CONCLUSION **96**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **99**

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Teneurs en eau (% MF) et en sucres (% MS) des dattes molles, demi-molles et sèches 5
Tableau 1.2 : Evolution de la teneur en eau (% MF) et en sucres (% MS) de la datte au cours de la maturation 11
Tableau 1.3 : Teneurs en acides aminés totaux de la datte au cours de la maturation (mg / 100 g de matière sèche) 20
Tableau 1.4 : Composition minérale (mg / 100 g MS) de quelques fruits 22
Tableau 1.5 : Teneurs en éléments minéraux et en cendres totales (g / 100g MS) des dattes au cours de la maturation 24
Tableau 2.1 : Composition des réactifs utilisés dans l'évaluation des constituants de la paroi végétale 29
Tableau 2.2 : Evolution de la teneur en composés de la paroi (%MS) de la datte au cours de la maturation 36
Tableau 2.3 : Evolution du matériel insoluble à l'alcool (MIA) de la datte au cours de la maturation 37
Tableau 2.4 : Fractions pectiques (% MIA et % pectines totales) et pectines totales (% MIA et % MS) de la datte au cours de la maturation et teneurs en Gal A, en oses neutres, en méthanol (% MS de la fraction) et degré de méthylation (%) 37
Tableau 2.5: Evolution de l'activité PG et des protéines totales et solubles de la datte au cours de la maturation 39
Tableau 2.6: Teneur en protéines de quelques dattes sèches (% MS) 47
Tableau 2.7 : Les principaux acides gras dans les fruits 47
Tableau 2.8 : Evolution de la teneur en protéines totales (% MS) de la datte au cours de la maturation 52
Tableau 2.9 : Evolution des teneurs en lipides totaux et en acides gras totaux (%MS) de la datte au cours de la maturation 52
Tableau 2.10 : Conversion des A_{234} en concentrations d'hydroperoxydes [LOOH] dans les différentes dattes 55
Tableau 2.11 : Evolution des A_{270} des composés secondaires dans les différentes dattes 56
Tableau 2.12 : Evolution des A_{285} des composés carbonylés dans les différentes dattes 56
Tableau 3.1: Evaluation de l'activité PPO au cours de la maturation 68
Tableau 3.2: Evolution des teneurs en composés phénoliques solubles totaux, en tanins condensés, en caroténoïdes totaux, en vitamine C et évaluation de l'intensité de la coloration au cours de la maturation de la datte 69
Tableau 4.1 : Rendements d'extraction selon les solvants 90
Tableau 4.2 : Temps de rétention des étalons identifiés par CPG 90
Tableau 4.3 : Composés volatils identifiés par extraction au dichlorométhane 90
Tableau 4.4 : Composés volatils identifiés par extraction à l'éther 90
Tableau 4.5 : Composés volatils identifiés par extraction à l'hexane 91
Tableau 4.6 : Composition aromatique par CPG de la datte Deglet-nour 91
Tableau 4.7 : Les composés volatils de l'arôme de la datte Deglet-nour identifiés par CPG et par CG –SM 92

Liste des figures

Figure 1.1 : Représentation de la datte Deglet-nour aux différents stades de maturation 8
Figure 1.2 : Evolution de l'humidité et des sucres de la datte en fonction de la maturation 11
Figure 1.3 : Evolution de l'invertase en fonction de la maturation 12
Figure 1.4 : Evolution des sucres réducteurs et du saccharose en fonction de l'activité invertase soluble au cours de la maturation 13
Figure 1.5 : Effet du pH sur l'activité des invertases 14
Figure 1.6 : Stabilité des invertases 14
Figure 2.1 : Evaluation des constituants de la paroi végétale 29
Figure 2.2 : Effet de l'activité PG sur la viscosité et la libération des groupes réducteurs 40
Figure 2.3 : Effet de la température sur l'activité PG 40
Figure 2.4 : Effet du pH sur l'activité PG 40
Figure 2.5 : Effet de la concentration en $CaCl_2$ sur l'activité PG 41
Figure 2.6 : Evolution de l'activité PME en fonction des teneurs en pectines totales et solubles au cours de la maturation 41
Figure 2.7 : Effet du pH sur l'activité PME 42
Figure 2.8 : Effet de la température sur l'activité PME 42
Figure 2.9 : Effet de la concentration en NaCl sur l'activité PME 42
Figure 2.10 : Effet de la concentration en $CaCl_2$ sur l'activité PME 43
Figure 2.11 : Evolution de l'activité cellulose en fonction de la teneur en cellulose de la datte au cours de la maturation 43
Figure 2.12 : Evolution de l'activité cellulase en fonction du temps 44
Figure 2.13 : Evolution de l'activité cellulase en fonction du pH 44
Figure 2.14 : Evolution de l'activité cellulase en fonction de la température 44
Figure 3.1: Structure chimique de quelques composés phénoliques 59
Figure 3.2 : Les différentes réactions catalysées par les PPO 63
Figure 3.3 : Effet du pH sur l'activité PPO 68
Figure 3.4 : Effet de la température sur l'activité PPO 69
Figure 3.5 : Formules chimiques de quelques caroténoïdes 75
Figure 4.1 : Série biologique des arômes 81
Figure 4.2 : Appareil d'extraction de Likens et Nickerson 88
Figure 4.3 : Spectres de masse de quelques composés identifiés 95

Liste des abréviations

Stade I : premier stade de maturation, stade vert ou Kimri
Stade II : deuxième stade de maturation ou stade Khalal
Stade III : troisième stade de maturation, stade rouge ou Routab
Stade IV : quatrième stade de maturation, stade mûr ou Tamar
MF : matière fraîche
MS : matière sèche
PVP : polyvinylpyrrolidone
UI : unité internationale
PME : pectineméthylestérase
PG : polygalacturonase
NDF : neutral detergent fiber
ADF : acid detergent fiber
MIA : matériel insoluble à l'alcool
PSE : pectines solubles à l'eau
PSO : pectines solubles à l'oxalate
PSH : pectines solubles à l'acide
DM : degré de méthylation
Gal A : acide galacturonique
η_{sp} **:** viscosité spécifique
A_{234} **:** absorbance à 234 nm
A_{270} **:** absorbance à 270 nm
A_{285} **:** absorbance à 285 nm
PPO : polyphénoloxydase
V*i* : vitesse initiale
SDE : distillation extraction simultanées
CPG : chromatographie phase gaz
CG-SM : chromatographie phase gaz-spectroscopie de masse
TR : temps de rétention
IR : indice de rétention
IR-Std : indice de rétention des étalons

Introduction ...

Le palmier dattier *(Phœnix dactylifera* L.) constitue l'une des espèces fruitières dont la culture existe depuis l'antiquité. Quatre mille ans avant Jésus Christ, les dattes étaient déjà connues, cultivées et commercialisées.

Dans l'ancien monde, les grandes régions productrices de dattes sont le Proche-Orient avec notamment l'Irak, l'Iran, l'Egypte, l'Arabie Saoudite et le Maghreb avec l'Algérie, la Tunisie, le Maroc et la Libye.

Dès le début du XIXème siècle, des palmiers dattiers, en petit nombre, ont été plantés au Pérou, en Argentine, au Mexique, en Australie et en Afrique du Sud. D'importantes plantations, de création récente, existent aussi en Californie méridionale.

En Algérie, les palmeraies sont situées au Nord du Sahara au niveau des Oasis où les conditions de culture leur sont favorables. Les principales régions de production sont : la vallée du Mzab, les Zibans, l'Oued-Righ, Ouargla, le Souf, Béchar, Béni-Ounif, la vallée de la Saoura, le Touat, Gourara, Tidikelt et El-Goléa.

Il existe un grand nombre de variétés de dattiers, estimé à environ 200, qui se différencient par la consistance de leurs fruits et par leur appréciation par le consommateur. Ainsi, on peut distinguer les variétés communes (Ghars, Degla-beïda, Mech-degla, Tazerzaït, Tantboucht,...) et la variété Deglet-nour.

De par la place qu'elle occupe dans l'agriculture saharienne, la phoeniciculture constitue la principale ressource alimentaire des oasis et joue un rôle majeur dans la création, le maintien et le développement des économies de base à l'échelle oasienne.

Disposant d'un effectif important de palmiers dattiers productifs, soit 8 % de la production mondiale (**F.A.O.**, 2006), et d'un éventail variétal très large, l'Algérie possède en la variété Deglet-nour une datte appréciée aussi bien sur le marché local qu'étranger. Cependant, elle est, particulièrement, sensible à différentes altérations (biochimiques et technologiques).

La maturation des fruits est une série coordonnée d'un ensemble de processus biochimiques qui résultent de la synthèse et de la dégradation des pigments, de la conversion de l'amidon en sucre, des changements de la fermeté et de la texture, de la production de substances volatiles, de l'augmentation de la respiration des fruits et éventuellement leur sénescence (**Speirs** et **Brady**, 1991).

La texture constitue le facteur prépondérant dans la détermination de la qualité organoleptique de la datte; il apparaît donc que la maîtrise du processus de ramollissement des fruits revêt une importance économique certaine en matière de stockage, de transport et de distribution des fruits.

Par ailleurs, dès la récolte, une caractéristique essentielle pour la qualité de la variété Deglet-nour est à prendre en considération : la couleur. En effet, la couleur noire des dattes recherchée pour la plupart des variétés ne l'est pas pour la datte Deglet-nour dont la couleur ambrée, qui représente un critère de qualité pour ce type de datte, doit être préservée par le maintien du brunissement enzymatique à un niveau faible (**Belarbi** *et al.*, 2003).

Cependant, au cours de la maturation et du stockage, la datte est exposée à certaines évolutions qui affectent la fermeté, la couleur mais aussi les caractères organoleptiques, en particulier, les arômes.

Dans ce sens, les objectifs de ce travail sont :

- d'évaluer la composition biochimique globale de la datte au cours de la maturation ainsi que les constituants de la paroi végétale,
- de déterminer les changements quantitatifs de l'activité des principales enzymes de la paroi de la datte (polygalacturonases, pectineméthylestérases, cellulases) puis de discuter leur rôle dans le processus de fermeté du fruit au cours de la maturation,
- d'établir l'interrelation entre les sucres, les protéines, les lipides et les composés phénoliques avec les modifications chimiques dues aux enzymes impliquées dans la couleur (brunissement) et l'arôme de la datte Deglet-nour (invertase, lipoxygénase, polyphénoloxydase).

En somme, la maîtrise des facteurs d'altération post-récolte ainsi qu'une meilleure connaissance des caractéristiques des dattes, permettront d'assurer un revenu aux phoeniciculteurs et contribueront à maintenir l'équilibre fragile des systèmes oasiens.

Ce travail a donné lieu à la rédaction de quatre publications :

Benchabane A., Abbeddou S., Bellal M.M., Thibault J.F. Evolution des pectines et des activités polygalacturonases au cours de la maturation de la datte *Deglet-nour*. *Sciences des Aliments*, **26**, 233-246 (2006).

Benchabane A., Kechida F., Bellal M.M. Caractérisation des substances pectiques et évaluation des autres composés pariétaux au cours de la maturation de deux variétés de datte d'Algérie. *Annales de l'Institut National Agronomique,* **21**, 33-39 (2000).

Benchabane A., Yahiaoui K., Saoudi Z. Extraction et caractérisation des enzymes de la datte *Deglet-nour*. *Santé Plus,* **58**, 14-19 (1997)

Benchabane A., Meftah F., Saadi A. Technologie et qualité de la datte. Les composés pariétaux de la datte au cours de la maturation. *Journées Internationales sur le Palmier Dattier dans l'Agriculture d'Oasis dans les Pays Méditerranéens, 25-27 Avril 1995, Elche (Espagne), Options Méditerranénnes*, Série A, **28**, 209-214 (1996)

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DES PETITES MOLÉCULES DE LA DATTE:

SUCRES, ACIDES AMINÉS ET MINÉRAUX

CHAPITRE I : LES SUCRES

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. La teneur en eau

Aux différentes étapes de développement du fruit, la teneur en eau passe d'un extrême (soit 85 % à l'état vert) à l'autre (5-10 % à l'état mûr pour les dattes sèches du désert) ; entre ces limites, il y a plusieurs niveaux d'humidité. Les dattes demi-molles telles que Deglet-nour sont caractérisées par une teneur en eau de 50-60 % au stade II, de 35-40 % au stade III et autour de 20-24 % au stade IV, humidité requise par le marché dans le sens où la datte peut être stockée tout en gardant sa texture moelleuse.

Dans ce sens, la consistance du mésocarpe au stade mûr, permet de classer les dattes en trois catégories selon la texture du fruit (**Mustapha** *et al.*, 1986):

- les dattes molles : à chair aqueuse à l'état frais, nécessitant un traitement pour la réduction de leur teneur en eau pour être bien conservées. Cette dernière est supérieure à 30 % ; cas des variétés Ghars d'Algérie, Hallawi d'Irak et Mejhoul du Maroc,
- les dattes demi-molles : à consistance molle dont la teneur en eau varie entre 20 et 30 % ; cas de la variété Deglet-nour d'Algérie et Zahdi d'Irak,
- les dattes sèches : à pulpe naturellement sèche dont la teneur en eau est inférieure à 20 % ; cas des variétés Degla-beïda et Mech-degla d'Algérie et Kentichi de Tunisie.

Ces catégories sont généralement, et non pas exclusivement, associées à des teneurs en eau et des quantités de sucres particulières.

La teneur en eau est étroitement liée à la teneur en sucres et varie sensiblement au cours de la maturation. Elle décroît graduellement de la fin du stade I au milieu du stade II où le ramollissement a déjà commencé; par contre, elle chute rapidement au cours des stades III et IV (**Sawaya** *et al.*, 1982).

1.2. Les sucres

Les sucres sont l'élément prépondérant de la datte et, déjà, dans les anciens pays producteurs, les dattes ont été utilisées plutôt comme source de sucre que comme fruits. En effet, la forte teneur en sucres de la pulpe de datte confère à ce fruit une grande valeur énergétique (environ 3000 Kcal / Kg) (**Barreveld**, 1993).

En général, les teneurs en sucres totaux varient dans les limites de 50 à 85 % selon l'état physiologique et les variétés de dattes avec des proportions de 0 à 60 % de saccharose (**Barreveld**, 1993).

Les quantités relatives en sucres sont principalement déterminées par les caractères variétaux et l'origine géographique ne semble jouer aucun rôle sur la composition en sucres des fruits (**Booij** *et al.*, 1992; **Barreveld**, 1993). Néanmoins, **Dowson** et **Aten** (1963) rapportent que les dattes molles, à humidité importante, sont pauvres en saccharose, que les dattes sèches se caractérisent par une teneur élevée en ce sucre alors que les dattes demi-molles en contiennent une teneur intermédiaire (**tableau 1.1**).

La littérature rapporte que les sucres sont pratiquement constitués de saccharose, de glucose et de fructose bien que la présence d'autres sucres, en de faibles proportions, ne soit pas à exclure.

En effet, les teneurs en sucres totaux et réducteurs (glucose + fructose) augmentent parallèlement avec la progression de la maturation indépendamment de la qualité du fruit (**Booij** *et al.*, 1992).

En outre, la concentration des deux sucres réducteurs au cours de la maturation diffère en fonction de la variété. C'est ainsi que **Coggins** et **Knapp** (1969), **Booij** *et al.* (1992) et **Barreveld** (1993) ont observé, qu'aux premiers stades de la maturation de la datte Deglet-nour, la concentration est relativement la même pour le fructose aussi bien que pour le glucose mais le rapport fructose / glucose devient inégal aux derniers stades de la maturation.

Les quantités de sucres réducteurs et de saccharose dépendent de la variété et sont en relation avec la texture du fruit. Elles sont modifiées au cours de la maturation : dans le cas des dattes molles, les derniers stades de développement du fruit sont caractérisés par l'inversion du saccharose en glucose et fructose ; alors que dans les autres catégories de dattes, demi-molles et sèches, le saccharose s'accumule jusqu'au stade mûr bien que ce phénomène soit plus marqué dans le cas des dattes sèches.

La teneur en sucres réducteurs, principalement le glucose et le fructose, augmente graduellement pendant tout le processus du développement. Cette augmentation est remarquable quand le fruit atteint le stade rouge (Routab) et a tendance à continuer durant le processus de ramollissement.

La diminution de la teneur en saccharose et l'accroissement de la teneur en sucres réducteurs sont synchronisés avec l'activité de l'invertase qui est caractéristique à toutes les

Tableau 1.1 : Teneurs en eau (% MF) et en sucres (% MS) des dattes molles, demi-molles et sèches (**Cook** et **Furr**, 1952)

Dattes	Humidité	Sucres totaux	Sucres réducteurs	Saccharose
Molles				
Barhi	37,3	84,8	84,8	0
Khadrawi	24,4	82,2	82,2	0
Demi-molles				
Deglet-nour	24,1	77,1	38,6	38,5
Dayri	22,2	75,7	70,4	5,3
Zahdi	13,6	78,2	70,7	7,5
Sèches				
Thoori	15,5	73,0	40,9	32,1
Kinta	15,0	80,0	35,0	45,0

variétés de dattes. Cependant, l'hydrolyse du saccharose est partielle dans le cas des dattes demi-molles (**Sawaya** *et al.*, 1982).

1.3. L'invertase

L'invertase, dont le principe actif a été isolé en 1860 par Berthelot, a été mise en évidence en 1833 par Persoz ; c'est la première enzyme qui a été décrite. Dans la datte, elle a été signalée pour la première fois par **Vinson** (1908).

L'invertase (β-D-fructofuranoside fructohydrolase, E.C.3.2.1.26) est présente dans la datte sous deux formes, une soluble et une insoluble (**Hasegawa** et **Smolensky**, 1970 ; **Al-Bakir** et **Whitaker**, 1978 ; **Kanner** *et al.*, 1978; **Mustafa** *et al.*, 1986).
L'existence de fractions invertasiques soluble et insoluble a été signalée chez différents végétaux tels que la carotte (**Vaughan** et **Mac Donald**, 1967 ; **Hawker**, 1969), la betterave (**Vaughan** et **Mac Donald**, 1967) et le maïs (**Kivilaan** *et al.;* 1961, **Hawker**, 1969).

Cette enzyme joue un rôle primordial dans le métabolisme du saccharose au niveau des tissus des plantes (**Alexander**, 1972). Les deux formes ont une grande affinité vis-à-vis de leur substrat qu'elles dégradent en glucose et en fructose. Toutefois, l'invertase soluble est plus active que l'invertase insoluble.

Le degré d'inversion est fonction de l'activité de l'invertase, de la teneur en eau et de la température d'incubation (**Hasegawa** et **Smolensky**, 1970).

Par ailleurs, il a été démontré que la datte Deglet-nour dispose d'une activité invertasique. L'action spécifique de cette enzyme est inversement proportionnelle à la concentration en saccharose; ce qui permet, a priori, d'estimer le degré de maturation du fruit par le rapport saccharose sur sucres réducteurs.

L'activité de la fraction soluble, absente au stade vert (**Mustafa** *et al.*, 1986), commence à se développer durant la période de maturation du fruit alors que la proportion en invertase insoluble diminue de 50 % du stade vert au début du stade Routab, mais elle reste assez constante après ce dernier stade.

Comparée à d'autres activités, l'activité de l'invertase de la datte Deglet-nour est relativement basse, même à la fin du stade Routab (**Hasegawa** et **Smolensky**, 1970). Durant la fin du stade Routab et le stade Tamar, quand les dattes perdent beaucoup de leur texture et de leur eau, l'activité de l'invertase diminue (**Coggings** *et al.*, 1967).

Il est à noter que la teneur en invertase soluble augmente à la même allure que celle de l'activité polygalacturonase observée dans les dattes par **Hasegawa** *et al.* (1969).

Dans ce sens, **Acker** (1969) signale que dans les fruits à activité invertasique élevée, une humidité élevée est maintenue dans le but, a priori, de permettre aux enzymes responsables du ramollissement et du brunissement d'agir dans les meilleurs conditions. En effet, dans les dattes molles, caractérisées par une activité invertasique initiale élevée au stade Khalal, l'hydrolyse du saccharose est rapide et optimale. Ce processus de dégradation du saccharose provoque une perte en eau (**Ragab** *et al.*, 1956). Dans ce sens, **Kanner** *et al.* (1978), ont démontré que l'activité de l'eau qui résulte de la conversion du saccharose en glucose et fructose, est corrélée avec un taux d'évaporation réduit dans le fruit. Ce qui explique l'appartenance des variétés à activités invertasiques élevées à la catégorie de dattes molles.

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

La datte (*Phœnix dactylifera*, variété Deglet–nour) a été récoltée dans la palmeraie de Daouia à El-Oued (Algérie) sur plusieurs campagnes phoenicicoles.

Le domaine Daouia est par excellence le modèle concret d'un système de production oasien moderne (**Dubost**, 1992).

Les prélèvements sont échelonnés sur une période de douze semaines (Juillet à Octobre) suivant l'évolution du fruit au cours de son développement (**figure 1.1**).

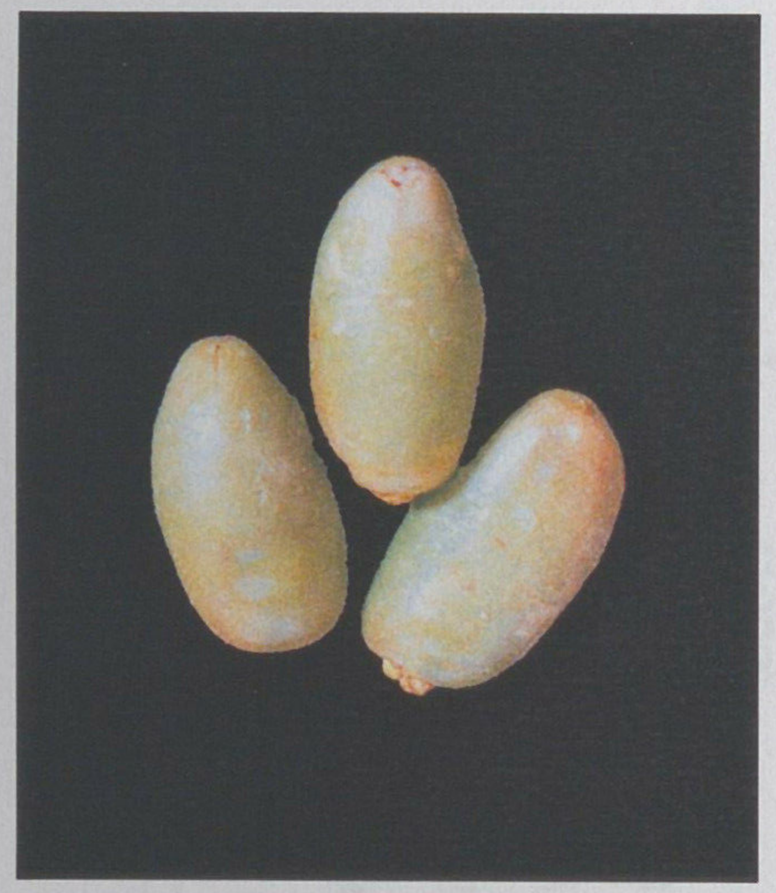
Le test retenu pour apprécier le degré de maturation des fruits est la couleur ; selon ce critère, les différents stades de maturation des dattes sont désignés par des termes arabes d'origine irakienne mais utilisés universellement, et définis comme suit (**Booij** *et al.*, 1992, **Mu'ayed** et **Madjid** , 1996) :

Stade I ou Kimri ou stade vert : premier stade de développement des fruits durant lequel les divisions cellulaires et leur élongation se produisent pour conduire au grossissement des dattes. Les fruits sont turgescents et verts avec un taux d'humidité élevé, une accumulation de sucres réducteurs et une très forte acidité. Les fruits sont récoltés 15 semaines après la pollinisation ;

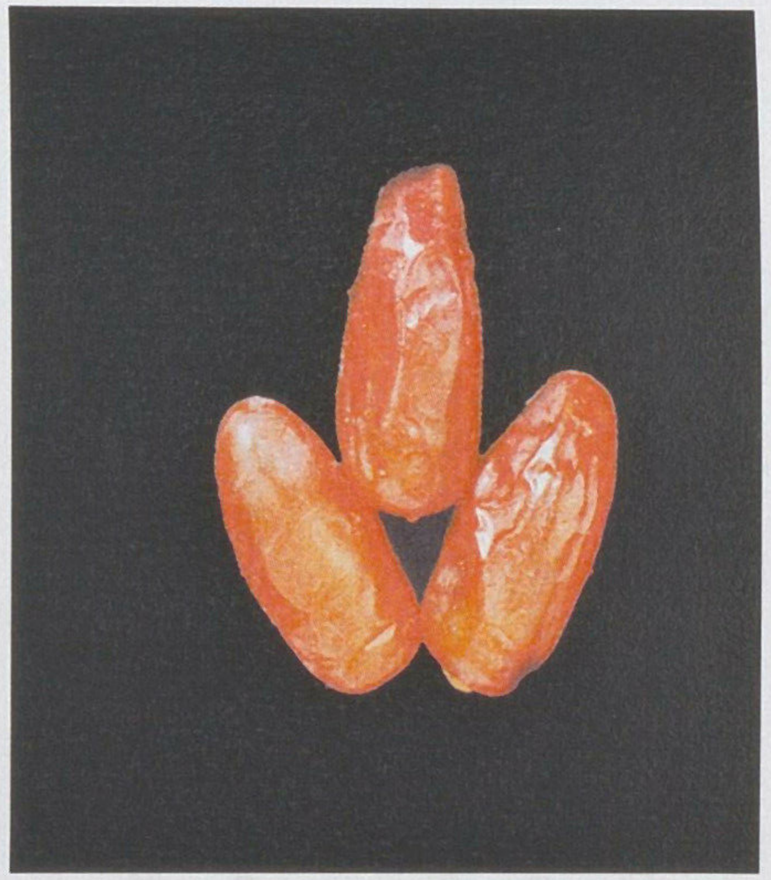
Stade II ou Khalal : stade de la maturité physiologique durant lequel les fruits gagnent la couleur caractéristique des fruits mûrs de cette espèce. Ils sont marqués par un accroissement rapide de la teneur en sucres totaux, en saccharose et en matière sèche alors que l'acidité réelle et le taux d'humidité diminuent. Les fruits sont récoltés 20 semaines après la pollinisation ;

Stade III ou Routab : phase de la maturation, où la datte devient molle, de couleur brune et perd de son astringence (les tanins sous la peau précipitent sous forme insoluble). Les fruits sont récoltés 22 semaines après la pollinisation ;

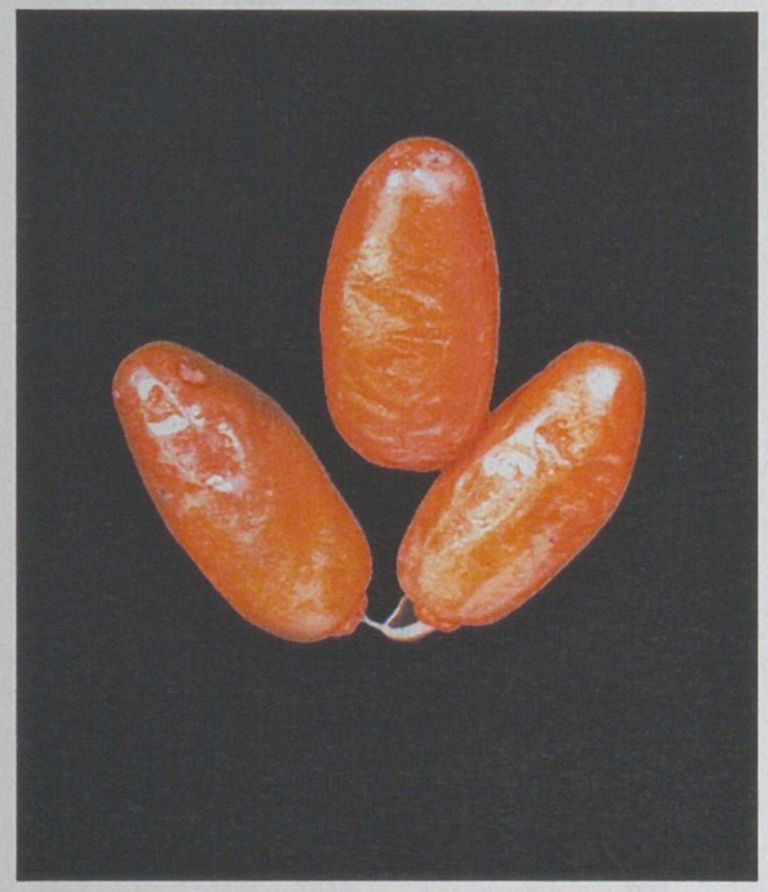
Stade IV ou Tamar ou stade mûr : correspond à l'étape finale de la maturation du fruit, généralement associée à une surmaturation, un ramollissement complet avec une évolution de la coloration vers le brun foncé et la perte de la presque totalité de l'eau. Les fruits sont récoltés 27 semaines après la pollinisation.



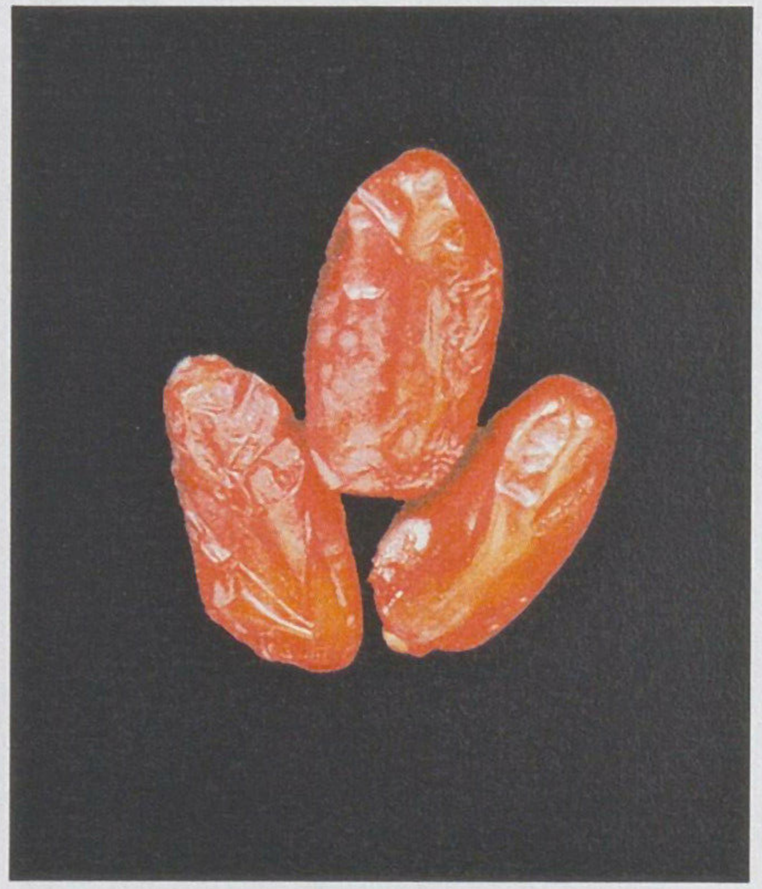
Stade I : Kimri



Stade III : Routab



Stade II : Khalal



Stade IV : Tamar

FIGURE 1.1 : Représentation de la datte Deglet-nour aux différents stades de maturation

2.2. Teneur en matière sèche

Une prise d'essai est étuvée à 104 °C jusqu'à poids constant. La mesure de la différence de poids donne la teneur en eau de l'échantillon.

2.3. Analyse quantitative des sucres

La méthode au phénol-sulfurique pour le dosage des sucres totaux (**Dubois** *et al.*, 1956), celle de Somogyi-Nelson pour les sucres réducteurs (**Somogyi** ,1937 ; **Nelson**, 1944) et la polarimétrie photométrique pour le saccharose (norme ISO 2911-93) ont été utilisées.

2.4. Analyse qualitative des sucres

2.4.1. Caractérisation par chromatographie sur couche mince (C.C.M)

Le principe est basé sur la séparation des sucres par migration ascendante. La phase stationnaire est du gel de silice alors que la phase mobile est un mélange de trois solvants de polarité différente: acétone, acétate d'éthyle et eau distillée (50, 40 et 10 % en volume).

Le dépôt représente une quantité de glucides éthanolosolubles totaux de l'ordre de 30 µg environ.

Après migration, les plaques sont séchées à 60 ° C et la révélation se fait par pulvérisation avec le réactif de Nigram et Giri puis séchage à 110 °C pendant 10 min (**Chibre**, 1979).

2.4.2. Caractérisation par chromatographie en phase gazeuse (C.P.G)

La détermination des mono, di et trisaccharides a été réalisée par la méthode préconisée par **Jouany** (1972).

Les sucres sont transformés en dérivés triméthylsilylés, qui, en plus de leur volatilité présentent une bonne stabilité thermique puisqu'il n'y a pas de décomposition pour une température d'injection de 300 °C.

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Fisons Instruments GC 9000), à détecteur F.I.D, équipé d'une colonne capillaire DB_1 (méthyl silicone), 30 m x 0,25 mm DI.

Le gaz vecteur est de l'azote (2ml min^{-1}). L'injecteur est maintenu à 240 °C alors que la température du four est programmée à 150 °C pendant 5 min puis à 310 °C pendant 8 min à raison de 5 °C min^{-1}.

2.5. Extraction et caractérisation de l'invertase

2.5.1. Extraction

L'extrait enzymatique brut est obtenu à partir de 25 g de pulpe de dattes décongelées et dénoyautées à une température de 4 °C. La pulpe est coupée en fragments puis broyée manuellement au mortier-pilon en présence de 125 ml du mélange (tampon phosphate 0,25 M - acide ascorbique 0,06 M, pH 7,5) contenant de la polyvinylpyrrolidone (PVP) à raison de 1 % en masse relativement à celle du matériel végétal (**Al-Bakir** et **Withaker**, 1978).

Le broyat est agité dans un mixeur pendant 2 min puis centrifugé à 15000 g à 4 °C pendant 30 min. Le surnageant, dialysé à 4 °C contre de l'eau distillée, est appelé invertase soluble; il est conservé pour la mesure de l'activité enzymatique alors que le culot subit une extraction similaire à la première. Après centrifugation, une suspension à 1 % du culot obtenu est considérée comme source d'invertase insoluble.

La PVP est ajoutée pour prévenir la formation du complexe protéines-tannins ou autres composés phénoliques (**Hasegawa** *et al.*, 1969, **Mustafa** *et al.*, 1986).

2.5.2. Mesure des activités

Le mélange réactionnel constitué de 0,3 ml d'extrait enzymatique et de 5 ml du mélange (tampon phosphate 0,1 M- saccharose 0,1 M, pH 4) est incubé à 30 °C.

L'absorbance est mesurée à 589 nm toutes les 5 min pendant 30 min.

La recherche de l'activité de l'invertase et son dosage sont effectués en référence à une invertase commerciale lyophilisée (invertase, β- Fructosidase) (Merck).

Une unité (UI) invertase est la quantité d'enzyme qui hydrolyse une µmole de saccharose par min à une température de 30 °C et un pH égal à 4.

2.5.3. Conditions et effecteurs

L'effet de la température sur l'activité enzymatique est déterminé à partir de milieux réactionnels incubés à des températures variant de 10 à 70 °C. Les solutions enzymatiques sont, préalablement, préchauffées à la température considérée.

L'effet du pH est mis en évidence, à 30 °C, dans l'intervalle de pH 3 - 7, dans des milieux réactionnels préparés dans les mêmes conditions que celle des mesures d'activité.

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Teneurs en eau et en sucres

Au stade mûr, les dattes de la variété Deglet-nour ont une teneur en sucres totaux de 60,5 % MS et une teneur en eau de 26 % MF (**tableau 1.2**).

La variété Deglet-nour perd de l'eau au fur et à mesure que la maturation progresse ; elle chute de plus de 50 % du stade vert au stade mûr ; ce qui implique une augmentation en composés solides totaux plus rapidement à l'approche de la maturité des fruits.

A ce propos, **Hasegawa** *et al.* (1969) observent une forte diminution de la teneur en eau pour la variété Deglet-nour qui passe de 82 % au stade vert à 28 % au stade mûr. Dans le même sens, **Kanner** *et al.* (1978), rapportent que le taux d'humidité passe de 44 à 32 % MF, de 50 à 21 % MF et de 49 à 35 % MF, respectivement, pour les variétés Halawi, Deglet-nour et Khadrawi, du stade vert au stade mûr. De leur côté, **Booij** *et al.* (1992) ciblent deux stades de maturation, le stade II et le stade IV, pour toutes les catégories de dattes. La diminution de la teneur en eau, entre ces deux stades, est de 41 % pour les variétés Bou Skri et Mejhoul (variétés molles), 60 % pour les variétés Deglet-nour et Zahidi (variétés demi-molles) et de 72 % pour la variété Thoory (variété sèche).

Ces résultats montrent que la variété Deglet-nour a tendance à perdre plus d'eau que d'autres variétés au cours de son développement.

Il est à noter que la datte, arrivée au stade III, a déjà perdu 55 % de sa teneur en eau enregistrée au stade vert. A ce stade, la teneur en sucres totaux, exprimée en g / datte, est multipliée par 3 (1,03 g au stade vert contre 3,69 g au stade Routab). En même temps, il y a un début d'accumulation des sucres réducteurs (4 fois plus qu'au stade vert) qui se stabilise au stade mûr (**figure 1.2**).

Dans ce sens, **Booij** *et al.* (1992) rapportent que les dattes demi-molles contiennent une teneur en saccharose intermédiaire à l'exception des cultivars Deglet-nour et Zahidi qui contiennent, respectivement, 60 % et 15 % MS au stade mûr.

La teneur en saccharose de la datte étudiée (soit 5,6 % MS au stade mûr) est largement inférieure à celles rapportées par **Cook** et **Furr** (1952) (soit 38,5 % MS au stade mûr) et **Booij** *et al.* (1992) pour des cultivars Deglet-nour d'Algérie (soit 60 % MS au stade mûr).Ces derniers auteurs rapportent que les cultivars de dattes peuvent être différenciés par la teneur en saccharose de leurs fruits.

Tableau 1.2 : Evolution de la teneur en eau (% MF) et en sucres (% MS) de la datte au cours de la maturation

Stades de maturation	Humidité	Sucres totaux	Sucres réducteurs	Saccharose
I	77,9 ± 1,7	50,5 ± 0,30	25,99 ± 0,41	19,24 ± 0,06
II	59,8 ± 2,0	53,00 ± 0,39	25,42 ± 0,68	21,88 ± 0,07
III	42,7 ± 2,1	54,96 ± 0,36	31,93 ± 0,77	9,53 ± 0,08
IV	26,4 ± 2,8	60,5 ± 0,70	37,81 ± 0,39	5,58 ± 0,07

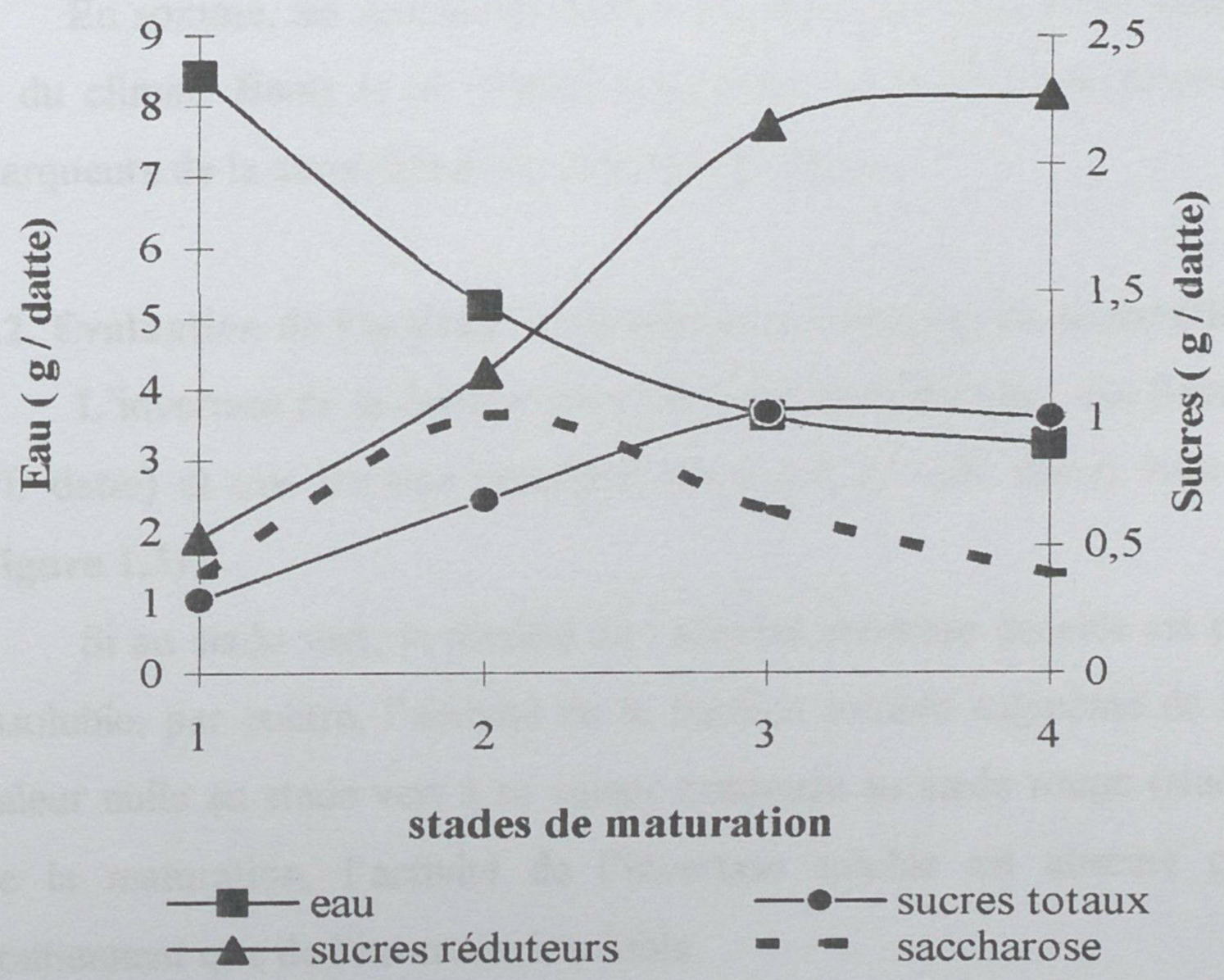


Figure 1.2 : Evolution de l'humidité et des sucres de la datte en fonction de la maturation

L'analyse des chromatogrammes montre que les sucres réducteurs sont présents en une solution équimolaire de glucose et de fructose résultant de l'hydrolyse du saccharose, à tous les stades de maturation. Les quantités de saccharose diminuent aux stades II et III suite à son inversion en sucres réducteurs sous l'action de l'invertase.

Dans ce sens, il existe une relation étroite entre la réduction des sucres et la teneur en eau des dattes, contrôlée par l'enzyme clé qui est l'invertase.

Quelques oses (et hexoses) ont été identifiés, il s'agit de l'arabinose, du xylose, du galactose et du mannose, particulièrement, aux stades II et IV, et en quantités moindres aux stades I et III.

Les quantités de saccharose et de sucres réducteurs dans la datte dépendent du cultivar et sont en relation avec la texture du fruit et, en particulier, avec sa teneur en eau et la température du milieu ; cette dernière est en moyenne de 30 à 33 °C en Septembre (stade III) et de 26 à 27 °C en Octobre (stade IV) dans la région d'étude.

En somme, les sucres des dattes varient en fonction de la variété, du stade de maturité et du climat. **Booij** *et al.* (1992) suggèrent l'utilisation des sucres des dattes en tant que marqueurs de la caractérisation variétale du dattier.

3.2. Evaluation de l'activité invertasique au cours de la maturation

L'invertase de la datte se présente sous deux formes : une fraction soluble (de 4,7 à 8,2 UI/ datte) et une fraction insoluble (de 2,3 à 3,7 UI/ datte) avec une distribution inégale (**figure 1.3**).

Si au stade vert, la totalité de l'activité invertase décelée est celle relative à la fraction insoluble, par contre, l'activité de la fraction soluble augmente de façon remarquable d'une valeur nulle au stade vert à sa valeur maximale au stade rouge (stade III). Au premier stade de la maturation, l'activité de l'invertase soluble est absente car les dattes vertes ne contiennent que de l'invertase insoluble.

A l'inverse de l'augmentation rapide de l'invertase soluble, il est à relever une diminution d'environ 40 % de l'activité de l'invertase insoluble durant la période de maturation; activité qui se stabilise à une valeur de 2,3 UI/ datte au dernier stade.

Au stade III, l'activité de l'invertase soluble atteint 8,2 UI/ datte et diminue légèrement pour atteindre une activité de 7,1 UI/ datte au stade IV.

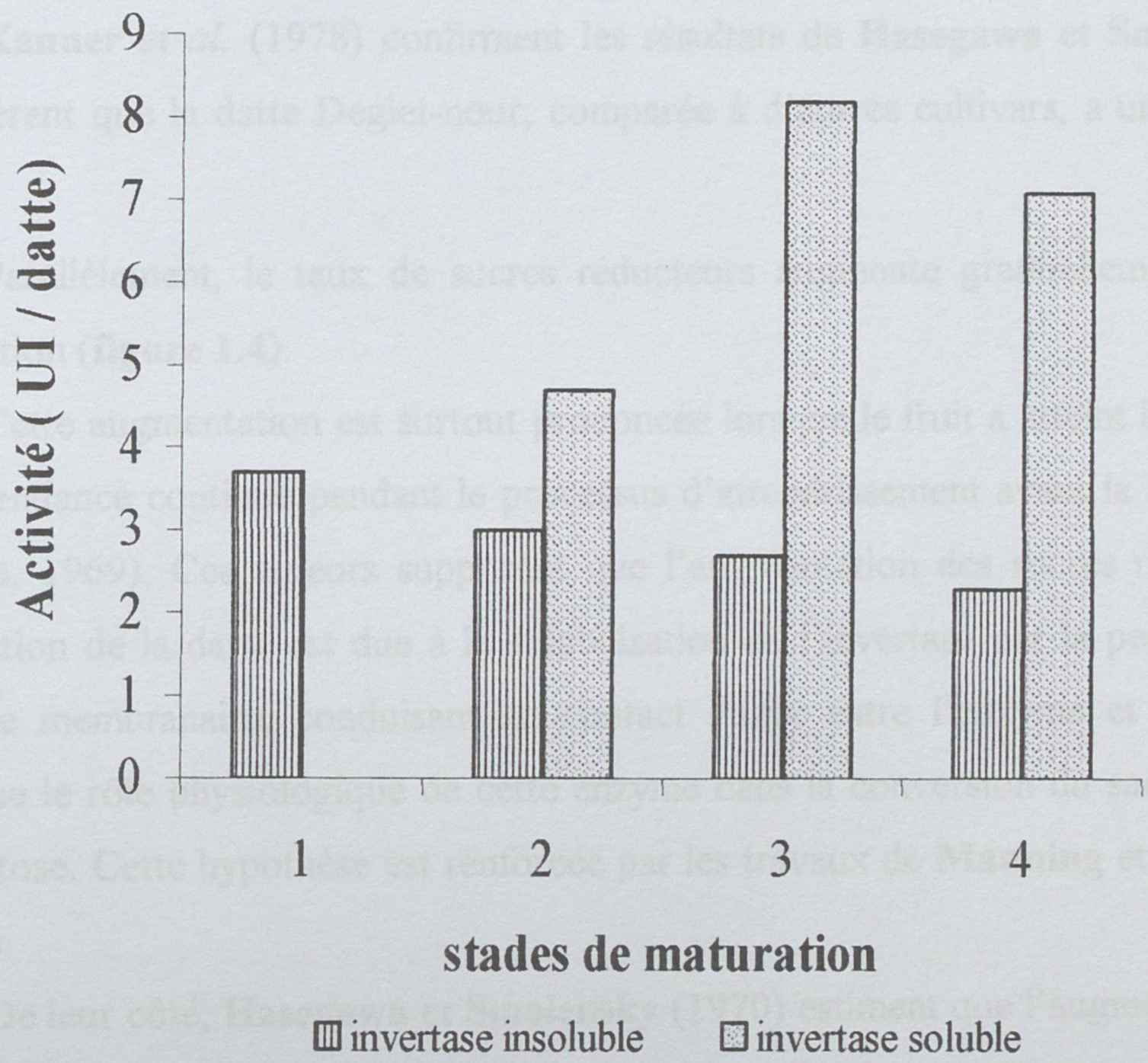


Figure 1.3 : Evolution de l'invertase en fonction de la maturation

Cependant, ces valeurs de l'activité invertase totale au stade mûr (9,4 UI/ datte) sont légèrement inférieures à celles mentionnées par **Hasegawa** et **Smolensky** (1970), soit une valeur de 12,5 UI/ datte pour la variété Deglet-nour de Californie ; valeur qui correspond à son niveau le plus élevé.

Le rapport invertase soluble/ invertase insoluble varie de 0 au stade vert jusqu'à 3 dans le stade mûr en accord avec l'intervalle préconisé par **Hasegawa** et **Smolensky** (1970).

La solubilisation de l'invertase débute à partir du stade II où on enregistre un gain d'activité totale de 30 % au stade III, stade où le niveau d'activité est le plus élevé.

Kanner *et al.* (1978) confirment les résultats de **Hasegawa** et **Smolensky** (1970) et considèrent que la datte Deglet-nour, comparée à d'autres cultivars, a une activité invertase faible.

Parallèlement, le taux de sucres réducteurs augmente graduellement au cours de la maturation (**figure 1.4**).

Cette augmentation est surtout prononcée lorsque le fruit a atteint le stade Khalal, puis cette tendance continue pendant le processus d'attendrissement avant la récolte (**Coggins** et **Knapp**, 1969). Ces auteurs supposent que l'augmentation des sucres réducteurs durant la maturation de la datte est due à la solubilisation de l'invertase par la perte de l'intégrité du système membranaire, conduisant au contact direct entre l'enzyme et le substrat; ce qui explique le rôle physiologique de cette enzyme dans la conversion du saccharose en glucose et fructose. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de **Manning** et **Maw** (1975) sur la tomate.

De leur côté, **Hasegawa** et **Smolensky** (1970) estiment que l'augmentation de l'activité de l'invertase insoluble au stade Routab est le premier facteur qui provoque l'augmentation de la teneur en sucres réducteurs. Cette opération a pour but d'inhiber les polyphénoloxydases, aussi actives à ce stade de la maturation de la datte (**Maier** et **Shiller**, 1961).

L'approche de ces auteurs n'est pas incompatible si l'on considère que la perte de l'intégrité du système membranaire joue un rôle dans la solubilisation de l'invertase (**Mustafa** et *al.*, 1986).

Il apparaît, dans cette étude, que l'augmentation des sucres réducteurs commence avant qu'il y ait une solubilisation appréciable de l'invertase. Néanmoins, une solubilisation

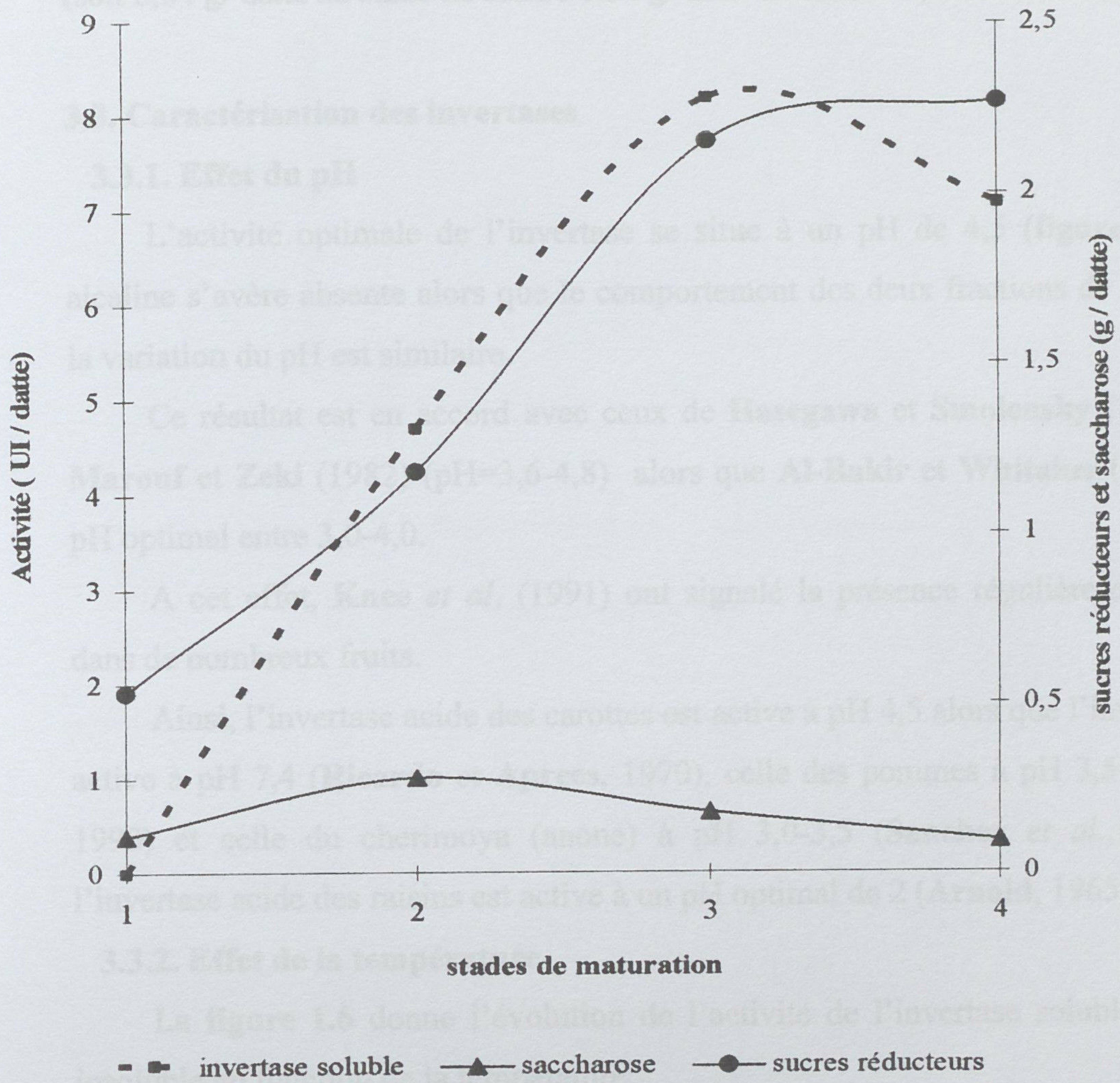


Figure 1.4 : Evolution des sucres réducteurs et du saccharose en fonction de l'activité invertase soluble au cours de la maturation

maximale de cette enzyme au stade III induit la conversion de plus de 50 % du saccharose (soit 0,64 g/ datte au stade III contre 0,34 g/ datte au stade IV) en sucres réducteurs.

3.3. Caractérisation des invertases

3.3.1. Effet du pH

L'activité optimale de l'invertase se situe à un pH de 4,5 (**figure 1.5**) ; l'invertase alcaline s'avère absente alors que le comportement des deux fractions de l'invertase lors de la variation du pH est similaire.

Ce résultat est en accord avec ceux de **Hasegawa** et **Smolensky** (1970) (pH=4,5) et **Marouf** et **Zeki** (1982) (pH=3,6-4,8) alors que **Al-Bakir** et **Whitaker** (1978) trouvent un pH optimal entre 3,0-4,0.

A cet effet, **Knee** *et al.* (1991) ont signalé la présence régulière d'invertases acides dans de nombreux fruits.

Ainsi, l'invertase acide des carottes est active à pH 4,5 alors que l'invertase alcaline est active à pH 7,4 (**Ricardo** et **Aprees**, 1970), celle des pommes à pH 3,5-4,0 (**Tsay** et **Wu**, 1990) et celle du cherimoya (anone) à pH 3,0-3,5 (**Sanchez** *et al.*,1998). Cependant, l'invertase acide des raisins est active à un pH optimal de 2 (**Arnold**, 1965).

3.3.2. Effet de la température

La **figure 1.6** donne l'évolution de l'activité de l'invertase soluble et de l'invertase insoluble en fonction de la température.

La température optimale d'hydrolyse pour les deux fractions invertasiques est de 30 °C; au-delà de cette température, une diminution remarquable de l'activité est enregistrée au fur et à mesure que la température d'hydrolyse augmente, pour atteindre une valeur nulle à 70 °C.

Par ailleurs, si dans certaines plantes, les propriétés des deux fractions invertasiques peuvent être similaires (**Arnold**, 1965); **Sacher** (1966) signale que dans le même tissu, l'invertase soluble pourrait être différente de l'invertase insoluble.

A priori, les résultats obtenus montrent que les propriétés des fractions invertasiques soluble et insoluble de la datte Deglet-nour sont approximativement identiques.

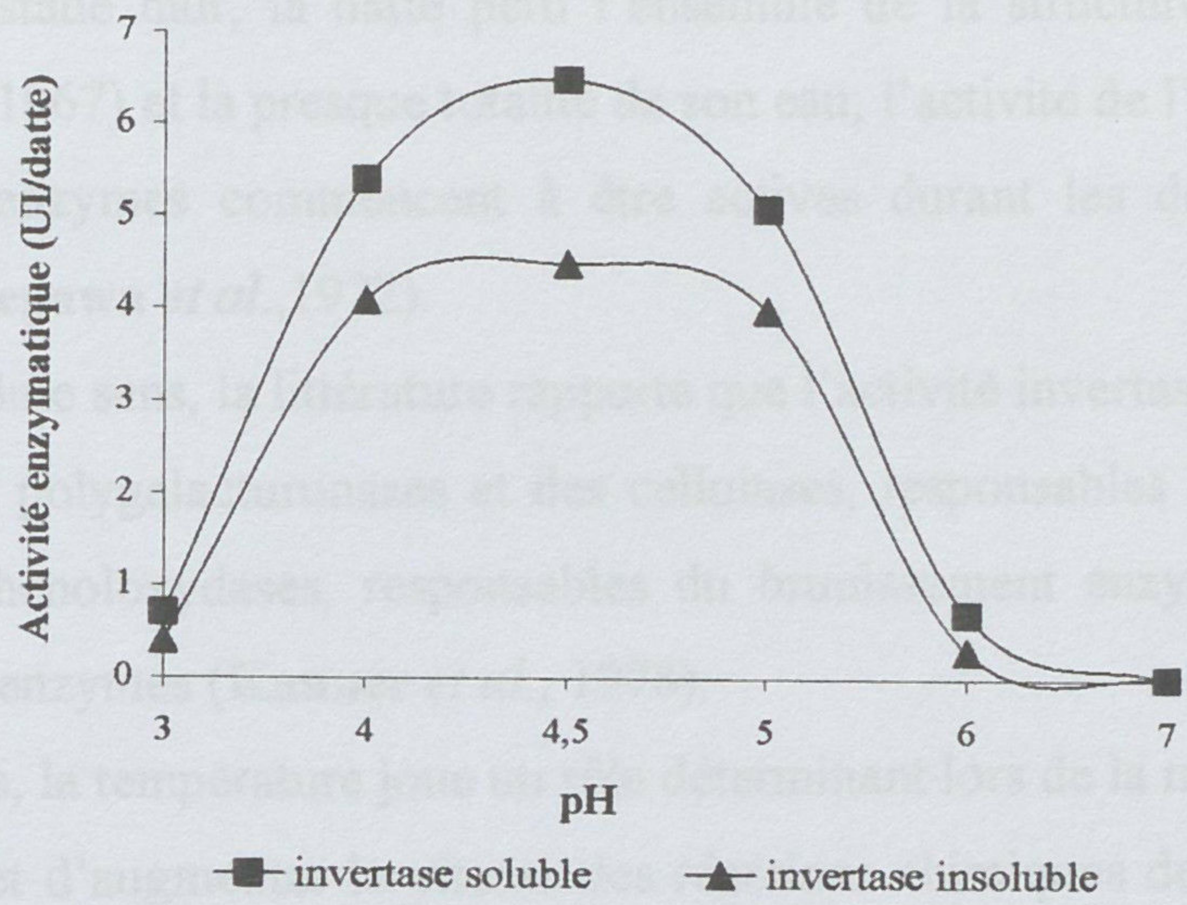


Figure 1.5 : Effet du pH sur l'activité des invertases

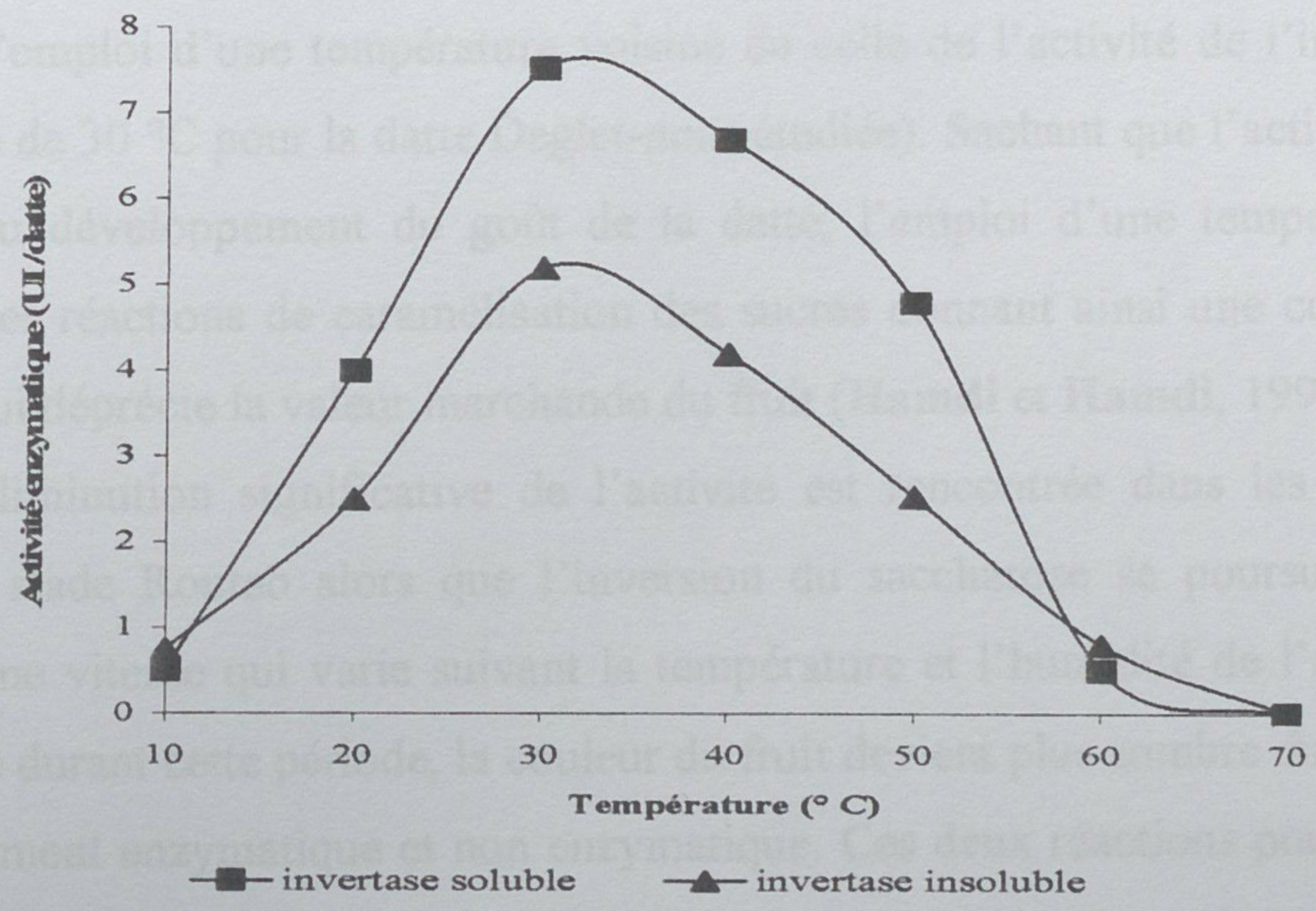


Figure 1.6 : Stabilité des invertases

DISCUSSION

Durant le stade mûr, la datte perd l'ensemble de la structure de la paroi cellulaire (**Coggins** *et al.*, 1967) et la presque totalité de son eau; l'activité de l'invertase diminue alors que les autres enzymes commencent à être actives durant les deux derniers stades de maturation (**Hasegawa** *et al.*,1972).

Dans le même sens, la littérature rapporte que l'activité invertasique se déclenche avant les activités des polygalacturonases et des cellulases, responsables de la texture; ainsi que celle des polyphénoloxydases, responsables du brunissement enzymatique; elle influence l'activité de ces enzymes (**Kanner** *et al.*, 1978).

Par ailleurs, la température joue un rôle déterminant lors de la maturation des dattes. En effet, elle permet d'augmenter la vitesse des réactions chimiques de deux à trois fois, pour chaque élévation de 10°C, suivant la loi de Vanoff (**Al-Ogaidi** et **Aref**, 1985).

Ainsi, la température a un effet direct sur l'accumulation et l'inversion des sucres simples ainsi que sur la vitesse de déshydratation des dattes (**Hamdi** et **Hamdi**, 1991).

Dans ce sens, **Rygg** (1971) a préconisé pour la datte Deglet-nour une température de maturation maximale de 35 °C afin de conserver son parfum et sa couleur blonde caractéristiques.

En effet, la maturation artificielle est largement favorisée aux dépends du séchage des dattes par l'emploi d'une température voisine de celle de l'activité de l'invertase (soit une température de 30 °C pour la datte Deglet-nour étudiée). Sachant que l'activité de l'invertase contribue au développement du goût de la datte, l'emploi d'une température supérieure provoque des réactions de caramélisation des sucres donnant ainsi une couleur foncée aux dattes, ce qui déprécie la valeur marchande du fruit (**Hamdi** et **Hamdi**, 1991).

Une diminution significative de l'activité est rencontrée dans les fruits récoltés et stockés au stade Routab alors que l'inversion du saccharose se poursuit dans les fruits stockés à une vitesse qui varie suivant la température et l'humidité de l'air ambiant. Il est courant que durant cette période, la couleur du fruit devient plus sombre du fait des réactions du brunissement enzymatique et non enzymatique. Ces deux réactions pourraient affecter la structure et l'activité de l'enzyme.

Dans la datte, l'invertase est une enzyme-clé qui contrôle le taux de sucres réducteurs et d'eau dans le fruit ; paramètres qui influent sur les qualités organoleptiques de la datte.

Lors du stockage, le conditionneur de dattes doit maintenir une température peu élevée pour éviter l'inversion du saccharose qui rendrait les dattes sirupeuses (cas des dattes molles)

et ferait perdre à la variété Deglet-nour sa propriété de datte demi-molle; et par la même sa qualité marchande.

CHAPITRE II : LES ACIDES AMINES

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Les protéines se trouvent dans la datte dans les limites de 1-3%. Bien que leur profil en acides aminés soit favorable aux besoins humains, les teneurs sont trop faibles pour être considérées comme une source alimentaire importante. La composition en acides amines totaux ou libres a été étudiée à plusieurs occasions (**Grobbelaar** *et al.*, 1955; **Rinderknecht**, 1959).

La disponibilité des acides aminés, en vue de leur absorption par l'organisme pour participer aux différentes synthèses protéiques, est conditionnée par la rapidité de leur libération par les protéines alimentaires, sous l'action des enzymes protéolytiques, dans la partie antérieure du tube digestif.

Cependant, les constituants glucidiques, principaux constituants de la matière sèche des dattes, empêchent l'accessibilité des protéines aux enzymes digestives alors que les tanins agissent avec les protéines, par la formation de liaisons covalentes, pour donner des complexes difficiles à hydrolyser par les protéases (**Godon**, 1996).

Les teneurs en acides aminés des dattes ont été étudiées pour les variétés irakiennes Hallawi, Khadrawi et Sayir par **Al-Rawi** *et al.* (1967), pour la variété égyptienne Baladi par **Salem** et **Hegazi** (1971), pour les variétés soudanaises Barakawi, Gundela et Tamoda par **Nour** et **Magboul** (1985) et pour 21 variétés tunisiennes dont Deglet-nour par **Reynes** *et al.* (1994).

L'évolution de plusieurs cultivars, en fonction des différents stades de maturité, a été étudiée principalement par **Booij** *et al.* (1992).

Par ailleurs, les fonctions amines provenant d'acides aminés libres ou de chaînes latérales sur des protéines établissent des liaisons covalentes avec la fonction aldéhydique ou cétonique terminale pour former une aldosamine ou une cétosamine entraînant des pertes en acides aminés qui peuvent être importantes. Les produits résultant de ces réactions influent de façon très sensible sur la couleur du fruit (réactions de Maillard) (**Rinderknecht**, 1959). Ces réactions sont négligeables avec les composés glucidiques macromoléculaires en raison du faible nombre d'oses terminaux réducteurs présents mais sont à prendre en considération pour la datte Deglet-nour de par sa teneur en sucres réducteurs et en saccharose ; l'interaction

des oses réducteurs avec les composés aminés provoquent un brunissement plus ou moins rapide durant le stockage (**Rinderknecht**, 1959).

Dans tous les cas, le sucre est considéré comme l'agent actif responsable de l'intensité de la réaction; l'acide aminé et la protéine se comportent beaucoup plus comme des éléments passifs soumis à la réactivité des glucides réducteurs. A concentration moléculaire égale, les sucres sont d'autant plus réactifs que leur poids moléculaire est plus petit. Cependant, le fructose offre une réactivité plus faible que celles des hexoses aldéhydiques (**Adrian** *et al.*, 1982). Dans la datte, c'est donc la nature des sucres qui conditionne, en partie, la réaction de Maillard, le fructose étant lui-même peu réactif, le saccharose reste inactif tandis que le glucose apporte les groupements réducteurs nécessaires à la réaction.

Pratiquement, la réaction étant équimoléculaire entre les sucres et les acides aminés, le facteur limitant est la faible concentration en acides aminés et en peptides solubles.
Enfin, **Maier** et **Schiller** (1961) ont suggéré que l'unique voie possible du brunissement non enzymatique dans la datte est la condensation des acides aminés - sucres réducteurs qui produisent des composés carbonyles volatiles responsables de la flaveur.

Ainsi, dans d'autres cultivars riches en sucres réducteurs au stade mûr (cas de la variété Khadrawi), le brunissement non enzymatique développe un goût caramel plus rapide que dans la datte Deglet-nour (**Kanner** *et al.*, 1978).

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

La datte (*Phœnix dactylifera*, variété Deglet–nour), décrite précédemment, a été utilisée.

2.2. Dosage des acides aminés totaux

Un échantillon de 10 g de pulpe de dattes dénoyautées et décongelées à une température de 4 °C est homogénéisé dans un broyeur à couteaux en présence de 50 ml de méthanol puis laissé à 4 °C pendant 24 heures.

Le mélange est ensuite centrifugé à 12500 g pendant 30 min à 4 °C, dans le but d'éliminer les pectines, les sucres et les autres composés pouvant interférer avec les acides aminés puis le surnageant est filtré.

Le filtrat, récupéré dans HCl 6N et conservé sous azote, est séché à 115 °C pendant 24 heures. L'échantillon est ensuite séché sous vide et le standard interne (norleucine) est ajouté en quantité suffisante. Après remise à sec du mélange, on procède à la préparation des dérivés iso amyl-heptafluorobutyrés.

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Fisons Instruments GC 9000), à détecteur F.I.D, équipé d'une colonne capillaire DB_1 (méthyl silicone), 30 m x 0,25 mm DI.

Le gaz vecteur est de l'azote (2ml min^{-1}). L'injecteur est maintenu à 250 °C alors que la température du four est programmée à 250 °C.

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Teneurs en acides aminés totaux

Treize acides aminés ont été détectés dans la datte Deglet-nour au cours de la maturation (**tableau 1.3**).

La littérature rapporte entre 13 et 18 acides aminés détectés dont 6 en moyenne sont des acides aminés essentiels (**Al-Rawi** *et al.*, 1967; **Salem** et **Hegazi**, 1971; **Nour** et **Magboul**, 1985; **Booij** *et al.*, 1992; **Hassouna** *et al.*,1994; **Reynes** *et al.*,1994).

Les teneurs en acides aminés de la datte à ses différents stades de développement s'est révélée être très hétérogène. Cependant, parmi les acides aminés identifiés, seuls l'acide γ-aminobutyrique et l'acide aspartique évoluent avec la maturation dans le même sens que les acides aminés totaux.

Les acides aminés essentiels révélés se retrouvent dans la datte à tous les stades de maturation, hormis la VAL au stade II et l'ILE au stade IV. D'une teneur équivalente (entre 6 et 7 % des acides aminés totaux) aux stades I et II, ils passent à 17,2 % au stade III puis à 23,2 % au stade IV. Cette augmentation est d'autant plus intéressante que les teneurs en acides aminés totaux diminuent au cours de la maturation de la datte.

En effet, le taux d'acides aminés passe de 169,95 mg /100 g de M.S au stade I à 72,28 mg /100 g de MS au stade IV.

Dans ce sens, **Reynes** *et al.* (1994) rapportent des taux d'acides aminés totaux très variables selon les variétés (82 à 700 mg/100 g de MS). En général, les dattes sèches sont plus riches en acides aminés (**Al-Rawi** *et al.*, 1967; **Salem** et **Hegazi**, 1971; **Nour** et **Magboul**, 1985) que les autres catégories de dattes mais sont moins aptes à une bonne conservation (**Reynes** *et al.*,1994). Ces derniers auteurs signalent que la variété tunisienne Kentichi qui présente une très faible teneur en acides aminés (100,5 mg / 100 g de MS) montre une bonne aptitude à la conservation et se caractérise par une coloration très claire après un stockage prolongé.

D'autre part, les acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents; néanmoins, le taux de la phénylalanine seule est assez élevé comparé à la tyrosine alors que le taux de la méthionine est faible.

Cette appréciation des acides aminés montre que la qualité des protéines de la datte est relativement bonne malgré leur faible teneur.

Tableau 1.3 : Teneurs en acides aminés totaux de la datte au cours de la maturation (mg / 100 g de matière sèche)

Acides aminés	Stades de maturation			
	I	II	III	IV
Acide γ-aminobutyrique GAB)	106,2	70,65	68,13	28,44
Arginine (ARG)	18,32	46,00	1,60	7,20
Glycine (GLY)	15,85	19,48	12,21	15,46
Acide aspartique (ASP)	8,70	2,65	2,52	0,78
Leucine (LEU)	7,04	0,46	7,70	0,85
Alanine (ALA)	2,60	14,22	2,06	0,87
Phénylalanine (PHE)	2,34	0,39	4,60	2,12
Acide glutamique (GLU)	2,07	0,66	1,11	0,74
Tyrosine (TYR)	1,65	0,94	0,00	0,55
Lysine (LYS)	1,15	3,35	1,49	5,36
Valine (VAL)	0,72	0,00	1,36	7,55
Isoleucine (ILE)	0,64	0,09	0,57	0,00
Méthionine (MET)	0,32	6,07	2,5	0,38
Acides aminés totaux	**169,5**	**166,08**	**105,85**	**72,28**

Dans leur étude sur la composition en acides aminés en fonction de différents stades de maturité de plusieurs cultivars de dattes, **Booij** *et al.* (1992) notent que même si les dattes ont une teneur non négligeable en acides aminés libres, ils ne permettent pas de retenir ce critère comme marqueur pour la caractérisation variétale.

CHAPITRE III : LES MINERAUX

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Selon la littérature, les éléments minéraux tels que l'azote (N), le potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le phosphore (P), le sodium (Na), le fer (Fe) et le cuivre (Cu) existent en quantité appréciable chez la datte.

Le **tableau 1.4** donne la composition en éléments minéraux de quelques fruits.
A priori, la datte occupe une place de choix comme aliment minéralisant au même titre que la plupart des fruits.

La teneur en minéraux est maximale au stade vert pour toutes les variétés de datte, mais décroît graduellement jusqu'au stade mûr tout en restant constante au début du stade Khalal pour les unes et décroissante jusqu'au stade Routab pour les autres (**Sawaya** *et al.*, 1982).

Les dattes se caractérisent, principalement, par une forte teneur en potassium qui, associé aux autres cations, fait de la datte un fruit alcalinisant (**Ulrich**, 1952 ; **Booij** *et al.*, 1992). Ces observations sont en accord avec celles de **Cleveland** et **Fellers** (1932) sur les dattes irakiennes, **Haas** et **Bliss** (1935) sur le cultivar Deglet-nour, **Sawaya** *et al.* (1983, a) sur les dattes saoudiennes, **Booij** *et al.* (1992) sur les cultivars Deglet-nour et Zahidi et **Reynes** *et al.* (1994) sur 21 variétés de dattes tunisiennes dont les cultivars Deglet-nour et Zahidi.

Du point de vue nutritif, les rapports Ca / P et Ca / Mg sont intéressants. En effet, le calcium est particulièrement abondant puisqu'il s'y trouve équivalent à celui du lait de vache considéré comme étant la meilleure source de calcium pour l'organisme, soit 125 mg / litre de lait.

Dans le même sens, la proportion des sels minéraux est significative au niveau nutritionnel (**Booij** *et al.*, 1992). Ils jouent des rôles fonctionnels importants de nature métabolique, en activant de nombreux systèmes enzymatiques, physico-chimique en contrôlant le pH, la neutralité électrique et les gradients de potentiel électrochimique.

Tableau 1.4 : Composition minérale (mg / 100 g MS) de quelques fruits (**Ulrich**, 1952)

	K	Ca	Mg	P	Na	Fe	Ca / P	Ca / Mg
Datte	300	127-190	66-96	35-75	16-54	3,2-4,7	2,5-3,6	1,92-1,98
Orange	1438	308	85	169	38	3,1	1,8	3,62
Abricot	2143	107	79	164	36	2,9	0,65	1,35
Pomme	750	38	38	69	13	2,5	0,55	1

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

La datte (*Phœnix dactylifera*, variété Deglet–nour), décrite précédemment, a été utilisée.

2.2. Détermination de la teneur en cendres totales

La teneur en cendres totales est déterminée après calcination d'un gramme de matière sèche dans un four à moufle à une température de 600 °C durant 1 heure. Après refroidissement, les cendres sont pesées.

2.3. Dosage des éléments minéraux

2.3.1. Détermination de l'azote total

La teneur en azote total est déterminée à partir de la pulpe fraîche (environ 1 g en matière sèche) selon la méthode de Kjeldahl.

2.3.2. Dosage des autres éléments minéraux

Pour analyser les éléments minéraux de la datte, il est nécessaire de les soustraire aux combinaisons organiques dans lesquelles ils sont plus ou moins impliqués et de les faire passer à l'état de sels minéraux solubles par destruction oxydative des molécules organiques lors de la minéralisation.

La minéralisation par voie sèche est appliquée aux dosages des éléments minéraux étudiés à savoir : P, Mg, Ca, Na et K.

Le dosage du phosphore a été réalisé par la méthode colorimétrique mise au point par **Duval** (1962), alors que les autres éléments (Na, K, Mg et Ca) l'ont été par spectrophotométrie d'émission à flamme dans un appareil de type Eppendorff.

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Evolution de la fraction minérale et des cendres au cours de la maturation

La concentration en éléments minéraux tend à décroître du stade vert au stade mûr (**tableau 1.5**).

Du stade vert au stade mûr, les teneurs en potassium, en calcium, en phosphore, en magnésium, en sodium et en azote chutent de 50 % en moyenne. Comparées aux teneurs en ces éléments rapportées par la littérature pour les dattes, ces dernières sont bien tenues à faibles, principalement, pour l'azote (**Minessy** *et al.*,, 1975) et pour le potassium (**Sawaya** *et al.*, 1983, b; **Booij** *et al.*, 1992; **Reynes** *et al.*, 1994).

Par ailleurs, le rapport Ca / P, supérieur à 1, confirme la qualité minéralisante de la datte Deglet-nour. Il se situe dans l'intervalle rapporté par **Youssif** *et al.* (1982), soit entre 1 et 1,5.

Ces auteurs signalent que seules les variétés Deglet-nour, Medjhoul, et Zahidi présentent ce rapport.

La teneur en cendres totales décroît du stade vert au stade mûr à un niveau similaire à celui des minéraux (chute d'environ 50 %). Cette teneur est comparable à celles rapportées par **Reynes** *et al.* (1994) pour la variété Deglet-nour et **Al-Farsi** *et al.* (2005) pour des variétés omanaises (Fard et Khasab) mais restent inférieures à celles relevées par **Sawaya** *et al.* (1982) et **Sawaya** *et al.* (1983, b) pour des variétés saoudiennes (Khudari, Sullaj, Barni, Ruzeiz et Sifri) et **Ba-Angood** et **Ahmed** (1984) pour 62 variétés de dattes émiraties.

Selon **Booij** *et al.* (1992), les sels minéraux peuvent contribuer à la caractérisation d'une origine géographique particulière. La nature des sols sur lesquels les palmiers sont cultivés et la composition de l'eau d'irrigation peuvent expliquer certaines différences.

Aussi, dans le but d'améliorer les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol, d'importants amendements organiques sont apportés dans les palmeraies de la région phoenicicole d'étude (El-Oued), apports qui conditionnent la production de dattes. En effet, cette région enregistre le rendement moyen pour la variété Deglet-nour le plus élevé au niveau national (45 kg / pied) quoique ce dernier reste faible comparé à ceux d'autres pays (**Kaddouri**, 1998).

Tableau 1.5 : Teneurs en éléments minéraux et en cendres totales (g / 100g MS) des dattes au cours de la maturation

Minéraux	Stades de maturation			
	I	II	III	IV
K	0,890 ± 0,020	0,500 ± 0,030	0,310 ± 0,040	0,280 ± 0,020
N	0,386 ± 0,020	0,285 ± 0,030	0,211 ± 0,010	0,150 ± 0,010
Ca	0,165 ± 0,005	0,130 ± 0,005	0,115 ± 0,005	0,090 ± 0,010
P	0,146 ± 0,004	0,135 ± 0,005	0,118 ± 0,003	0,075 ± 0,005
Mg	0,106 ± 0,005	0,085 ± 0,005	0,041 ± 0,004	0,033 ± 0,003
Na	0,032 ± 0,001	0,025 ± 0,000	0,021 ± 0,002	0,016 ± 0,001
Cendres totales	3,38 ± 0,03	2,82 ± 0,08	1,92 ± 0,08	1,60 ± 0,06

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DES MACROMOLÉCULES DE LA PAROI, DES PROTÉINES ET DES LIPIDES

CHAPITRE I : LES MACROMOLECULES DE LA PAROI

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Généralités

La texture, composante de la qualité organoleptique, est un facteur important des produits frais et transformés (**Diane** et **Carlos**, 1994 ; **El-Zoghbi**, 1994). En effet, en technologie fruitière, le succès de toute méthode de conservation chimique, physique ou génétique est déterminé par la préservation de la texture, de la flaveur et de la couleur du fruit conservé.

La texture d'un fruit est appréciée par la fermeté de la chair, fermeté qui peut être attribuée à trois faits (**Bartley** et **Knee**, 1982 ; **Tijskens** *et al.*, 1998) : la turgescence des cellules, les dimensions des méats et la distribution des pectines et des autres biopolymères de structure (cellulose, hémicelluloses). Le rôle des pectines dans cette évolution a été surtout étudié dans la littérature (**Aspinall**, 1980 ; **Brett** et **Waldron**, 1996 ; **Cosgrove**, 1997 ; **Grant- Reid**, 1997 ; **Hopkins**, 1999).

Les pectines sont le terme générique de macromolécules dont le composant dominant est une chaîne linéaire d'unités d'acide α-D-galacturonique, liées par des liaisons glycosidiques de type α (1,4) et plus ou moins estérifiées par du méthanol. Ces substances sont étroitement associées aux parois cellulaires et aux régions intercellulaires où elles accomplissent le rôle d'un élément adhésif permettant l'organisation des cellules en tissu chez les plantes supérieures (**Aspinall**, 1980 ; **Hopkins**, 1999).

La cellulose résulte de la condensation exclusivement linéaire d'unités anydro-D-glucopyranose, unies entre elles par des liaisons β(1,4). Sa fonction est de fournir à la membrane de la cellule végétale un cadre extérieur qui la soutienne et la protège. Le degré de rigidité et la solidité de ce squelette dépendent de l'épaisseur de cette paroi et des interactions entre son principal composant, la cellulose, et les autres constituants de la paroi à savoir : les hémicelluloses, les pectines, la lignine ainsi que les protéines telle que l'extensine (**Smith** et **Wood**, 1996 ; **Charles** et **Guy**, 1997).

1.2. Les enzymes de la paroi

La destruction de la paroi cellulaire et la dissolution de la lamelle moyenne, accompagnant la maturation des fruits, sont causées par de nombreuses enzymes. Celles dont les rôles sont les plus reconnus sont, outre les cellulases, les enzymes pectolytiques (**Fisher** et **Bennett**, 1991 ; **Cleemput** *et al.*, 1997).

L'action des cellulases sur de tels substrats dépend de l'origine du substrat, de sa composition, du prétraitement physique ou chimique et de l'action synergique avec les autres classes d'enzymes (ex : xylanases, pectinases, peroxydases, phénoloxydases, etc..).

Les cellulases sont considérées comme étant un complexe enzymatique susceptible d'hydrolyser les macromolécules de cellulose en petites particules de sucre aptes à être assimilées. **Erikson** et **Wood** (1985) ont montré qu'en plus de ces hydrolases, des oxydases (glucose-oxydase, cellobiose-oxydase) et des oxydo-réductases sont impliquées dans la dégradation de la cellulose.

D'une manière générale, la classification des cellulases est basée essentiellement sur leur activité vis à vis des divers substrats. Ce groupe d'enzymes peut être divisé en trois catégories : les endoglucanases (β-D-glucane 4-glucanohydrolase, E.C.3.2.1.4), les exoglucanases (1,4-β-D glucane glucobiohydrolase, E.C. 3.2.1.74 et cellobiohydrolases, C_1) et les β- glucosidases (β-D-glucosidase glucohydrolase, E.C .3.2.1.21).

Toutefois, la solubilisation des pectines est, de loin, la plus corrélée avec le ramollissement des fruits durant la maturation, impliquant, probablement, l'action des enzymes pectolytiques par un accroissement de l'activité des pectineméthylestérases (E.C.3.1.1.11), enzymes indispensables à l'activité des polygalacturonases (E.C.3.2.1.15 ; E.C. 3.2.1.67 et E.C. 3.2.1.82) (**Knee** *et al.*, 1991 ; **Diane** et **Carlos**, 1994 ; **Brownleader** *et al.*, 1999).

Les pectineméthylestérases (PME) hydrolysent les liaisons esters méthyliques en s'attaquant au C_6 de l'acide galacturonique, cette hydrolyse a pour effet la libération du méthanol et la formation de pectates. Ces enzymes se trouvent dans tous les tissus végétaux des plantes, en particulier dans le fruit ; elles sont localisées au niveau de la paroi cellulaire, à laquelle, elles sont fortement liées (**Rexova-Benkova** et **Marcovic**, 1976).

Le mécanisme par lequel les PME se trouvent dans la paroi cellulaire est compliqué et leur activité peut être contrôlée par des ions métalliques et par le pH du milieu (**Moustacas** *et al.*, 1991). L'activation des PME par les ions métalliques est apparemment due à l'interaction des ions avec le substrat puis avec l'enzyme (**Nari** *et al.*, 1991) ; les ions peuvent relier les

enzymes libres aux groupement carboxyliques.

Les PME des végétaux supérieurs sont les plus étudiées. Ainsi, les études structurales ont montré que l'enzyme est une glycoprotéine formée par un seul polypeptide (**Marcovic** *et al.*, 1975), composée de carbohydrates et de résidus d'acides aminés hydrophobes (**Seymour** *et al.*, 1991, a). Le choix des conditions d'extraction permet éventuellement de séparer les différentes isoenzymes.

Pilnik et **Voragen** (1991) ont recensé 12 formes de PME dans les pulpes d'agrumes ; cependant, une seule forme présente une tolérance et une stabilité thermique dans les jus d'agrumes industriels. Selon la température d'inhibition de l'activité enzymatique, **Seymour** *et al.* (1991, b) ont distingué deux formes principales de PME : la forme thermostable (PME-TS) et la forme thermolabile (PME-TL).

Les polygalacturonases (PG), très répandues chez les micro-organismes et dans le règne végétal, hydrolysent la liaison α 1-4 entre deux résidus acide galacturonique (**Bonnin** *et al.*, 1997). Selon leur mode d'action, on distingue les endopolygalacturonases (poly (1,4-α-D-galacturonide) glycano-hydrolase, E.C.3.2.1.15) qui agissent au hasard et qui libèrent du monomère, dimère et trimère d'acide galacturonique comme produits finaux et les exopolygalacturonases qui agissent de manière récurrente à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne dont les acides carboxyliques sont non estérifiés et dont l'action le long de la chaîne peut être bloquée par la présence d'un ester méthylique, d'un résidu rhamnose ou d'une chaîne latérale. Elles sont de deux types selon le produit de la réaction : les poly (1,4-α-D-galacturonide) galacturonohydrolases (E.C.3.2.1.67) libèrent de l'acide galacturonique tandis que les poly (1,4-α-D-galacturonide) digalacturonohydrolases (E.C.3.2.1.82) libèrent de l'acide digalacturonique (**Bonnin** *et al.*, 1997 ; **Brummel** et **Harpster**, 2001).

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

La datte (*Phœnix dactylifera*, variété Deglet-nour), décrite précédemment, a été utilisée.

2.2. Teneur en matières sèche

Une prise d'essai est étuvée à 104 °C jusqu'à poids constant. La mesure de la différence de poids donne la teneur en eau de l'échantillon.

2.3. Teneur en protéines

La teneur en azote total, déterminée à partir de la pulpe fraîche (environ 1 g en matière sèche) selon la méthode de Kjeldahl, est affectée d'un coefficient égal à 6,25 afin d'estimer la teneur en protéines totales des échantillons.

La détermination des protéines solubles est effectuée, à partir de l'extrait enzymatique dialysé suivi d'une précipitation au TCA, selon la méthode de **Lowry** *et al.* (1951) modifiée par **Peterson** (1983) avec la sérum albumine bovine comme standard.

2.4. Fractionnement des composés de la paroi

Le fractionnement des constituants pariétaux de la datte a été réalisé selon la méthode de **Van Soest** (1963). Sur le même échantillon, elle permet de doser :

Le NDF : (Neutral Detergent Fiber) ou paroi végétale totale. C'est le résultat de l'hydrolyse de l'échantillon en milieu neutre avec une solution détergente. Ce résidu renferme encore, néanmoins, des matières azotées et des matières minérales emprisonnées dans les parois.

L'ADF : (Acid Detergent Fiber). C'est le résultat de l'hydrolyse de l'échantillon ou du résidu NDF, en milieu acide, en présence de cétyl-triméthyl-ammonium-bromide (CTAB). Ce détergent solubilise le contenu cytoplasmique du végétal et les hémicelluloses. En règle générale, ce résidu contient : la totalité de la cellulose vraie, de la lignine en majeure partie, une fraction variable des hémicelluloses, des substances pectiques et une fraction des matières minérales.

La lignine : estimée après destruction, par H_2SO_4 à 72 %, de la cellulose vraie. Le résidu appelé ADL (Acid Detergent Lignin) contient de la lignine et de la cutine.

L'ensemble de l'opération est représenté par la **figure 2.1** et la composition des solutions est donnée dans le **tableau 2.1**.

Tableau 2.1 : Composition des réactifs utilisés dans l'évaluation des constituants de la paroi végétale (**Van Soest**, 1963)

Solutions	**Réactifs**
NDF : Neutral Detergent Fiber	- 30 g de lauryl-sulfate, sel de sodium - 18,61 g d'éthylène diamine tétracétique dihydraté, disodique (E.D.T.A) - 6,81 g de tétraborate de sodium (borax) - 4,56 g de di-sodium hydrogénophosphate-2 hydraté - q.s.p. 1 l avec eau distillée (solution à pH 6,9-7,1)
ADF : Acid Detergent Fiber	- 20 g de cétyl-triméthyl-ammonium-bromide (CTAB) - 27,77 ml d' H_2SO_4 concentré - q.s.p. 1 l avec eau distillée
ADL : Acid Detergent Lignin	- H_2SO_4 à 72 %

P_0 | Creuset vide taré

E | Prise d'essai

Hydrolyse au détergent neutre : 1 h
Filtration
Etuvage à 103° C pendant 24 h

P_1 | Résidu + creuset
- Cellulose
- Hémicelluloses
- Lignine
- Cendres

Hydrolyse au détergent acide : 1 h
Filtration
Etuvage à 103° C pendant 24 h

P_2 | Résidu + creuset
- Cellulose
- Lignine
- Cendres

Hydrolyse au H_2SO_4 72 % pendant 3 h
Filtration
Etuvage à 103° C pendant 24 h

P_3 | Résidu + creuset
- Lignine
- Cendres

Passage au four pendant 5 h à 550° C

P_4 | Résidu + creuset
- Cendres

Calculs (valeurs exprimées en % MS)

$$\textbf{\% NDF} = \frac{P_1 - P_0}{E \times MS} \times 100 \qquad \textbf{\% ADF} = \frac{P_2 - P_4}{E \times MS} \times 100 \qquad \textbf{\% Hémicelluloses} = \text{\% NDF} - \text{\% ADF}$$

$$\textbf{\% Cellulose} = \frac{P_3 - P_4}{E \times MS} \times 100 \qquad \textbf{\% Lignine} = \frac{P_2 - P_3}{E \times MS} \times 100$$

Figure 2.1 : Evaluation des constituants de la paroi végétale **(Van Soest**, 1963)

2.5. Extraction et dosage des substances pectiques

Les substances pectiques sont extraites de manière séquentielle à partir d'un matériel insoluble dans l'alcool (MIA).

2.5.1. Obtention du MIA

Les dattes décongelées et dénoyautées sont broyées pendant 2 à 3 min en présence de cinq fois leur volume d'éthanol neutre à 96 % bouillant. Le broyat est ensuite filtré sur verre fritté (n° 2) sous vide et rincé par l'éthanol à 80 % jusqu'à décoloration complète du résidu. Le MIA est alors séché à une température inférieure à 40 °C puis broyé finement.

2.5.2. Extractions fractionnées

2.5.2.1. Pectines solubles dans l'eau (PSE)

100 mg de MIA sont agités pendant 30 min avec 50 ml d'eau distillée à la température du laboratoire, le surnageant est recueilli par centrifugation (5000 g) et filtration sur toile Nylon très fine. L'opération est répétée trois autres fois dans les mêmes conditions.

2.5.2.2. Pectines solubles dans l'oxalate (PSO)

Le culot de l'extraction des PSE est traité à son tour par 50 ml d'une solution d'oxalate d'ammonium à 1p.100 (m / v) dans des conditions similaires.

2.5.2.3. Pectines solubles dans l'acide (PSH)

Le culot de l'extraction des PSO est repris par HCl M/20 et traité trois fois durant 30 min au bain-marie bouillant sous reflux.

2.6. Dosage de l'acide galacturonique

Les acides uroniques sont mesurés par la méthode au métahydroxydiphényl (MHDP) de **Blumenkrantz** et **Asboe-Hansen** (1973) avec l'acide galacturonique comme standard.

2.7. Dosage du méthanol et détermination du degré de méthylation

Le degré de méthylation (DM) des pectines en solution est déterminé après dosage titrimétrique du méthanol libéré par saponification et détermination de la teneur en acide galacturonique de l'échantillon.

2.8. Dosage des oses neutres

Les oses neutres sont mesurés par la méthode à l'orcinol sulfurique de **Tollier** et **Robin** (1979) avec l'arabinose comme standard.

2.9. Extraction et caractérisation des enzymes

2.9.1. Les polygalacturonases

2.9.1.1. Extraction

L'extrait enzymatique brut est obtenu à partir de 6 dattes (environ 50 g de pulpe fraîche selon les stades de maturation) décongelées et dénoyautées à une température de 4° C.

La pulpe est coupée en fragments puis broyée manuellement au mortier-pilon en présence de 150 ml de NaCl à 4 %, contenant de la polyvinylpyrrolidone (PVP) à raison de 0,5 % en masse relativement à celle du matériel végétal.

Le mélange est centrifugé à 12100 g pendant 20 min et le surnageant est conservé. Le culot est traité à son tour avec 100 ml de NaCl à 4 %, contenant de la PVP à raison de 0,5 % puis centrifugé. Les surnageants combinés constituent l'extrait enzymatique brut qui est dialysé à 0° C contre l'eau distillée pendant 18 h puis filtré sur papier Whatman n° 4.

La PVP est ajoutée pour prévenir la formation du complexe protéines- tannins ou autres composés phénoliques (**Hasegawa** *et al.*, 1969, **Mustafa** *et al.*, 1986).

L'optimisation de l'extraction des PG n'a pas été suivie. Néanmoins, il est probable que la technique d'extraction ne prenne pas en compte les variations de l'extractibilité des enzymes avec le développement du fruit (**Rhodes**, 1980).

2.9.1.2. Mesure des activités

Le mélange réactionnel, constitué de 5 ml d'extrait enzymatique dialysé, 2 ml de tampon acétate 0,1 M, pH 5 contenant 1 % de pectine commerciale faiblement méthylée (DM 34 %) (Degussa) et 3 ml d'eau distillée est incubé à 30° C. Des prélèvements de 1 ml toutes les 10 min pendant 1 h sont effectués.

Pour l'essai à blanc, l'extrait enzymatique a été préalablement bouilli pendant 3 min.

Les groupes réducteurs sont dosés par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNS) (**Highly**, 1997) en utilisant l'acide galacturonique comme standard.

Une unité (UI) PG est la quantité d'enzyme qui catalyse la libération d'une µmole de groupes réducteurs par min, dans la phase linéaire de la réaction, à une température de 30 °C, un pH égal à 5 et à une force ionique de 0,02 M.

2.9.1.3. Détermination de la nature des polygalacturonases

La méthode de **Chan** et **Tam** (1982) a été utilisée pour différencier l'endo-PG de l'exo-PG. La vitesse de la diminution de la viscosité a été comparée à celle de l'apparition des groupes réducteurs, dans les mêmes conditions opératoires.

Ce ratio de comparaison est donné par la formule suivante :

$$R = \frac{1 / \eta_{sp}.\ min}{UI}$$

avec :

$$\eta_{sp} = \frac{\text{Temps d'écoulement de l'échantillon}}{\text{Temps d'écoulement de l'eau distillée}} - 1$$

où : η_{sp} est la viscosité spécifique.

L'essai viscosimétrique est réalisé selon la méthode préconisée par **Owens** *et al.* (1946) en présence de NaCl (0,155 M) et de l'EDTA (0,005 M).

Les mesures de la viscosité sont réalisées à l'aide d'un viscosimètre capillaire de type Ostwald, dans un bain thermostaté à 30° C. A partir d'un volume total de 100 ml (50 ml d'extrait enzymatique et 50 ml de solution à 0,5 % de pectine faiblement méthylée, DM 34 %), un prélèvement de 10 ml est réalisé toutes les 10 min pendant 100 min, soit 9 ml pour l'essai viscosimétrique et 1 ml pour l'essai des groupes réducteurs.

L'échantillon est constitué de l'extrait enzymatique, de la solution à 0,5 % de pectine faiblement méthylée (DM 34 %) (9 ml) et du solvant (NaCl 0,155 M-EDTA 0,005 M) (1 ml).

Les temps d'écoulement de l'eau distillée (57,00 secondes), du substrat initial (88,65 secondes) et celui de chaque échantillon sont mesurés manuellement.

2.9.1.4. Conditions et effecteurs

L'effet de la température sur l'activité enzymatique est déterminé à partir de milieux réactionnels incubés à des températures variant de 0 à 60 °C. Les solutions enzymatiques sont, préalablement, préchauffées à la température considérée.

L'effet du pH est mis en évidence, à 30 °C, dans l'intervalle de pH 3 - 7, dans des milieux réactionnels préparés selon la méthode préconisée par **Benhura** et **Mavhudzi** (1996).

L'effet du chlorure de calcium sur l'activité enzymatique est apprécié avec des solutions aqueuses de concentrations croissantes de $CaCl_2$ (0 à 400 mM) à la place de l'eau distillée.

2.9.2. Les pectineméthylestérases

2.9.2.1. Extraction

L'extrait enzymatique brut est obtenu à partir de 6 dattes (environ 50 g de pulpe fraîche selon les stades de maturation) décongelées et dénoyautées. La pulpe est coupée en fragments puis broyée manuellement au mortier-pilon en présence de 100 ml de NaCl 1,5 M, contenant de la polyvinylpyrrolidone (PVP) à raison de 0,5 % en masse relativement à celle du matériel végétal.

Le mélange est homogénéisé dans un mixer pendant 5 min puis le pH est ajusté 7,5 avec NaOH 0 ,1 M. La suspension est mise à une température de 2° C pendant 1 h puis centrifugée à 14000 g pendant 30 min et le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut. Ce dernier est filtré sur papier Whatman n° 2 et constitue l'extrait pour la détermination de l'activité enzymatique (**Al-Jasim** et **Al-Delaimy**, 1972).

La PVP est ajoutée pour prévenir la formation du complexe protéines- tannins ou autres composés phénoliques (**Hasegawa** *et al.*, 1969, **Mustafa** *et al.*, 1986)

2.9.2.2. Mesure des activités

Le mélange réactionnel, constitué de 20 ml de solution à 1 % de pectine commerciale hautement méthylée (DM 65 %) (Degussa) est incubé à 30° C. Après l'ajout de 20 ml d'extrait enzymatique, le pH est ajusté à 7,5 ; et dès qu'il décroît, un volume de NaOH 0,1 M, déterminé toutes les 2 min pendant 20 min, est ajouté pour le ramener à sa valeur initiale. La diminution du pH du milieu est due à l'apparition des groupements carboxyliques libérés sous l'action de la PME, celle-ci est alors compensée par un apport de soude (**Polacsek-Racz** et **Pozsar-Hajnar**, 1976).

Une unité (UI) PME est la quantité d'enzyme qui libère un µéquivalent de groupements carboxyliques par min, à une température de 30 °C et à un pH égal à 7,5.

2.9.2.3. Conditions et effecteurs

La température optimale d'activité enzymatique est déterminée sur des milieux réactionnels, incubés à des températures variant de 5 à 95 °C. Les solutions enzymatiques sont, préalablement, préchauffées à la température considérée.

L'effet du pH est mis en évidence, à 30 °C, dans l'intervalle de pH 3-9, dans des milieux réactionnels préparés selon la méthode préconisée par **Fayyaz** *et al.*, (1995).

L'effet des sels sur l'activité enzymatique est apprécié avec des solutions aqueuses de concentrations croissantes de $CaCl_2$ (0 à 500 mM) et de NaCl (0 à 600 mM) par l'ajout dans la solution de pectine d'une des concentrations de la gamme considérée.

2.9.3. Les cellulases

2.9.3.1. Extraction

L'extrait enzymatique brut est obtenu à partir de 6 dattes (environ 50 g de pulpe fraîche selon les stades de maturation) décongelées et dénoyautées. La pulpe est coupée en fragments puis broyée manuellement au mortier-pilon en présence de 100 ml de NaCl 4%, contenant de la polyvinylpyrrolidone (PVP) à raison de 1 % en masse relativement à celle du matériel végétal.

Le mélange est homogénéisé dans un mixer pendant 2 min puis le pH est ajusté 7 avec NaOH 0 ,1 M. La suspension est mise dans un bain de glace pendant 10 min puis centrifugée à 20 000 g pendant 15 min. Le résidu est repris pour une deuxième extraction dans les mêmes conditions et les surnageants constituent l'extrait enzymatique brut. Ce dernier est dialysé contre de l'eau distillée pendant 6 h. Cependant, sachant l'action jumelée de la cellulase et des pectines, une précipitation de ces dernières est préférable afin d'obtenir et d'extraire le maximum de cellulases. Cette précipitation consiste à ajouter à la solution obtenue après la première dialyse, une solution de $CaCl_2$ qui a un rôle compétitif vis à vis des cellulases, les pectines étant attirées beaucoup plus par les ions Ca^{++} que par les cellulases.

Après addition de $CaCl_2$, le mélange est laissé au repos pendant 15 minutes; un dépôt de fibres forme au cours du temps un gel, ce sont les pectines. Néanmoins, ce temps n'est pas suffisant ou pas assez pour faire précipiter toutes les pectines d'où le recours à une centrifugation qui permettra d'éliminer le maximum de ces substances. Une deuxième dialyse pendant 6 h est effectuée afin que toutes ou le maximum de substances indésirables soient éliminées. L'extrait enzymatique dialysé est utilisé pour la détermination de l'activité enzymatique.

2.9.3.2. Mesure des activités

Le mélange réactionnel, constitué de 2 ml d'extrait enzymatique, de 7 ml de carboxyméthylcellulose (Sigma) à 0,25 % et de 1 ml de tampon acétate pH 5, est incubé à 30° C pendant 18 heures. L'activité des cellulases durant l'hydrolyse enzymatique de la carboxyméthylcellulose est mesurée par viscosimétrie.

Une unité (UI) cellulase est la quantité d'enzyme qui entraîne la variation de la viscosité d'une centpoise par heure, à une température de 30 °C et à un pH égal à 5.

2.9.3.3. Conditions et effecteurs

La température optimale d'activité enzymatique est déterminée sur des milieux réactionnels, incubés à des températures variant de 30 à 60 °C. Les solutions enzymatiques

sont, préalablement, préchauffées à la température considérée. L'effet du pH est mis en évidence, à 30 °C, dans l'intervalle de pH 2-7.

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Teneur en composés pariétaux totaux

La teneur en composés pariétaux totaux ou fibres totales de la datte Deglet-nour au stade vert est répartie entre les hémicelluloses (55 %), la cellulose (22,5 %), les pectines (11,7 %) et la lignine (10,8 %) (**tableau 2.2**).

La teneur en hémicelluloses, au même titre que la lignine, diminue au cours de la maturation. La chute des hémicelluloses et de la lignine du stade I au stade II est, respectivement, de 26 % et 37 %, elle l'est davantage du stade II au stade III, soit 52 % pour les hémicelluloses et 50 % pour la lignine puis elle se stabilise autour de 30 % pour ces deux fractions au stade IV.

Par contre, la teneur en cellulose diminue progressivement, soit de 13 % du stade I au stade II et 15 % du stade II au stade III, mais avec une chute remarquable du stade III au stade IV, soit 51 %.

La teneur en cellulose, soit 2,9 % au stade mûr, se situe dans l'intervalle rapporté par **Sawaya** *et al.* (1983, a) et **Othman** (1995) (entre 2 et 4 %) mais demeure faible par rapport aux teneurs mentionnées par **Munier** (1973) (7,22 %) pour la datte Deglet-nour.

L'évolution des pectines totales, exprimées en % MS, montre une diminution régulière (15 à 20 %) au cours des différents stades de développement, plus marquée du stade III au stade IV, soit 32 % (**cf.paragraphe 3.2**).

En somme, les fibres totales de la datte diminuent de 78 % du stade vert au stade mûr.

Dans ce sens, **El-Zoghbi** (1994) rapporte une chute de 74 % pour une variété molle égyptienne alors que **Mustafa** *et al.*(1986) situent cette diminution entre 53 et 73 % pour 3 variétés demi-molles soudanaises; la teneur en fibres totales de ces dernières variétés se situe entre 8,3 et 12,5 % MS.

A ce propos, **Al-Shahib** et **Marshall** (2002) ont déterminé la teneur en fibres totales, par voie enzymatique, de 12 variétés de datte d'Arabie Saoudite, d'Egypte et d'Irak dont les teneurs en eau fluctuent entre 10,6 et 17,5 %, donc des dattes sèches. La teneur en fibres totales varie entre 8,1 et 12,7 % MS.

Avec une teneur de 10,6 %, la datte Deglet-nour est riche en fibres totales comparée aux dattes sèches considérées comme une source de fibres. En effet, plus la teneur en fibres est élevée et plus la datte est sèche.

Tableau 2.2 : Evolution de la teneur en composés de la paroi (%MS) de la datte au cours de la maturation

Stades de maturation	Hémicelluloses	Cellulose	Lignine	Pectines	Fibres totales
I	19,3 ± 0,09	7,9 ± 0,23	3,8 ± 0,11	4,1 ± 0,15	35,1 ± 0,15
II	14,3 ± 0,00	6,9 ± 0,33	2,4 ± 0,60	3,3 ± 0,09	26,9 ± 0,25
III	6,9 ± 0,33	5,9 ± 0,33	1,6 ± 0,33	2,8 ± 0,21	17,2 ± 0,30
IV	4,7 ± 0,15	2,9 ± 0,33	1,1 ± 0,33	1,9 ± 0,07	10,6 ± 0,22

3.2. Détermination des substances pectiques

3.2.1. MIA

Le ramollissement des dattes est accompagné par une diminution rapide et importante de la teneur en MIA puisqu'elle passe de 39,7 % en matières sèches au stade I à 13,1 % au stade II (soit une chute de 67 %) (**tableau 2.3**) ; pour les stades suivants, la teneur tend à être constante.

El-Zoghbi (1994) attribue cette décroissance à la transformation de l'amidon en sucres solubles et à la conversion des composés pariétaux de la datte (cellulose-lignine-pectines) en composés solubles dans l'alcool.

Ces résultats confirment ceux rapportés par **Mustapha** *et al.* (1986) et **El-Zoghbi** (1994) pour la datte, **Roe** et **Bruemmer** (1981) et **El-Zoghbi** (1989) pour la mangue, **El-Zoghbi** (1989) pour la goyave et **Huber** (1983) pour la fraise.

3.2.2. Fractions pectiques

Les teneurs en pectines sont inférieures à 2,3 % du MIA ; ces teneurs sont faibles comparées à celles de l'ananas (16,3 %), de la framboise (16,8 %), de la pomme (27,2 %), de la poire (28,1 %), de la cerise (39,6 %) et de la fraise (41,1 %) (**Voragen** *et al.*, 1983). Les pectines totales (somme des pectines extraites à l'eau, à l'oxalate et à l'acide) augmentent de façon remarquable (soit plus de 75 % par rapport à la MS), du stade I au stade II de la maturation, puis continuent à s'accroître graduellement au cours des autres stades de développement pour atteindre, au dernier stade de maturation, une teneur de 2,26 % du MIA, soit une valeur 2,6 fois supérieure à la teneur relevée au stade I (**tableau 2.4**).

La répartition des PSE, PSO et PSH change remarquablement en fonction du stade de maturation. Les PSH sont très majoritaires puisqu'elles représentent 93,1 % des pectines totales. Au fur et à mesure de la maturation, la teneur en PSH diminue fortement puisqu'elles ne représentent plus que 39,7 % des pectines totales au stade IV. En corollaire, les PSE et PSO augmentent considérablement, les PSE représentent au stade IV 24,8 % des pectines totales et les PSO 38,5 %. Il faut noter que cette évolution est surtout marquée entre les stades II et III pour les PSE. Les teneurs en pectines solubles (PSE + PSO) représentent environ le double des pectines extraites à l'acide au stade mûr (63,3 % contre 36,7 % des pectines totales).

Il est connu que les fruits verts sont riches en pectines insolubles (protopectines) alors que les fruits mûrs contiennent majoritairement des pectines solubles et que la transformation des protopectines en pectines solubles est l'une des caractéristiques les plus frappantes de la

Tableau 2.3 : Evolution du matériel insoluble à l'alcool (MIA) de la datte au cours de la maturation

Stades de maturation	I	II	III	IV
Teneur en MS	18,4	56,6	71,3	75,6
MIA (% MF)	7,3	7,4	8,5	9,6
MIA (% MS)	39,7	13,1	11,9	12,7

Tableau 2.4 : Fractions pectiques (% MIA et % pectines totales) et pectines totales (% MIA et % MS) de la datte au cours de la maturation et teneurs en Gal A, en oses neutres, en méthanol (% MS de la fraction) et degré de méthylation (%)

Stades de maturation		I	II	III	IV
PSE	(% MIA)	0,01	0,08	0,36	0,56
	(% pectines totales)	1,1	5,2	21,3	24,8
	Gal A	50,1	48,9	46,7	44,6
	Oses neutres	18,4	20,5	21,4	24,1
	Méthanol	5,4	5	4,5	4,4
	Degré de méthylation (%)	63	66	64	62
PSO	(% MIA)	0,05	0,28	0,37	0,87
	(% pectines totales)	5,8	18,3	21,9	38,5
	Gal A	45,5	48,5	49,0	47,9
	Oses neutres	18,6	19	19,6	19,6
	Méthanol	5	5,2	5,1	5,2
	Degré de méthylation (%)	55	54	54	55
PSH	(% MIA)	0,81	1,17	0,96	0,83
	(% pectines totales)	93,1	76,5	56,8	36,7
	Gal A	46,7	40,7	47,8	48,4
	Oses neutres	20,7	23,5	20	19,1
	Méthanol	5,1	5,3	5,3	5,1
	Degré de méthylation (%)	56	60	60	58
Pectines totales	(% MIA)	0,87	1,53	1,69	2,26
	(% MS)	4,1	3,3	2,8	1,9

maturation (**Ulrich,** 1952 ; **Al-Jasim** et **Al-Delaimy** ,1972 ; **Mustapha** *et al.*, 1986 ; **Bonnin** et *al.*, 1997).

Les acides galacturoniques représentent 40 à 50% de tous les extraits pectiques ; on ne note pas d'appauvrissement ou d'enrichissement en acide galacturonique en fonction de la maturation. Cette teneur est inférieure à celle du raisin, de la betterave, de la carotte, des pommes et des agrumes (de 53,3 à 79,2 %); comparable à celle du pois (46,9 %) mais se retrouve supérieure à celle des poires (38 %) et la pomme de terre (35 %) (**Ralet** *et al.*, 2003).

Les teneurs en oses neutres des PSE augmentent au cours de la maturation alors qu'elles sont stables pour les PSO et variables pour les PSH (**cf.tableau 2.4**).

Pour les trois fractions pectiques, les valeurs moyennes se situent autour de 20 % ; elles sont supérieures à celles de la cerise (**Barbier**, 1980), de la carotte (**Massiot**, 1988) et de la pomme (**Renard**, 1989).

A priori, les pectines de la datte présentent une teneur élevée en oses neutres qui peut s'expliquer par la faible teneur en Gal A. Par ailleurs, une dépolymérisation des pectines par hydrolyse libère non seulement des maillons monomères d'acide galacturonique mais aussi, dans la plupart des cas, des sucres neutres tels que les pentoses et les hexoses en quantités signifiantes (jusqu'à 12 % de la pectine initiale) (**Barbier**, 1980).

L'évolution des DM des différentes fractions pectiques est variable, l'effet de la maturation n'est pas remarquable (**cf.tableau 2.4**).

Néanmoins, **Boyce** (1986) et **Mustafa** *et al.* (1986) affirment que les DE des pectines totales de la plupart des fruits diminue avec la maturation.

Le DM moyen des pectines au cours de la maturation de la datte se situe à 60 %, valeur nettement inférieure à celle de la pomme (81 %), de la fraise (80 %) et de l'oignon (78 %) (**Voragen** *et al.*, 1983); les pectines extraites sont hautement méthylées.

L'évolution de la teneur en méthanol des fractions pectiques de la datte au cours de la maturation montre, a priori, une diminution pour les PSE (soit 5,4 % au stade vert et 4,4 % au stade mûr) (**cf.tableau 2.4**). Cette teneur est relativement constante pour les autres fractions pectiques (environ 5 %).

Par ailleurs, il est à noter que le comportement des substances pectiques au cours de la maturation est, probablement, lié à une étape de la préparation des pectines. En effet, durant leur conservation (durée variable), les pectines subissent des dépolymérisations et des désesterifications (**Doesburg**, 1965 ; **Padival** *et al.*, 1981); ces dernières prédominent à pH acide (1 à 3) et à une température inférieure à 10 °C (**Thibault** et **Petit**, 1979).

3.3. Les polygalacturonases

3.3.1. Evaluation de l'activité des polygalacturonases en relation avec les teneurs en protéines totales et solubles

L'enrichissement de la pulpe en protéines totales est assez marqué durant les stades I et II, il est suivi d'une diminution à partir du stade III (**tableau 2.5**).

En effet, les protéines totales croissent remarquablement entre le stade I et II (soit plus de 100 %) puis décroissent au cours des derniers stades.

D'autre part, le **tableau 2.5** montre que l'activité PG croît continuellement avec la maturation.

De l'état de traces au stade vert, l'activité PG augmente considérablement pour atteindre un optimum de 3,85 UI /fruit au stade mûr ; cette augmentation correspond aussi à l'augmentation des protéines solubles.

L'activité spécifique PG est cependant constante, environ 320-350 UI /mg.

L'augmentation de l'activité PG peut être due soit à la synthèse de nouvelles protéines durant la maturation soit à l'activation de protéines préexistantes. Il faut aussi prendre en compte les variations de l'extractibilité des enzymes avec les changements structuraux du tissu du fruit. Cette hypothèse, émise par **Rhodes** (1980), est confortée par **Tijskens** *et al.* (1998), qui indiquent que l'activité PG des pêches, après récolte et stockage à des températures supérieures à 10 °C, augmente pendant une période donnée, selon un mécanisme de *turnover* à partir d'un précurseur inactif de cette enzyme.

L'hypothèse de la synthèse de nouvelles protéines spécifiques a été vérifiée par les tests sérologiques où l'immunodétection des protéines révèle l'augmentation des teneurs en protéines enzymatiques spécifiques, notamment les PG, à la période de maturation et entraîne l'expression de nouveaux gênes (**Rhodes**, 1980 ; **Lazan** et **Ali**, 1993, **Del Cura** *et al.*, 1996).

En effet, l'évaluation de la teneur en protéines totales et solubles durant les trois premiers stades (**cf. tableau 2.5**) montre une synthèse de nouvelles protéines spécifiques.

Il faut noter que l'activité des PG de la datte au stade mûr est faible comparée à celle d'autres fruits tels que la tomate avec 30 UI /g MF (**Pressey**, 1986), la mangue avec 20 UI /g MF (**Abu-Sarra** et **Abu-Goukh**, 1992), la pêche avec 4 à 6 UI /g MF (**Pressey** *et al.*, 1971) , la cerise avec 0,32 UI/ g MF (**Diane** et **Carlos**, 1994) et le kiwi avec 0,2 UI/ g MF (**Teresa** et **McRae**, 1992).

Tableau 2.5 : Evolution de l'activité PG et des protéines totales et solubles de la datte au cours de la maturation

Stades de maturation	**I**	**II**	**III**	**IV**
Protéines totales (mg / fruit)	180	390	340	280
Protéines totales (mg /g MF)	30	41	46	39
Protéines solubles (mg / fruit)	0,001	0,004	0,009	0,012
Protéines solubles (mg /g MF)	0,0001	0,0004	0,0012	0,0017
Activité PG (UI / fruit)	0,35	1,34	2,94	3,85
Activité PG (UI / g MF)	0,05	0,14	0,40	0,53

3.3.2. Caractérisation des polygalacturonases

3.3.2.1. Nature des PG

Le mécanisme d'action des PG est identifié par la comparaison de la vitesse de réduction de la viscosité avec la vitesse de libération des groupes réducteurs (**figure 2.2**).

Une baisse de viscosité spécifique du milieu réactionnel de 18 %, correspondant à un pourcentage d'hydrolyse des pectines de 7 %, est relevée. Si l'on se situe dans la phase linéaire de la réaction, on peut extrapoler que 50 % de chute de viscosité sera obtenue pour une rupture de 20 %.

Chan et **Tam** (1982) et **Baron** et **Thibault** (1985) signalent qu'une endo-PG abaisse plus rapidement la viscosité qu'une exo-PG pour le même nombre de liaisons rompues. Une endo-PG baisse de moitié la viscosité pour moins de 5% de liaisons rompues, alors qu'une exo-PG le fait pour un pourcentage de liaisons hydrolysées plus élevé (supérieur à 20%) (**Baron** et **Thibault**, 1985).Il semble donc que les activités PG de la datte soient plutôt de type exo.

De plus, le ratio R (**cf. matériels et méthodes**) ne dépasse pas la valeur de 0,1, ce qui indique la présence d'activités exo (**Chan** et **Tam**, 1982). L'ensemble de ces résultats indique que les PG de la datte seraient de type exo-PG, mais la présence d'endo-PG ne peut être formellement exclue.

3.3.2.2. Effet de la température

Les résultats (**figure 2.3**) indiquent que l'activité PG de la datte subsiste à une température de 0°C.

Tijskens *et al.* (1999) notent que l'activité PG persiste durant le stockage des pêches à 0°C alors que **Hasegawa** *et al.* (1969) préconisent une température inhibitrice de -20 °C.

L'activité PG croit progressivement pour atteindre un maximum de 0,124 UI /ml à la température optimale de 40 °C (à pH = 5). Au delà, l'activité diminue fortement jusqu'à l'inactivation à 60 °C. Ce résultat n'est pas en accord avec celui de **Hasegawa** *et al.* (1969) qui montrait une température optimum de 30 °C pour les PG de la datte de Californie.

3.3.2.3. Effet du pH

L'activité PG de la datte, nulle à pH 3, croit avec l'augmentation du pH (température =30 °C) pour atteindre son maximum au pH égal à 5 (**figure 2.4**).

Au delà de ce pH, une diminution remarquable de l'activité est enregistrée. **Hasegawa** *et al.* (1969), **Mustafa** *et al.* (1986) et **El-Zoghbi** (1994) ont rapporté la même valeur pour le pH optimal des PG de dattes. Cette valeur du pH est, selon **Knee** *et al.* (1991), le pH optimal

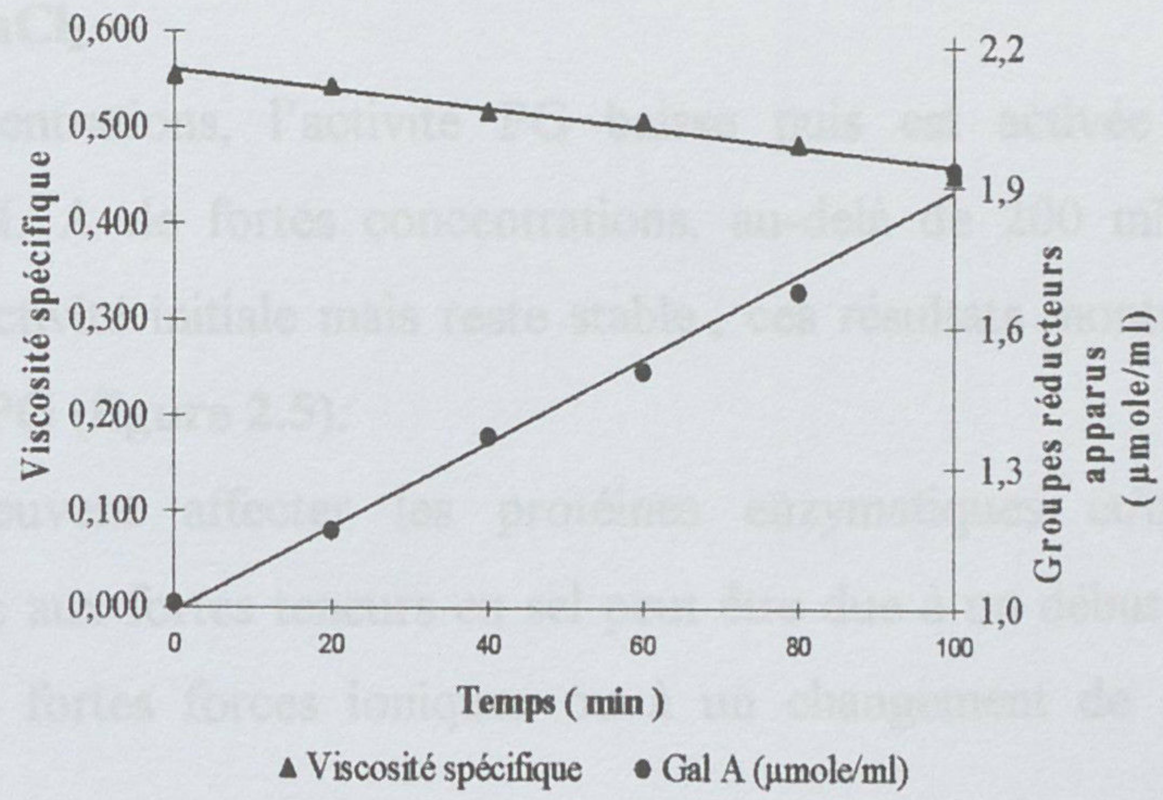


Figure 2.2 : Effet de l'activité PG sur la viscosité et la libération des groupes réducteurs.

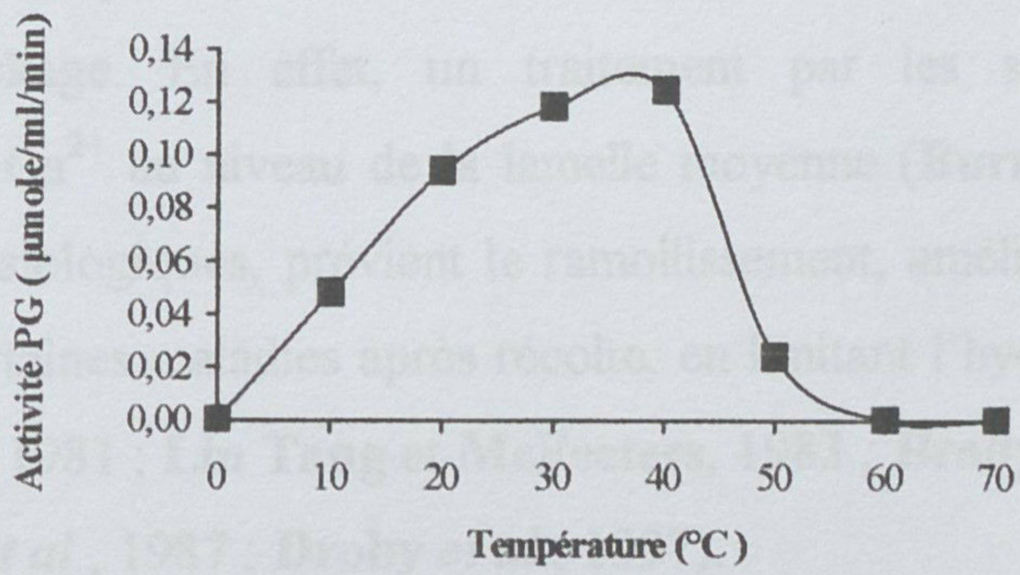


Figure 2.3 : Effet de la température sur l'activité PG

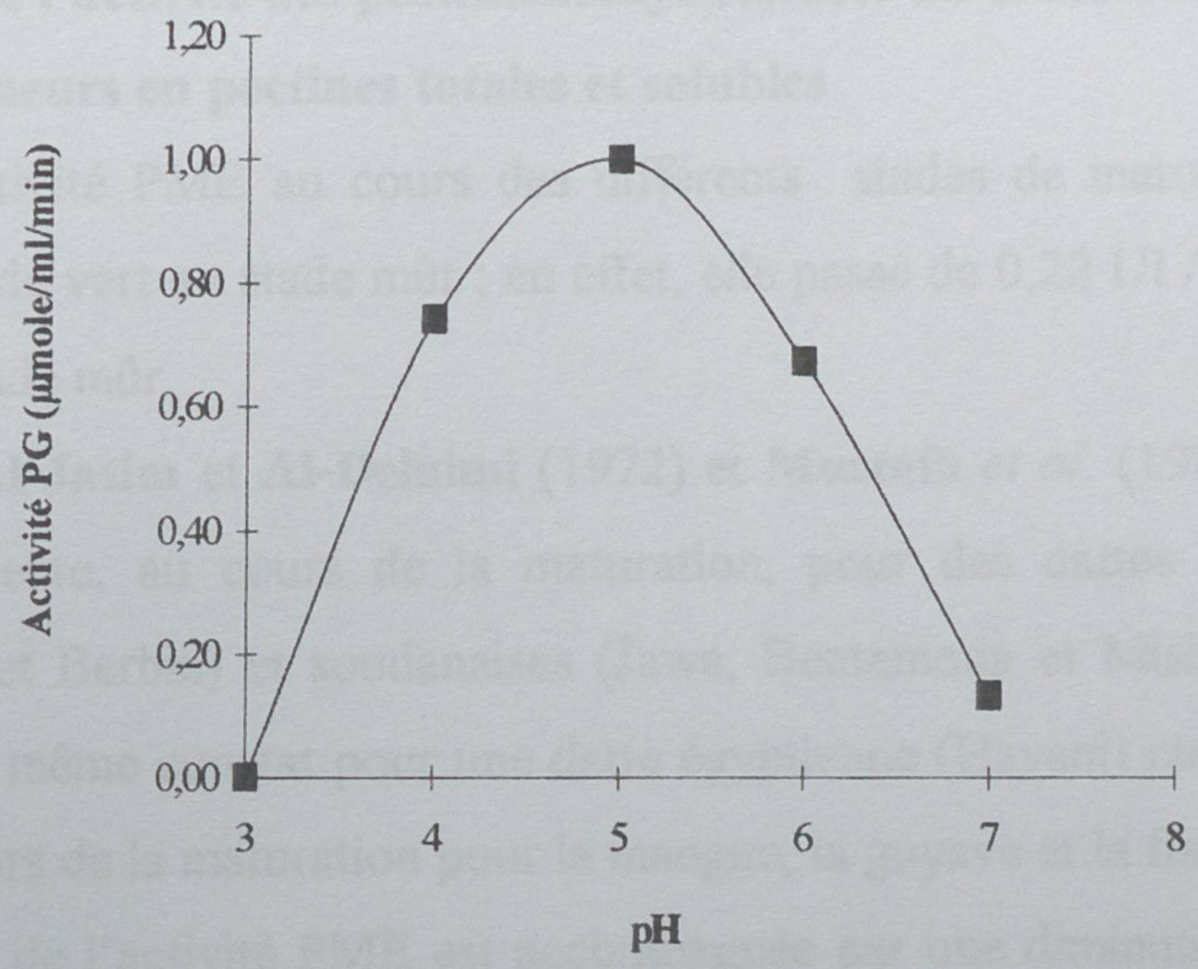


Figure 2.4: Effet du pH sur l'activté PG

de la majorité des PG des fruits.

3.3.2.4. Effet du $CaCl_2$

A de faibles concentrations, l'activité PG baisse puis est activée à partir d'une concentration de 50 mM. A de fortes concentrations, au-delà de 200 mM, l'activité est inférieure de moitié à l'activité initiale mais reste stable ; ces résultats montrent que le Ca^{2+} peut en partie inhiber les PG (**figure 2.5**).

Les ions Ca^{2+} peuvent affecter les protéines enzymatiques et/ou le substrat : l'inactivation de l'enzyme aux fortes teneurs en sel peut être due à un début de précipitation du substrat à cause des fortes forces ioniques ou à un changement de sa conformation (**Thibault**, 1980).

Il faut signaler que, quel que soit le mécanisme d'inactivation, cette propriété est exploitée dans le stockage. En effet, un traitement par les sels de calcium induit l'accumulation des ions Ca^{2+} au niveau de la lamelle moyenne (**Burns** et **Pressey**, 1987). Il réduit les désordres physiologiques, prévient le ramollissement, améliore la fermeté et réduit le développement de certaines maladies après récolte, en limitant l'hydrolyse des pectines par les PG (**Buescher** *et al.*, 1981 ; **Lin Tang** et **McFeeters**, 1983 ; **Brady** *et al.*, 1985 ; **Burns** et **Pressey**, 1987 ; **Miller** *et al.*, 1987 ; **Droby** *et al.*, 1997).

3.4. Les pectineméthylestérases

3.4.1. Evaluation de l'activité des pectineméthylestérases au cours de la maturation en relation avec les teneurs en pectines totales et solubles

L'étude de l'activité PME au cours des différents stades de maturation montre une nette évolution du stade vert au stade mûr ; en effet, elle passe de 0,22 UI /datte au stade vert à 4,22 UI /datte au stade mûr.

Dans ce sens, **Al-Jasim** et **Al-Delaimi** (1972) et **Mustafa** *et al.* (1986) rapportent que l'activité PME augmente, au cours de la maturation, pour des dattes irakiennes (Zahdi, Khadrawi, Khastawi et Berbin) et soudanaises (Jawa, Bentamoda et Mishrig) alors que **El-Zoghbi** (1994) fait le même constat pour une datte égyptienne (Hayani) mais relève que cette activité décroît au cours de la maturation pour la mangue, la goyave et la fraise.

L'augmentation de l'activité PME est accompagnée par une diminution de la teneur en pectines totales (exprimées en % MS) au cours de la maturation et par une augmentation de la teneur en PSE du stade I au stade IV (**figure 2.6**) tels que déjà indiqués pour l'activité PG (**cf.tableau 2.4**).

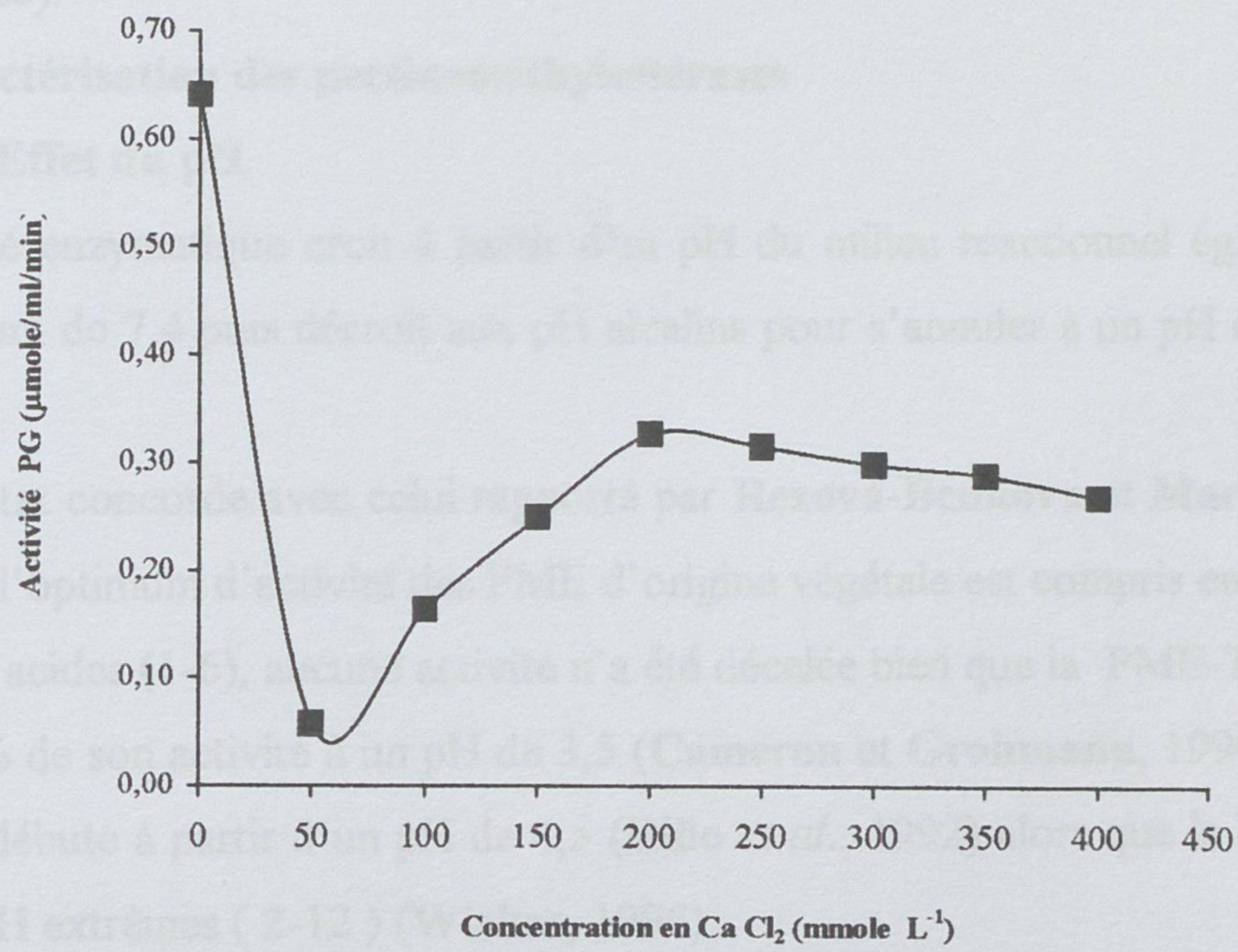


Figure 2.5 : Effet de la concentration en Ca Cl_2 sur l'activité PG

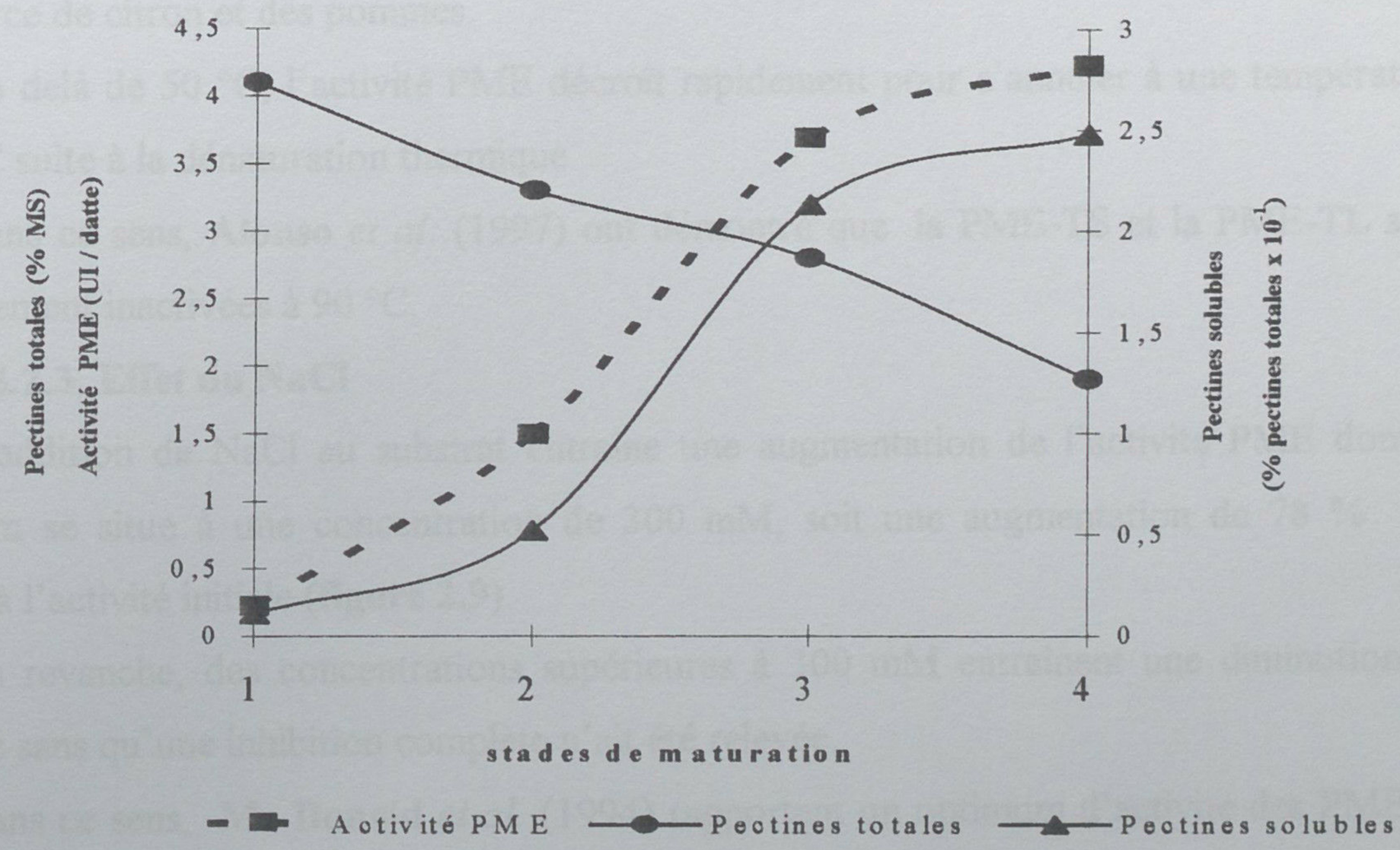


Figure 2.6: Evolution de l'activité PME en fonction des teneurs en pectines totales et solubles au cours de la maturation

Ces résultats confirment ceux rapportés par **Al-Jasim** et **Al-Delaimi** (1972), **Mustafa** *et al.* (1986) et **El-Zoghbi** (1994). Ce dernier auteur associe à cet accroissement de l'activité PME, une diminution du DE des pectines; ce qui n'a pas été relevé dans cette étude (**cf. paragraphe 3.2.2**) dont le résultat est conforté par ceux de **Mustafa** *et al.* (1986) (**cf. paragraphe 3.6**).

3.4.2. Caractérisation des pectineméthylestérases

3.4.2.1. Effet du pH

L'activité enzymatique croit à partir d'un pH du milieu réactionnel égal à 7, passe par un pH optimum de 7,4 puis décroît aux pH alcalins pour s'annuler à un pH égal à 10 (**figure 2.7**).

Ce résultat concorde avec celui rapporté par **Rexova-Benkova** et **Marcovic** (1976) qui indiquent que l'optimum d'activité des PME d'origine végétale est compris entre 7 et 9.

Aux pH acides (1-6), aucune activité n'a été décelée bien que la PME-TS de l'orange conserve 3,3% de son activité à un pH de 3,5 (**Cameron** et **Grohmann**, 1996) et que celle de la mandarine débute à partir d'un pH de 4,5 (**Rillo** *et al.*, 1992) alors que la PME-TL est très sensible aux pH extrêmes (2-12) (**Wicker**, 1996).

3.4.2.2. Effet de la température

L'activité enzymatique croit en fonction de la température pour atteindre une activité maximale se situant à 50 °C (**figure 2.8**).

Cette valeur se rapproche de celle trouvée par **Mc Donald** *et al.* (1993) pour les PME de l'écorce de citron et des pommes.

Au delà de 50 °C, l'activité PME décroît rapidement pour s'annuler à une température de 95 °C suite à la dénaturation thermique.

Dans ce sens, **Alonso** *et al.* (1997) ont démontré que la PME-TS et la PME-TL sont complètement inactivées à 90 °C.

3.4.2.3. Effet du NaCl

L'addition de NaCl au substrat entraîne une augmentation de l'activité PME dont le maximum se situe à une concentration de 300 mM, soit une augmentation de 78 % par rapport à l'activité initiale (**figure 2.9**).

En revanche, des concentrations supérieures à 300 mM entraînent une diminution de l'activité sans qu'une inhibition complète n'ait été relevée.

Dans ce sens, **Mc Donald** *et al.* (1994) rapportent un optimum d'activité des PME de l'écorce de citron à 300 mM pour un DE de 61 %.

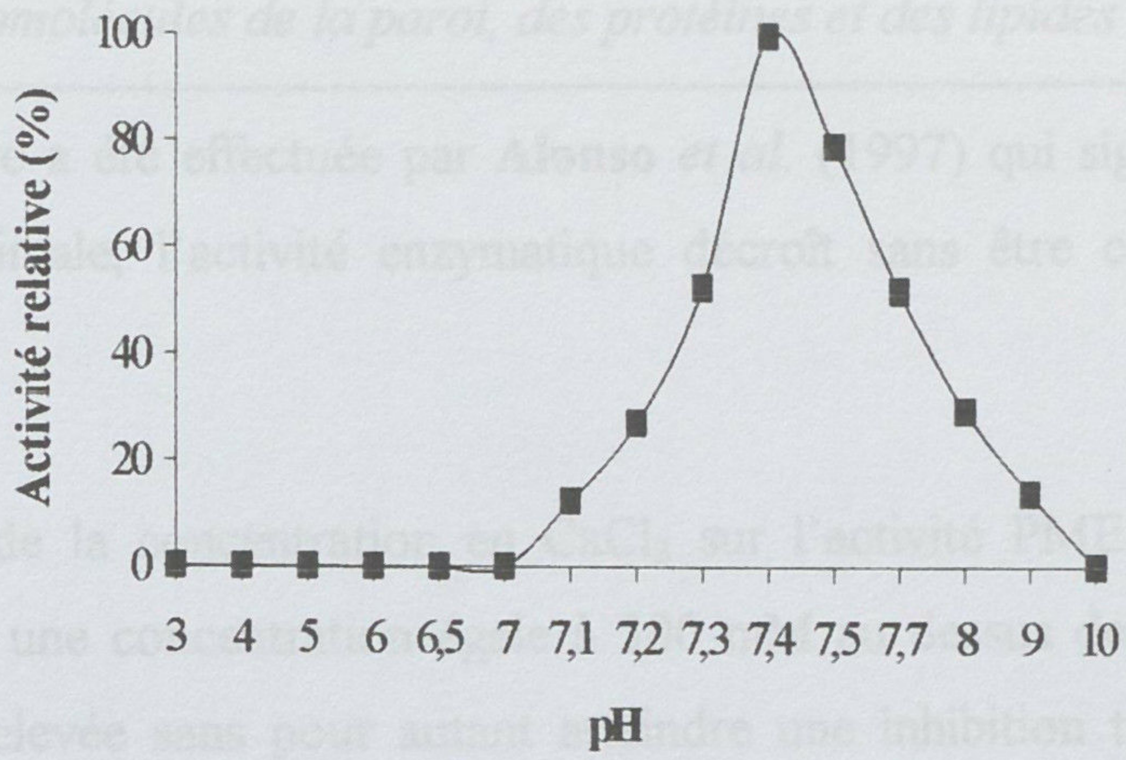


Figure 2.7: Effet du pH sur l'activité PME

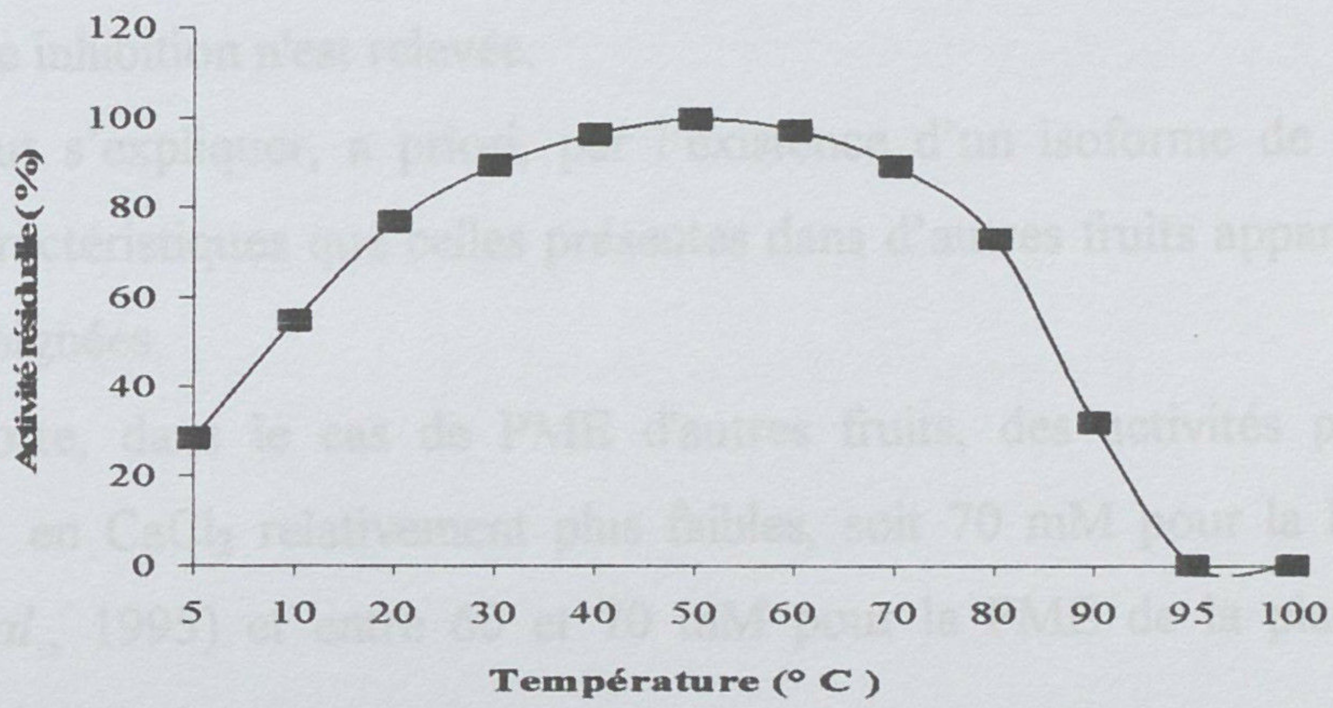


Figure 2.8: Effet de la température sur l'activité PME

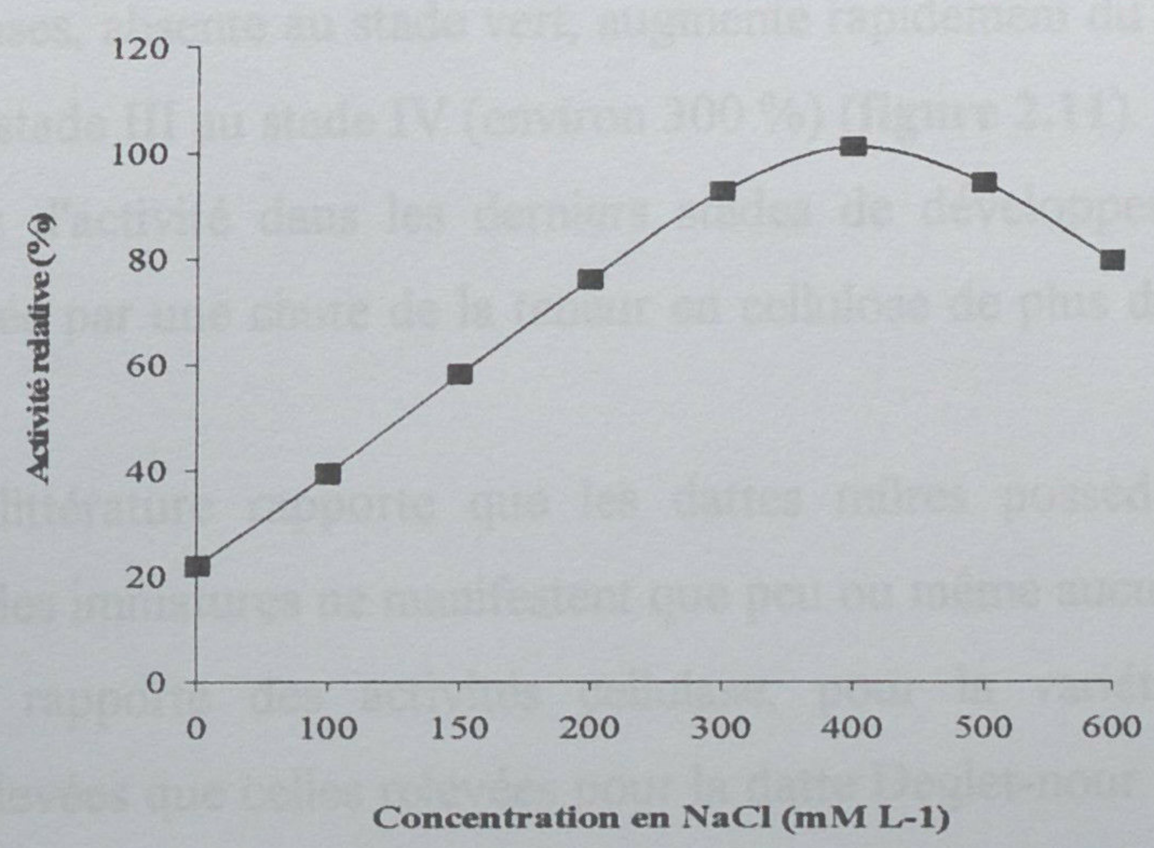


Figure 2.9 : Effet de la concentration en NaCl sur l'activité PME

Une observation similaire a été effectuée par **Alonso** *et al.* (1997) qui signalent qu'au delà de la concentration optimale, l'activité enzymatique décroît sans être complètement inhibée.

3.4.2.4. Effet du $CaCl_2$

L'étude de l'influence de la concentration en $CaCl_2$ sur l'activité PME montre que l'activité maximale se situe à une concentration égale à 300 mM au dessus de laquelle une diminution de l'activité est relevée sans pour autant atteindre une inhibition totale (**figure 2.10**).

Alonso *et al.* (1997) ont montré que la PME-TS et la PME-TL ont une activité optimale à une concentration donnée en $CaCl_2$ mais, au delà de celle-ci, elles sont complètement inhibées. Ce qui n'est pas le cas des PME des dattes étudiées où même à une concentration en $CaCl_2$ de 600 mM, aucune inhibition n'est relevée.

Cette différence peut s'expliquer, a priori, par l'existence d'un isoforme de la PME n'ayant pas les mêmes caractéristiques que celles présentes dans d'autres fruits appartenant à des familles botaniques éloignées.

La littérature rapporte, dans le cas de PME d'autres fruits, des activités pour des concentrations optimales en $CaCl_2$ relativement plus faibles, soit 70 mM pour la PME du pamplemousse (**Snir** *et al.*, 1995) et entre 60 et 70 mM pour la PME de la plaquemine (**Alonso** *et al.*, 1997).

3.5. Les cellulases

3.5.1. Evaluation de l'activité des cellulases au cours de la maturation

L'activité des cellulases, absente au stade vert, augmente rapidement du stade II au stade III (plus de 300 %) et du stade III au stade IV (environ 300 %) (**figure 2.11**).

Cette augmentation d'activité dans les derniers stades de développement, au niveau d'une datte, est matérialisée par une chute de la teneur en cellulose de plus de 50 % du stade III au stade IV.

Dans ce sens, la littérature rapporte que les dattes mûres possèdent une activité considérable alors que celles immatures ne manifestent que peu ou même aucune activité.

El-Zoghbi (1994) rapporte des activités cellulase, pour la variété molle Hayani (Egypte), cinq fois plus élevées que celles relevées pour la datte Deglet-nour étudiée pour une teneur en cellulose deux fois moindre. Ce qui n'est pas le cas pour la variété demi-molle Bentamoda (Soudan) (**Mustafa** *et al.*, 1986) dont les activités sont du même ordre de

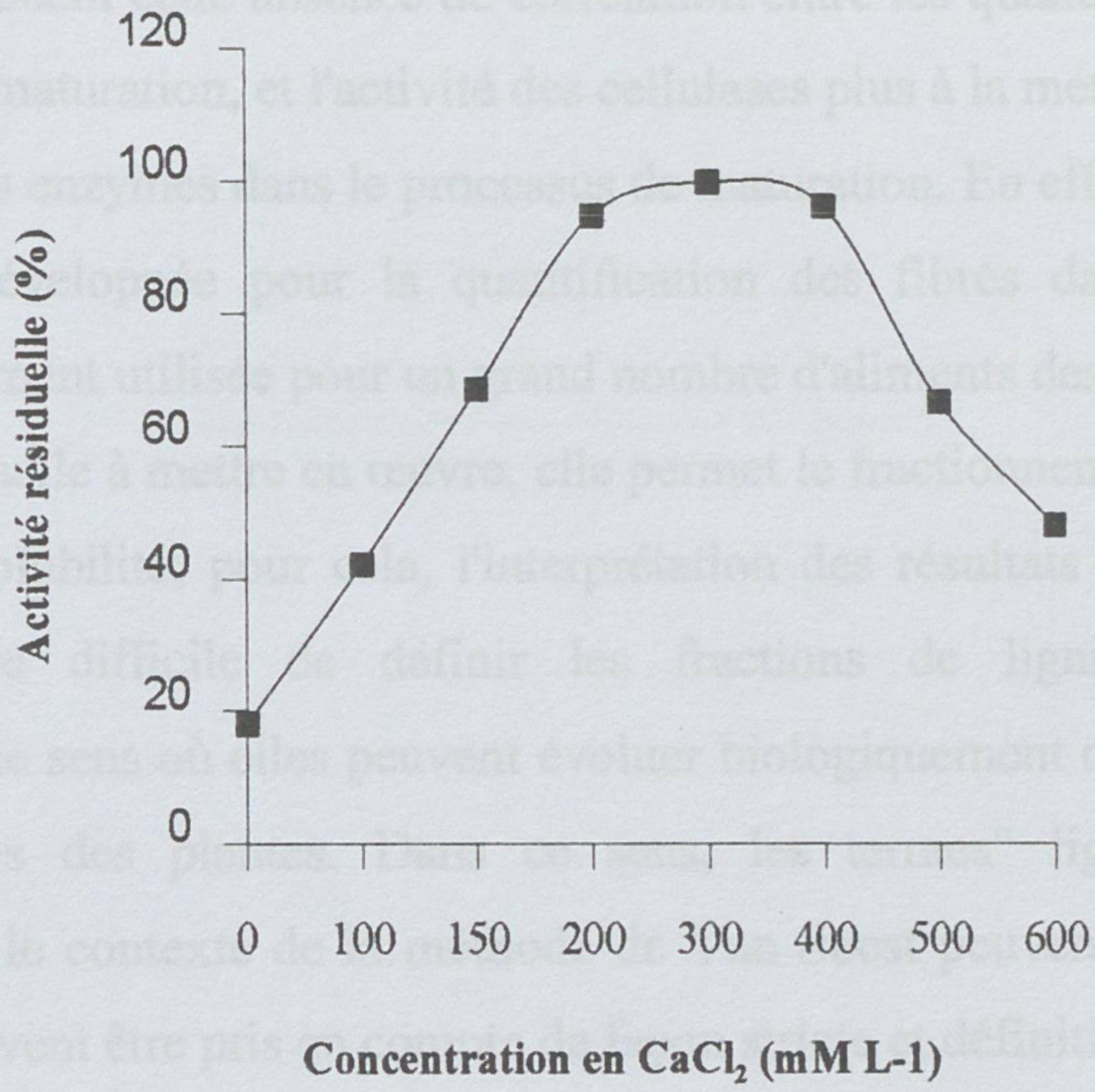


Figure 2.10: Effet de la concentration en CaCl2 sur l'activité PME

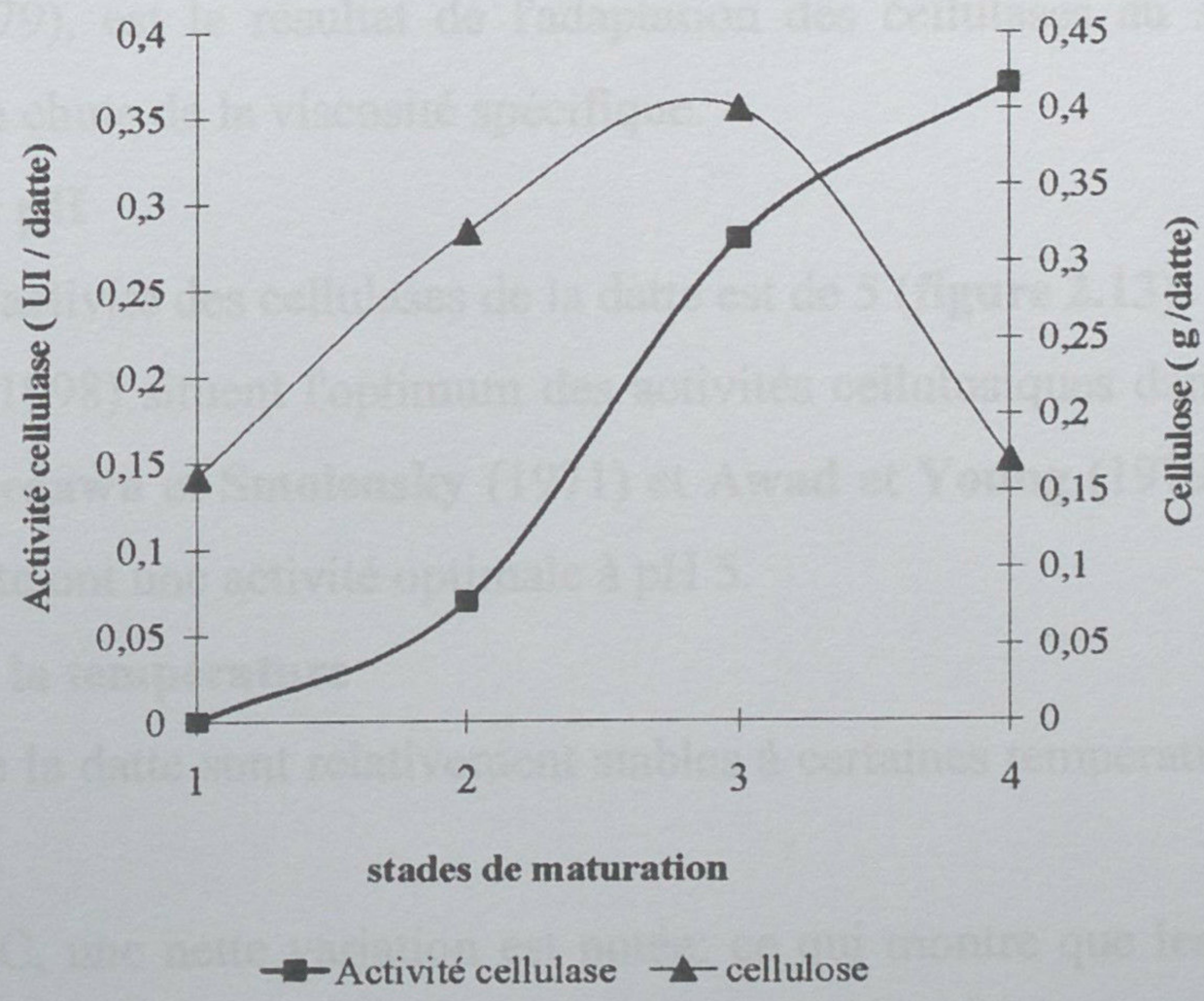


Figure 2.11: Evolution de l'activité cellulase en fonction de la teneur en cellulose de la datte au cours de la maturation

grandeur que celles de la datte Deglet-nour étudiée pour des teneurs en cellulose équivalentes.

Ces auteurs attribuent cette absence de corrélation entre les quantités de cellulose, dans le fruit au cours de la maturation, et l'activité des cellulases plus à la méthode d'évaluation des fibres qu'au rôle de ces enzymes dans le processus de maturation. En effet, la méthode de Van Soest, initialement développée pour la quantification des fibres dans les régimes pour ruminants est actuellement utilisée pour un grand nombre d'aliments destinés à l'homme. Bien qu'elle soit rapide et facile à mettre en œuvre, elle permet le fractionnement des biopolymères sur la base de leur solubilité; pour cela, l'interprétation des résultats est à considérer avec précaution. Il s'avère difficile de définir les fractions de lignine, de cellulose et d'hémicellulose dans le sens où elles peuvent évoluer biologiquement ou chimiquement dans les différentes parties des plantes. Dans ce sens, les termes" lignine", "cellulose" et "hémicellulose" dans le contexte de la méthode de Van Soest peuvent être utilisés dans un sens général et ne peuvent être pris en compte de façon stricte et définitive.

3.5.2. Caractérisation des cellulases

3.5.2.1. Effet du temps

La **figure 2.12** montre que la courbe de la variation de l'inverse de la viscosité spécifique ($1/\eta_{sp}$) en fonction du temps a une allure croissante.

Cette croissance, similaire à celles rapportées par **Hasegawa** et **Smolensky** (1971) et **Awad** et **Young** (1979), est le résultat de l'adaptation des cellulases au substrat dont la dégradation entraîne la chute de la viscosité spécifique.

3.5.2.2. Effet du pH

Le pH optimal d'activité des cellulases de la datte est de 5 (**figure 2.13**).

Sanchez *et al.* (1998) situent l'optimum des activités cellulosiques dans l'intervalle de pH 5-6 alors que **Hasegawa** et **Smolensky** (1971) et **Awad** et **Young** (1979) indiquent que les cellulases de la datte ont une activité optimale à pH 5.

3.5.2.3. Effet de la température

Les cellulases de la datte sont relativement stables à certaines températures (entre 30 et 50 ° C) (**figure 2.14**).

Au-delà de 50 °C, une nette variation est notée; ce qui montre que les cellulases sont inhibées par les traitements thermiques élevés. Dans ce sens, **Hasegawa** et **Smolensky** (1971), **Hinton** et **Pressey** (1974), **Pesis** *et al.* (1978) et **Sanchez** *et al.*(1998) rapportent que des températures de l'ordre de 50 à 60 °C affectent l'activité enzymatique qui se trouve

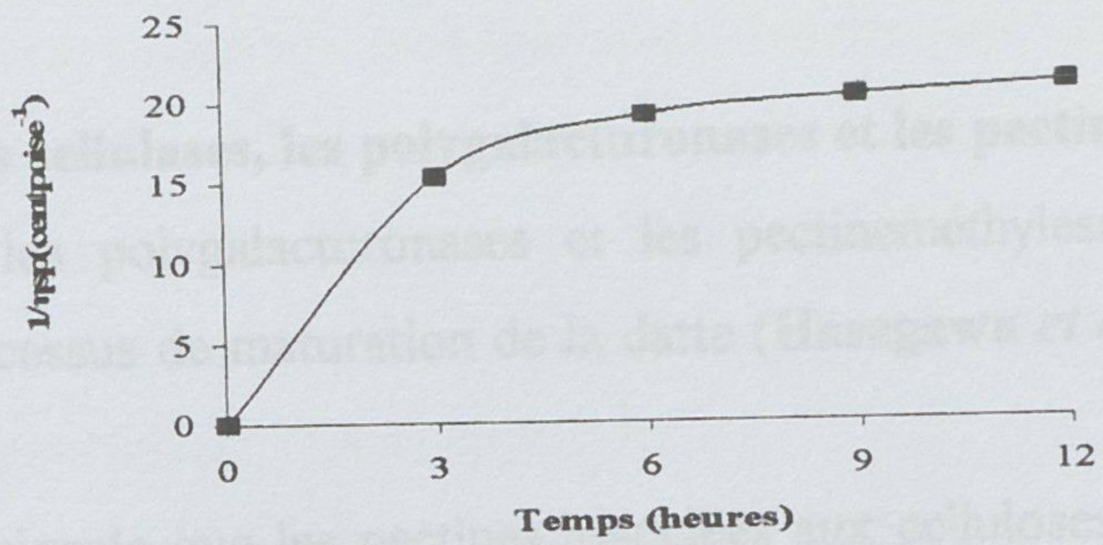


Figure 2.12: Evolution de l'activité cellulase en fonction du temps

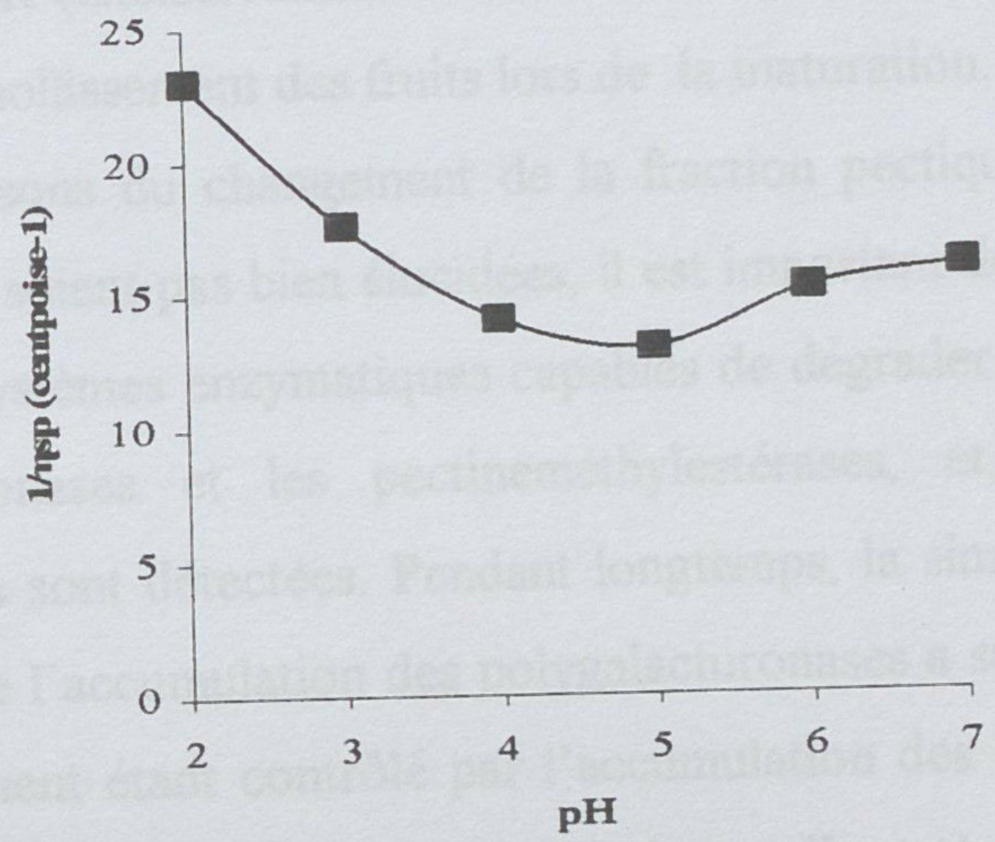


Figure 2.13 : Evolution de l'activité cellulase en fonction du pH

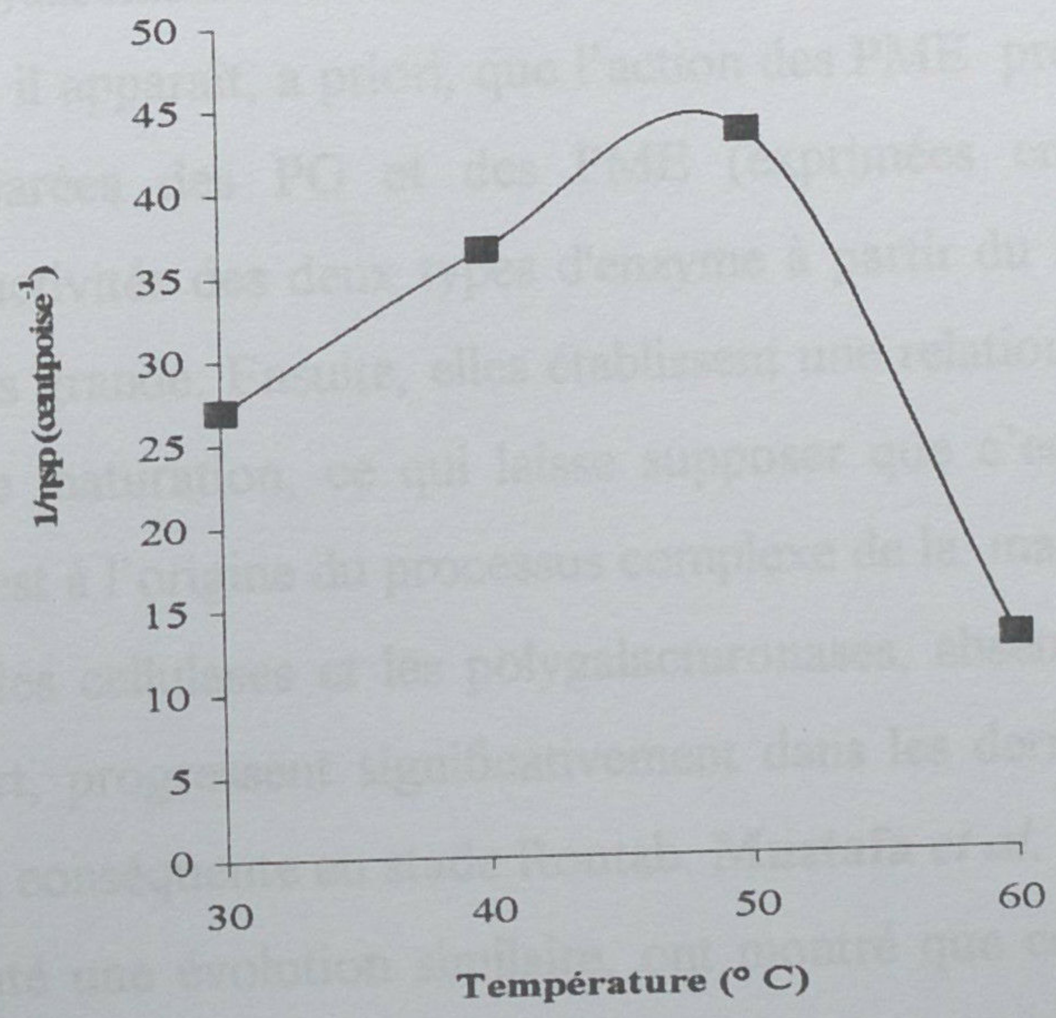


Figure 2.14 : Evolution de l'activité cellulase en fonction de la température

réduite à 96 % à 80 °C.

3.6. Relation entre les cellulases, les polygalacturonases et les pectineméthylestérases

Les cellulases, les polygalacturonases et les pectineméthylestérases jouent un rôle important dans le processus de maturation de la datte (**Hasegawa** *et al.*, 1969; **Hasegawa** et **Smolensky**, 1971)

Rouau (1982) signale que les pectines associées aux celluloses et aux hémicelluloses des parois cellulaires interviennent pour une grande part dans la texture des fruits alors que **Knee** (1978) rapporte que la solubilisation partielle ou la modification des matières pectiques de la datte au stade vert (exclusivement sous forme de protopectines), en pectines solubles à l'eau, provoque un ramollissement des fruits lors de la maturation.

Bien que les raisons du changement de la fraction pectique observée au cours de la maturation du fruit ne soient pas bien élucidées, il est important de préciser que la plupart des fruits possèdent des systèmes enzymatiques capables de dégrader les pectines isolées à savoir les endopolygalacturonases et les pectineméthylestérases, et, dans quelques cas, des exopolygalacturonases sont détectées. Pendant longtemps, la simultanéité de l'apparition des pectines solubles et de l'accumulation des polygalacturonases a suggéré une relation de cause à effet, le ramollissement étant contrôlé par l'accumulation des hydrolases et la dégradation des polysaccharides (**Bartley** et **Knee**, 1982 ; **Fischer** et **Bennet**, 1991).

En effet, il a été rapporté que l'action combinée des PG et des PME aboutit à la dégradation des polysaccharides et cause la séparation des cellules.

Dans ce sens, il apparaît, a priori, que l'action des PME précède celle des PG. En effet, les activités comparées des PG et des PME (exprimées en UI /datte) montrent une augmentation des activités des deux types d'enzyme à partir du stade I avec une activité des PME deux fois plus grande. Ensuite, elles établissent une relation synergique du deuxième au quatrième stade de maturation, ce qui laisse supposer que c'est l'action simultanée de ces deux enzymes qui est à l'origine du processus complexe de la maturation des dattes.

Néanmoins, les cellulases et les polygalacturonases, absentes ou à un niveau d'activité faible au stade vert, progressent significativement dans les derniers stades de maturation et surtout de manière conséquente au stade Routab. **Mustafa** *et al.* (1986) et **El-Zoghbi** (1994), après avoir constaté une évolution similaire, ont montré que ces activités élevées précèdent immédiatement le ramollissement des dattes. **Knee** *et al.* (1991) ont fait le même constat pour plusieurs autres fruits.

Par ailleurs, le DE des pectines de la plupart des fruits décroît au cours de la maturation (**El-Zoghbi**, 1994) alors qu'aucune évolution n'est relevée pour les pectines de la datte Deglet-nour étudiée (**cf. tableau 2.4**); ceci confirme les résultats obtenus par **Mustafa** *et al.* (1986) sur des variétés soudanaises (Jawa, Bentamoda et Mishrig).

Dans ce sens, il est suggéré que les PME jouent un rôle réduit dans le processus de ramollissement de la datte comparée à d'autres fruits.

Toutefois, les travaux de **Ketsa** et **Daengkanit** (1999) montrent que le ramollissement des fruits nécessite l'action intégrée de plusieurs enzymes telles que les polygalacturonases, les pectineméthylestérases, les cellulases et les galactosidases.

Pour d'autres fruits, il a été supposé que la dissolution de la lamelle moyenne et la désintégration des parois cellulaires, phénomène confirmé par l'étude histologique, était à l'origine du ramollissement (**Knee** *et al.*, 1991).

Les activités PG, PME et cellulase chez la datte sont relativement faibles comparées à celles d'autres fruits ; l'activité PG optimale est relevée à une température de 40 °C, un pH égal à 5 et une inhibition par le $CaCl_2$, celle des PME à une température de 50 °C, un pH égal à 7,4 et aucune inhibition par le $CaCl_2$ et celle des cellulases à une température de 50 °C et un pH égal à 5.

Il faut noter que le facteur thermique est exploité dans le stockage. En effet, le stockage à basse température retarde le ramollissement en inhibant l'activité PG des fruits. Cette activité augmente lors de l'exposition des fruits à la température ambiante où une augmentation de la solubilisation des pectines est notée. D'autre part, un traitement thermique réduit l'activité des PG et induit une inhibition de la synthèse de nouvelles protéines des PG (**Ketsa** *et al.*, 1998).

CHAPITRE II : LES PROTEINES ET LES LIPIDES

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Les protéines

La littérature rapporte que la datte ne renferme qu'une faible quantité de protéines (**Dowson** et **Aten**, 1963; **Barreveld**, 1993). Le taux diffère selon les variétés et surtout selon les stades de maturité; il est de l'ordre de 1 à 3 % du poids de la pulpe à l'état frais (**tableau 2.6**).

Lors de l'extraction du sucre des dattes, les protéines peuvent créer un trouble dans le jus et doivent être éliminées. Les protéines jouent, également, un rôle dans le brunissement non enzymatique (réaction de Maillard) et dans la précipitation des tannins pendant la maturation.

Aussi, les tanins agissent avec les protéines par la formation de liaisons covalentes qui donnent des complexes difficiles à hydrolyser par les protéases.

1.2. Les lipides et la lipoxygénase

1.2.1. Généralités

La datte mûre ne contient que peu de lipides, quelle que soit la variété considérée. Cette teneur varie entre 0,1 et 1,14 p.100 (**Wate** et **Merill,** 1963; **Salem** et **Hegazi**, 1971; **Sawaya** *et al.*, 1983, b; **Souci** *et al.*,1994; **Al-Farsi** *et al.*, 2005).

2,5 à 7,4 p.100 des lipides de la datte sont des cires concentrées au niveau de l'épiderme dont le rôle a une importance plus physiologique dans la protection du fruit que contribuant à la valeur nutritive de la chair de la datte (0,1-0,4%) (**Barreveld**, 1993).

Généralement, chez tous les végétaux et, particulièrement, les fruits, l'analyse de la composition en acides gras (AG) fait ressortir la prédominance très marquée des acides en C_{16} et C_{18} mais aussi celle du groupe des polyinsaturés de ces derniers (C_{18} : 2, C_{18} : 3) (**Mazliak**, 1974) (**tableau 2.7**).

Les acides palmitique, caprique et caprylique ont été identifiés comme étant les acides gras libres principaux de la pulpe de la datte suivis par les acides linoléique, laurique, pelargonique, myristique et un certain nombre d'autres acides gras (**Kikuchi** et **Miki**, 1974).

Entre la récolte et la consommation de la datte se passe une période plus ou moins longue pendant laquelle les processus enzymatiques internes et les manipulations extérieurs

Tableau 2.6 : Teneur en protéines de quelques dattes sèches (% MS)

Protéines	Variétés	Pays	Références
1,80 1,93 1,92	Fard Khasab Khalas	Oman	**El-Farsi** *et al.*, 2005
2,31 2,38 2,06	Barakawi Gundela Tamoda	Soudan	**Nour** et **Magboul**, 1985
3,1 3,6	Ruzeiz Sifri	Arabie Saoudite	**Sawaya** *et al.*, 1983, b
3,31	Baladi	Egypte	**Salem** et **Hegazi**, 1971
2,13 1,88 2,13	Hallawi Khadrawi Sayir	Irak	**Al-Rawi** *et al.*, 1967

Tableau 2.7 : Les principaux acides gras dans les fruits (**Mazliak**, 1974)

Abréviation	Nom systématique	Nom commun	Exemples de plantes contenant des lipides à des proportions élevées en AG
1) AG saturés			
C_{10} : O	Décanoïque	Caprique	Palmier
C_{12} : O	Dodécanoïque	Laurique	
C_{14} : O	Tetradécanoïque	Myristique	Câpres
C_{16} : O	Hexadécanoïque	Palmitique	Palmier
C_{18} : O	Octadécanoïque	Stéarique	
C_{26} : O	Hexacosanoïque	Cérotique	Pommes, raisins…
C_{28} : O	Octacosanoïque	Montanique	
C_{30} : O	Triacontanoïque	Melissique	
2) AG insaturés			Palmier
C_{16} : $1\Delta^{9}$	Hexadecenoïque	Palmitoléïque	
C_{18} : $1\Delta^{9}$	Octadecenoïque	Oléique	Olive, avocat, lierre
C_{18} : $2\Delta^{9,12}$	Octadecadienoïque	Linoléïque	
C_{18} : $3\Delta^{9,12,15}$	Octadectrienoïque	α-Linoléïque	
3) Hydroxyacides Acide 10, 16 - dihydroxy – hexadécanoïque Acide 10, 18 – dihydroxy – octadécanoïque Acide 9, 10,18 – trihydroxy- octadécanoïque Acide 18 – hydroxy – octadeque – 9 enoïque			Ces acides sont présents dans la cutine épidermique de fruit (exemple : cutine des pommes).

sont les causes de multiples réactions dont le résultat sur le plan organoleptique est une modification de la texture, de la couleur, du goût et des arômes.

A cet effet, la lipoxygénase fait partie du système enzymatique de dégradation. Présente dans différentes variétés de plantes, elle est une des enzymes les plus oxydatives ayant comme substrat les acides gras essentiels.

1.2.2. La lipoxygénase

La lipoxygénase ou linoléate-oxygène oxydo-réductase (E.C.1.13.11.12) est une enzyme qui contient un atome de fer non héminique par molécule ; elle provoque exclusivement l'oxydation par l'oxygène moléculaire des acides gras polyinsaturés possédant un système de double liaisons conjuguées cis-cis, 1-4 pentadiene (essentiellement les acides gras : linoléique et linolénique chez les végétaux et l'acide arachidonique chez les animaux) et génère des hydroperoxydes diériques conjugués qui par leurs altérations provoquent la formation de composés carboxylés responsables de l'odeur de rance dans les aliments ainsi que du changement de couleur indésirable par oxydation des pigments caroténoïdes (**Reynolds** et **Klein**,1982; **Marczy** *et al.*,1995; **Larreta-Garde** , 1995; **Lopez-Nicolas** *et al.*,1997).

Par ailleurs, différentes isoenzymes ont été décrites chez les plantes notamment chez le soja où en dehors du LOX1 (seule lipoxygénase commerciale), les isoenzymes LOX2 et LOX3 ont été détectées. Seulement, la part de responsabilité de chacune dans le développement de la flaveur n'est pas bien définie (**Matoba** *et al.*, 1985).

La lipoxygénase joue un rôle important dans le métabolisme des AGPI des animaux et des plantes; bien qu'il soit moins clair pour ces dernières. Néanmoins, elle est postulée pour son implication dans la maturation et la sénescence en stimulant la production des radicaux libres intercellulaires qui provoquent la détérioration membranaire (**Hildbrand** et **Hymourtz**, 1981).

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

La datte (*Phœnix dactylifera*, variété Deglet–nour), décrite précédemment, a été utilisée.

2.2. Teneur en protéines

La teneur en azote total, déterminée à partir de la pulpe fraîche (environ 1 g en matière sèche) selon la méthode de Kjeldahl, est affectée d'un coefficient égal à 6,25 afin d'estimer la teneur en protéines totales des échantillons.

2.3. Détermination des lipides totaux

Des dattes (environ 20 g de pulpe fraîche selon les stades de maturation) décongelées et dénoyautées puis coupées en fragments et broyées finement sont introduites dans un appareil de type Soxhlet. La matière grasse est épuisée avec de l'éther diethylique pendant 3 heures puis récupérée après évaporation du solvant. Les lipides totaux, exprimés en g/100g de produit sec, sont déterminés par gravimétrie.

2.4. Détermination des acides gras

Les lipides totaux récupérés subissent une méthylation par 0,5 ml de méthanol sulfurique à 0,5 %. Les tubes sont scellés puis placés dans une étuve à 130 °C pendant 3 heures.

Le dosage des esters méthyliques ainsi formés se fait à l'aide d'un chromatographe en phase gaz (Fisons Instruments, série G.C 9000), équipé d'une colonne capillaire DB-23 (50 % cyanopropyle), 30 m x 0,25 mm. Le gaz vecteur est de l'azote ($2ml.min^{-1}$). L'injecteur est maintenu à 240 °C. La température du four est programmée de 80 °C à 220 °C à raison de 5 °C min^{-1}. Le détecteur FID est maintenu à 250 °C.

2.5. Extraction et caractérisation de la lipoxygénase

2.5.1. Choix de la méthode

La méthode de dosage des doubles liaisons conjuguées est une technique utilisable pour de nombreux produits et trouve un intérêt particulier pour ceux qui présentent une activité lipoxygénasique faible avec une évolution précise, une reproductibilité acceptable et un gain considérable de temps. En plus, elle présente l'avantage de l'absence d'inhibiteurs ou d'impuretés toxiques dans le mélange réactionnel (**Varoquaux** *et al.*, 1973). Dans la plupart

des cas, les réactions sont étudiées dans un milieu aqueux modèle dilué. Dés lors, il faut se garder, a priori, d'extrapoler directement les valeurs données dans la littérature aux milieux semi-rigides relativement peu hydratés (diffusion de l'oxygène, contact enzyme-substrat) (**Nicolas** et **Drapron**, 1981).

2.5.2. Principe

La lipoxygénase catalyse l'oxydation des acides gras comportant deux doubles liaisons cis- cis non conjuguées. Le produit de la réaction est un hydroperoxyde à doubles liaisons cis-trans conjuguées qui présentent un maximum d'absorption à 234 nm. L'activité de l'enzyme est déterminée à l'aide de l'enregistrement de la densité optique du milieu réactionnel en fonction du temps.

2.5.3. Extraction

Dans une enceinte à une température ne dépassant pas 5 °C, 30 g de dattes décongelées et dénoyautées sont très finement broyées, dans un mixeur, en présence de 48 ml d'eau distillée. Le broyage est effectué rapidement à l'abri de l'air. L'échantillon est filtré sur coton de verre et centrifugé à 6000 tr/min pendant 30 min. Le surnageant représente l'extrait enzymatique brut (**Varoquaux** *et al.*, 1973).

La préparation du substrat est réalisée selon la méthode de **Chang** *et al.* (1971) améliorée par **Bonnet** et **Crouzet** (1977).

Le substrat est constitué de 10 µl d'acide linoléique pur à 95 %, 4 ml d'eau distillée, 1 ml de NaOH 0,1M et 5 µl de Tween 20 (polyoxyéthylène monolaurate de sorbitol) qui est un agent tensioactif qui permet d'avoir une solution optiquement limpide et un substrat dispersé de façon homogène (**Surrey**, 1964).

Le mélange est fortement agité, dilué à 25 ml avec de l'eau distillée puis conservé à l'abri de l'air.

2.5.4. Mesure des activités

Le mélange réactionnel est constitué de 2,7 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M, pH 6,5, 0,3 ml de substrat et 40 µl d'extrait enzymatique brut dans une cellule de quartz de 1 cm.

Après une incubation de 10 min à 37 °C, la réaction commence avec l'addition de l'enzyme au temps zéro. La mesure de l'activité consiste à enregistrer l'augmentation de l'absorbance à 234 nm. Des essais à blanc sont effectués en parallèle pour évaluer l'autooxydation du substrat.

Une unité lipoxygénasique (UL) est la quantité d'enzyme qui produit l'oxydation d'une µmole d'acide linoléique par min provoquant une augmentation de l'absorbance de 0,1 (à 234 nm) par min, à pH 6,5 et à une température de 37 ° C.

Les résultats obtenus peuvent être aussi exprimés par rapport aux produits primaires de l'oxydation par la lipoxygénase, les hydroperoxydes ou LOOH. Les absorbances sont converties en concentrations d'LOOH qui sont déterminées en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire (εM) et en appliquant l'équation suivante (**Wolff,** 1968):

$$\varepsilon M = A / C \times l$$

avec:

$\varepsilon M = 28.10^3\ cm^{-1}.M^{-1}$ (**Privett** *et al.*, 1955)

A : absorbance à 234 nm

l : épaisseur de l'échantillon (cm)

C : concentration en hydroperoxydes (g /ml)

2.6. Estimation de l'altération des dattes après stockage

2.6.1. Dosage des composés secondaires

L'extrait enzymatique brut, préparé selon la méthode de **Varoquaux** *et al.* (1973), est mis en solution dans le cyclohexane (à 0,1 %) puis la lecture des extinctions à 270 nm est faite avec le cyclohexane pour spectrophotométrie comme référence. En effet, à 270 nm, ce sont les produits de la décomposition des hydroperoxydes et des épiperoxydes diènes conjuguées qui absorbent.

Cette méthode renseigne sur le degré d'oxydation basé sur le pouvoir que possèdent certaines substances d'absorber de l'énergie lumineuse à 270 nm dans un solvant inerte du point de vue spectrophotométrique.

2.6.2. Dosage des composés carbonylés

La méthode est similaire à celle utilisée pour la mesure de l 'activité lipoxygénasique (**Varoquaux** *et al.*, 1973 ; **Bonnet** et **Crouzet**, 1977) mais à une absorbance à 285 nm.

En effet, se basant sur le fait que les produits secondaires de la réaction lipoxygénasique sont optiquement actifs, les composés carbonylés (issus de l'action de la lipoxygénase) sont dosés par spectrophotométrie UV à 285 nm (**Garssen** *et al.*, 1971).

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Les protéines

Une diminution progressive des teneurs en protéines, exprimées en % MS, au cours de la maturation du fruit est relevée (**tableau 2.8**).

Cette teneur continue à chuter à la surmaturation (résultat non présenté) d'où l'intérêt de respecter la période de maturation et la date de récolte afin de préserver la qualité nutritionnelle de la datte. Il est à noter que la teneur en protéines totales, au stade mûr, reste inférieure à celles trouvées pour des dattes sèches par **Al-Rawi** *et al.* (1967), **Salem** et **Hegazi** (1971), **Sawaya** *et al.* (1983, b), **Nour** et **Magboul** (1985), **Souci** *et al.* (1994) et **Al-Farsi** *et al.* (2005) (**cf. tableau 2.6**).En revanche, les protéines solubles croissent continuellement en fonction de la maturation pour atteindre, au stade mûr, une teneur 12 fois supérieure à celle du stade vert (**cf. tableau 2.5**).

A titre comparatif, la teneur en protéines des pommes, des poires, des figues, des abricots, des cerises et des prunes varie entre 0,5 % et 1,5 % MS (**Ulrich**, 1952). Ainsi, les péricarpes des fruits sont, d'une manière générale, pauvres en protéines.

Ces résultats montrent que la datte est le siège d'une accumulation des substances azotées durant les stades I et II, qui s'illustre par une protéogénèse active. Au stade III, la dégénérescence débute, ce qui confirme que la maturation est la première phase de la sénescence. La maturation est un événement programmé entraînant l'expression régulée de gènes spécifiques (**Rhodes**, 1980 ; **Grierson**, 1987 ; **Heller** *et al.*, 1995 ; **Pech** *et al.*, 1998 ; **Brownleader** *et al.*, 1999).

3.2. Les lipides et la lipoxygénase

3.2.1. Evolution des lipides totaux et des acides gras totaux au cours de la maturation

Le taux de lipides régresse rapidement du stade I au stade II (soit une chute d'environ 50 %) puis du stade II au stade III (soit une chute d'environ 40 %) et maintient un niveau presque constant jusqu'au stade IV (**tableau 2.9**).

La teneur en lipides de la datte mûre, soit 1,21 % MS, se situe dans l'intervalle rapporté par la littérature (**Salem** et **Hegazi**, 1971 ; **Souci** *et al.*, 1994; **Al-Farsi** *et al.*, 2005) bien que **Sawaya** *et al.* (1983, b) rapportent des teneurs beaucoup plus faibles (de 0,7 à 0,1 %) au cours de la maturation de trois variétés de dattes saoudiennes (Barni, Ruzeiz et Sifri).

Tableau 2.8 : Evolution de la teneur en protéines totales (% MS) de la datte au cours de la maturation

Stades de maturation	g / fruit	g /100 g MF	g / 100 g MS
I	0,18	2,95 ± 0,01	2,41 ± 0,01
II	0,39	4,10 ± 0,16	1,78 ± 0,16
III	0,34	4,60 ± 0,07	1,32 ± 0,07
IV	0,28	3,90 ± 0,06	0,94 ± 0,06

Tableau 2.9 : Evolution des teneurs en lipides totaux et en acides gras totaux (%MS) de la datte au cours de la maturation

Stades de maturation	Lipides totaux	C_{14} : 0 myristique	C_{16} : 0 palmitique	C_{18} :0 stéarique	C_{18} :1 oléique	C_{18} :2 linoléique	C_{18} :3 linolénique
I	5,46 ± 0,01	0,307	0,430	0,572	0,588	0,628	0,672
II	2,78 ± 0,01	0,134	0,219	0,240	0,291	0,298	0,318
III	1,69 ± 0,01	0,095	0,133	0,177	0,181	0,193	0,225
IV	1 ,21 ± 0,01	0,069	0,095	0,126	0,130	0,138	0,148

Les teneurs en acides gras (AG) totaux, exprimés en % MS, de la datte au cours de la maturation sont donnés dans le **tableau 2.9**.

Le chromatogramme des acides gras totaux de la datte Deglet-nour révèle la présence de 6 acides gras principaux: myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linolénique.

Sur le plan quantitatif, les lipides totaux de la datte au stade mûr se caractérisent par une prédominance du C_{16} et des C_{18}, présents à raison de 8 % et 34 %, respectivement, des lipides totaux dont 24 % d'acides gras polyinsaturés (AGPI); ce sont les AG majoritaires de tous les fruits (**Mazliak**, 1974) mais dont le taux dans la datte demeure faible comparé aux autres végétaux.

L'évolution des acides gras au cours de la maturation est presque similaire. Une diminution de l'ordre de 50 % est relevée du stade I au stade II pour tous les AG puis elle se stabilise. Elle est plus marquée pour les acides palmitique, oléique et linoléique, du stade II au stade III; alors que pour l'acide linolénique, elle n'est effective qu'au stade IV.

En effet, il est connu que les AGPI interviennent dans des réactions d'oxydo-réduction qui engendrent une diminution de la qualité nutritionnelle.

D'après **Labuza** et **Bolin** (1972), les vitesses d'oxydation des lipides les plus faibles sont observées lorsque l'eau ne forme qu'une monocouche sur les sites de fixation, c'est à dire pour des activités d'eau comprises entre 0,2 et 0,3. La vitesse croît rapidement pour des activités proches de zéro. Dans ce sens, il faut noter que la datte Deglet-nour a tendance à perdre beaucoup d'eau au cours de la maturation (une chute moyenne de l'humidité de 66 %).

Drapron et **Beaux** (1969) et **Vivas** *et al.* (1995) rapportent que la plus grande partie de l'oxygène est utilisée pour l'oxydation des deux acides gras linoléique et linolénique en hydropéroxydes (sous forme libre ou de monoglycérides).

Seulement, dans le cas de la datte, il faut prendre en considération le cas des polyphénoloxydases, catalyseurs de l'oxydation des phénols qui, par leurs propriétés antioxygènes, exercent un effet inhibiteur sur la lipoxygénase (**Nicolas** et **Drapron**, 1977) et rentrent en compétition avec cette dernière pour l'utilisation de l'O_2.

3.2.2. Evolution des lipides totaux et des acides gras totaux au cours du stockage

La teneur en lipides totaux de la datte témoin, soit 1,21 % MS, passe à 0,49 % pour la datte réfrigérée (5 ± 1 °C) et à 0,19 % pour celle stockée à la température ambiante (25 ± 5 °C).

Une baisse remarquable de la teneur en lipides totaux est relevée pour les dattes stockées pendant 6 mois. Cette baisse est relativement moins importante dans le cas des dattes réfrigérées (soit moins 59,5 %) que dans celui des dattes stockées à la température ambiante (soit moins 84,3 %). Ceci peut être attribué aux vertus du froid qui réduit l'activité métabolique et entraîne une rigidification des lipides membranaires.

Cependant, malgré ces teneurs faibles, la qualité de la datte peut être affectée par un rancissement lipidique. En effet, ce dernier peut être sensoriellement perceptible, à partir d'un taux de lipides 0,5 %, renfermant des AGPI (**Fritsch**, 1994); soit par une autooxydation soit par une oxydation enzymatique catalysée par la lipoxygénase (**Berset** et **Cuvelier**, 1996).

A cet effet, **Dutt** *et al.* (1992) signalent l'existence à la fois de réactions d'hydrolyse et d'oxydation catalysées par la lipoxygénase qui entraînent une diminution remarquable des lipides. Néanmoins, **Clayton** et **Morrison** (1972) rapportent que le couple température-hygrométrie de l'atmosphère de stockage est le principal responsable des variations que subit la fraction lipidique et que la diminution des lipides totaux au cours du stockage est une altération de ces derniers qui subissent des hydrolyses et des détériorations microbiennes.

Les profils chromatographiques des acides gras totaux connaissent des variations importantes pour les dattes stockées au froid et à température ambiante. En effet, une baisse des acides gras totaux de l'ordre de 36 % pour la datte réfrigérée et de 47 % pour la datte stockée est relevée. A ce propos, le processus le mieux connu de la dégradation de la fraction lipidique est celui de l'hydrolyse des acides gras totaux par la libération des acides gras libres, cette diminution étant proportionnelle au temps de stockage.

Par ailleurs, les acides linoléique et linolénique amorcent une baisse de 6 % pour la datte réfrigérée et de 38 % pour celle stockée à la température ambiante ; cela se traduit soit par la présence de moisissures utilisant préférentiellement ces AG pour leur métabolisme (**Dutt** *et al.*, 1992), soit par une éventuelle rupture interne de la chaîne carbonée des AGPI sous l'action de la lipoxygénase ; cette oxydation se traduit par une libération d'hydroperoxydes.

En somme, la fraction lipidique subit des variations qui sont certainement dues à l'action combinée des lipases et des micro-organismes, mais aussi de la lipoxygénase pour les AGPI.

La littérature rapporte la complexité des phénomènes conduisant à l'altération durant le stockage et ne montre pas clairement la part de responsabilité de chaque facteur.

Ainsi, la détérioration de la qualité organoleptique (flaveur-odeur) et parfois de la

couleur des fruits non blanchis et réfrigérés est associée à la dégradation des lipides insaturés.

Si les acides gras saturés paraissent résistants, une sensibilité des AGPI aux oxydations est constatée. En effet, une scission s'opère préférentiellement au niveau des liaisons de faible énergie.

3.2.3. Evaluation de l'activité lipoxygénasique au cours de la maturation et du stockage

L'activité lipoxygénasique, absente aux premiers stades de la maturation, apparaît au stade III, soit 0,5 UL, puis augmente pour atteindre une valeur de 3,22 UL, au stade IV.

En général, dans la littérature, les résultats sont exprimés sur la base de 100 pour le soja, la plus puissante source connue de lipoxygénase (**Al-Obaidy** et **Siddiqi**, 1981). Les résultats obtenus indiquent que la datte Deglet-nour est une source d'enzyme présentant environ 4 % de l'activité relative du soja.

Les activités obtenues peuvent être exprimées par rapport aux quantités d'LOOH formés puisque ces derniers sont les produits primaires de l'oxydation enzymatique. Les hydroperoxydes possèdent deux doubles liaisons conjuguées cis-trans qui présentent un maximum d'absorption dans l'U.V (234 nm).

Les absorbances sont converties en concentrations d'LOOH qui sont déterminées en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire εM.

La datte mûre présente une activité lipoxygénasique de 3,22 UL, soit une concentration en hydroperoxydes de 115.10^{-7} g / cm^3.

Pour sa part, la datte stockée à température ambiante présente une activité lipoxygénasique de 9,48 UL et un niveau d'LOOH 2 fois plus important que celui de la datte mûre (**tableau 2.10**).

Ce qui permet, a priori, de situer le niveau d'altération du fruit et la part attribuée à l'activité lipoxygénasique dans la datte étudiée.

Dans ce sens, **Nicolas** et **Potus** (1994) considèrent que l'oxydation des AGPI par la lipoxygénase est fortement liée au temps et aux conditions de stockage. La vitesse de la réaction est susceptible d'être énergiquement accélérée par la présence d'enzyme, ce qui peut expliquer l'éventuelle destruction des structures cellulaires du fruit avec le temps par le contact direct entre l'enzyme et son substrat qui se trouve, donc, plus accessible.

Dans le cas des dattes, il est probable que la réaction soit activée par la température ambiante, température à laquelle la lipoxygénase présente son maximum d'activité (**Nicolas** et **Drapron**, 1981).

Tableau 2.10 : Conversion des A_{234} en concentrations d'hydroperoxydes [LOOH] dans les différentes dattes

Datte	A_{234}	[LOOH] g / cm^3
Mûre	0,322	115.10^{-7}
Réfrigérée à 5 °C	0,596	$212.\ 10^{-7}$
Stockée à température ambiante	0,948	$338.\ 10^{-7}$

En ce qui concerne la datte réfrigérée, une activité de 5, 96 UL est relevée, cette valeur met en évidence le rôle du froid dans le maintien des structures cellulaires pour une durée plus au moins longue et une rigidification générale des lipides avec une inactivation partielle et non pas totale des enzymes puisque l'activité de la lipoxygénase peut être présente même à l'état congelé (**Roux**, 1994).

Par rapport à la datte mûre, l'activité lipoxygénase marque une évolution plus importante dans la datte stockée à température ambiante que celle réfrigérée; elle est respectivement de l'ordre de 66% et de 37% (**cf.tableau 2.10**).

3.2.3.1. Les composés secondaires de l'oxydation par la lipoxygénase

3.2.3.1.1. Les composés secondaires détectés par spectrophotométrie UV (270 nm)

La mesure de l'extinction à 270 nm renseigne d'une façon précise sur l'oxydation globale des lipides des dattes. Cette absorbance de lumière UV est liée à la présence des diènes conjugués dont la formation correspond au réarrangement des doubles liaisons originellement présentes dans les AGPI. Il s'agit, principalement, de l'acide linoléique dont la dégradation par oxydation enzymatique ou non enzymatique provoque la formation d'aldéhydes et de cétones possédant plusieurs maxima d'absorbance entre 250 et 280 nm.

Ces composés carbonylés sont identiques à ceux obtenus par oxydation spontanée.

Les résultats obtenus, après une dilution du milieu réactionnel au 1/ 10, sont données dans le **tableau 2.11.**

La datte Deglet-nour mûre présente une faible absorbance (soit 0, 221). Il faut signaler que plus la teneur en peroxydes est élevée et plus les dattes sont riches en composés secondaires et l'extinction à 270 nm est forte (**Chaudière** et **Gérard-Monnier**, 1995). Il est évident que les dattes stockées présentent une oxydation plus prononcée (soit 0,590 à 0, 976 d'A_{270}).

L'interaction de l'oxygène et du temps de stockage (avec un cumul d'énergie favorisé par la température régnante) traduit une forte réactivité des AGPI favorisant la formation d'LOOH et accélérant,donc, la réaction vers la production de composés carbonylés et hydroxylés tels que les aldéhydes (n-hexanal, acetaldehyde,....) et les hydrocarbures (pentane), composés les plus cités par la littérature et qui proviennent d'une dégradation du C_{18}:2, responsables du goût de rance (**Berset** et **Cuvelier**, 1996).

3.2.3.1.2. Les composés secondaires détectés par spectrophotométrie UV (285 nm)

L'évaluation des composés carbonylés issus d'une oxydation lipoxygénasique en UV (285 nm) est donnée dans le **tableau 2.12**.

Tableau 2.11: Evolution des A_{270} des composés secondaires dans les différentes dattes

Datte	A_{270}
Mûre	0,221
Réfrigérée à 5 °C	0,590
Stockée à température ambiante	0,976

Tableau 2.12: Evolution des A_{285} des composés carbonylés dans les différentes dattes

Datte	A_{285}
Mûre	0,167
Réfrigérée à 5 °C	0,226
Stockée à température ambiante	0,316

Si la datte mûre n'enregistre qu'une absorbance de 0,167, pour la datte réfrigérée, cette valeur évolue lentement avec le temps de stockage (soit plus 35 %), grâce aux températures basses qui contribuent au maintien de la fermeté et, donc, de la qualité du fruit pour une période plus ou moins longue, mais s'accentue fortement pour la datte stockée à température ambiante (soit plus 89 %).

Il est à noter que, suite à l'augmentation de l'humidité dans la datte réfrigérée, les hydroperoxydes disparaissent, particulièrement, par polymérisation ou par interaction avec d'autres constituants (**Hanis** *et al.*, 1988).

L'instabilité des LOOH cis – trans, formés au cours du stockage, favoriserait la disparition de ceux-ci en produits secondaires volatils et non volatils après consommation totale de l'oxygène dissout dans le milieu et qui coïncide avec un ralentissement de la réaction enzymatique; cette dernière tend vers un palier qui traduit une formation maximale en ces produits primaires incolores et inodores.

Ainsi, la fin de la première réaction enzymatique se situe à un carrefour où interviennent d'autres réactions, principalement, de scission et de déshydratation des LOOH du C_{18}:2 dont le résultat est l'apparition du n-hexanal (dont le précurseur est l'acide linoléique libre), des cétones, des acides, des composés hydroxylés et des polymères. Tous ces produits carbonylés absorbent à 285 nm et leur production se traduit par une augmentation de l'absorbance au cours du temps de stockage.

Après 6 mois de stockage, une formation continue de produits d'oxydation est observée.

L'interaction entre la température et la durée de stockage présente un effet non négligeable par l'emmagasinement de la chaleur au cours du temps qui favoriserait la formation des diènes conjuguées par une oxydation poussée puis l'apparition de composés carbonylés qui n'absorbent pas à 234 nm mais présentent un maximum d'absorbance à 285 nm (**Nicolas** *et al.*, 1974).

Ainsi, il est évident que l'accroissement des A_{285} n'est pas similaire pour les deux types de dattes stockées car ces absorbances sont d'autant plus grandes que la quantité en LOOH formés, lors de la réaction primaire, est importante (**Abbas** *et al.*, 1988).

En somme, les composés carbonylés volatils sont formés, par l'oxydation de la lipoxygénase, en petites quantités mais plus la concentration en cette enzyme est importante et plus le développement des arômes indésirables est décelable (**Williams** *et al.*, 1986).

Par ailleurs, au cours du temps, lorsque la concentration en hydroperoxydes est

suffisante à leur décomposition, ces derniers se transforment en molécules de petites tailles qui constituent une source potentielle de déviation olfactive (**Snyder** *et al.*, 1988; **Vivas** *et al.*,1995; **Bourgeois** *et al.*,1995). Les aldéhydes (C_5: n-pentanal, C_6: n-hexanal, C_7: n-heptanal, C_8: n-octanal) sont les produits directs de cette dégradation, leur nature et leurs proportions dépendent de l'AG oxydé.

Ainsi, les AG mono-insaturés ne donnent pas naissances aux mêmes produits que ceux issus de la décomposition des AGPI.

Par une scission, il se produit une formation de composés volatils: aldéhydes, alcools et acides responsables de l'odeur rance, et, particulièrement, le n-hexanal par la lipoxygénase (**Larreta-Garde**, 1995) dont la production par la lipoxygénase peut faire basculer les constituants participant à l'arôme de la datte dans un sens défavorable au consommateur.

Dans ce sens, **Norman** et **Fouse** (1977) ont proposé leur utilisation comme indice de qualité chez la datte.

TROISIÈME PARTIE

LA COULEUR DE LA DATTE

CHAPITRE I : LES COMPOSES PHENOLIQUES ET LE BRUNISSEMENT DE LA DATTE

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Les composés phénoliques

1.1.1. Généralités

Les composés phénoliques, également dénommés polyphénols, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther méthylique, ester, sucre ...).

Les composés phénoliques les plus répandus sont classés en quatre groupes:

- les acides phénols (acides benzoïques, acides cinnamiques) et les coumarines
- les flavones, flavonols et dérivés voisins
- les anthocyanes
- les tanins

Parmi les polyphénols les plus abondants, citons l' (-) épicatéchine, le kaempférol, l'acide ellagique, l'acide cinnamique et la procyanidine B1 (**figure 3.1**).

1.1.2. Les acides phénols et les coumarines

1.1.2.1. Les acides benzoïques

Ces acides sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. Ils sont principalement représentés par les acides *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique et gentisique (**Ribéreau-Gayon** *et al.*, 1976).

1.1.2.2. Les acides cinnamiques

Ces acides possèdent une structure du type C_6-C_3. Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *t*-caféique, l'acide *t*-fertarique et l'acide *t*-sinapique (**Singleton** *et al.*, 1978; **Goetz** *et al.*, 1999)

On rencontre au moins un de ces quatre acides dans pratiquement tous les végétaux supérieurs. Ces acides existent dans les tissus sous forme de différentes combinaisons (**Ribéreau-Gayon**, 1968).

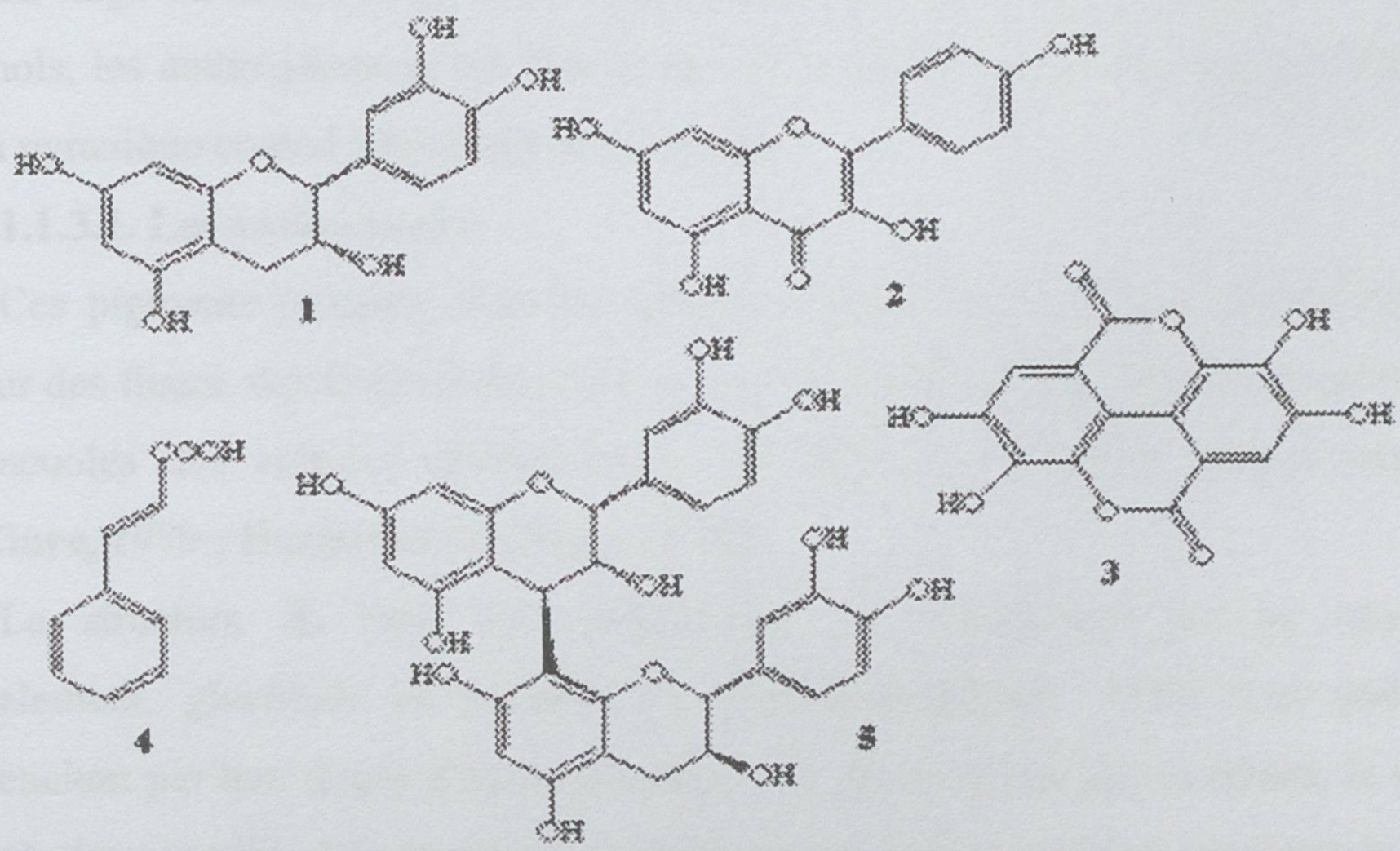


Figure 3.1 : Structure chimique de quelques composés phénoliques : (-) épicatéchine (**1**), kaempférol (**2**), acide ellagique (**3**), acide cinnamique (**4**) et procyanidine B1 (**5**)

1.1.2.3. Les coumarines

Les différentes coumarines dérivent des acides cinnamiques ortho-hydroxylés alors que la coumarine elle-même dérive de l'acide *o*-coumarique.

1.1.3. Les flavonoïdes

Les composés flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à quinze atomes de carbone ($C_6 - C_3 - C_6$), correspondant à la structure du 2-phényl-benzopyrone.
Au sens large du terme, ce groupe comprend principalement trois familles de composés : les flavonols, les anthocyanes et les flavanones qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central (**Bourzeix** *et al.*, 1986).

1.1.3.1. Les anthocyanes

Ces pigments présents dans les plantes, détectables à l'œil nu, sont à l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges et bleues, ils sont généralement localisés dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau (**McClure**, 1979 ; **Harborne** et **Grayer**, 1988).

La structure de base des anthocyanes est caractérisée par un noyau flavone, généralement, glucosylé en position C_3 (**Ribéreau-Gayon**, 1968). Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment.

1.1.3.2. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols qui se trouvent dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres, les feuilles de thé et les fruits (raisin, café, cacao, datte ...). Ils sont divisés en tanins condensés et hydrolysables.

1.1.3.2.1. <u>Les tanins condensés</u> (flavan-3-ols)

Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols, formés d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation (**Hemingway**, 1992). Ils ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison intermonomérique (**Porter** *et al.*, 1986).

Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C_2 et C_3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) et les gallocatéchines (trihydroxylées).
Ces unités peuvent être substituées par l'acide gallique en position C_3, en particulier

l' (-)-épicatéchine, formant l' (-)-épicatéchine-*o*-gallate (**Su** et **Singleton**, 2001).

1.1.3.2.2. Les tanins hydrolysables

Ce sont des esters de glucides ou d'acides phénols ou de dérivés d'acides phénols ; la molécule glucidique est, en général, du glucose mais dans certains cas, ce sont des polysaccharides (**Ribéreau-Gayon**, 1968).

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central, le glucose, et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant *un* à *n* monomère(s) d'acide phénol.

1.1.3.2.3. Complexation des tanins avec les protéines et les polysaccharides

Les tanins ont la particularité de se complexer aux protéines et aux polysaccharides (**Haslam**, 1988; **Ricardo Da Silva** *et al.*, 1991; **Cheynier** *et al.*, 1992). Ces composés possèdent une multitude de groupements hydroxyles capables de former des liaisons hydrogène avec plusieurs sites de la protéine (ou du polysaccharide); ce qui maintient une structure stable et rigide. Le complexe tanin protéine précipite souvent lorsqu'il se trouve dans un milieu aqueux.

Ceci peut être expliqué de deux façons:

- lorsque la protéine se trouve en faible concentration, les tanins se complexent sur plusieurs sites, formant une monocouche à la surface de la protéine moins hydrophile que la protéine elle-même;
- lorsque la protéine se trouve en forte concentration, les tanins se complexent sur les sites des protéines qui forment aussi des liaisons intermoléculaires. De cette manière, l' hydrophobicité du complexe augmente et le fait précipiter.

Par ailleurs, si les tanins sont capables de se complexer avec les protéines, il est possible qu'ils puissent bloquer les sites actifs des enzymes, inhibant ainsi leur activité; selon **Haslam** (1988), toutes les enzymes sont inhibées par les polyphénols *in vitro*.

1.1.4. Les composés phénoliques de la datte

Les dattes sont riches en composés phénoliques de type flavonones, glucosides, flavonols et tanins anthocyaniques solubles et condensés (**Maier** et **Metzler**, 1964). Selon la littérature, on distingue, dans la plupart des dattes, les flavonoides dont les principaux sont les anthocyanines, les flavonols et les tanins. Cependant, les principaux polyphénols de la datte, les tanins, constituent jusqu'à 3 % du poids sec de la pulpe. Ces composés phénoliques se différencient entre eux au cours de la maturation. Ainsi, la couleur jaune des dattes au stade II

est attribuée aux flavones alors que la couleur rouge ambrée de la datte Deglet-nour est attribuée aux anthocyanes.

Toutes les variétés de datte sont marquées par une astringence plus ou moins prononcée due à un dépôt d'une couche de tanins au dessus de la peau au cours du stade vert. Un de leurs principaux effets, au cours de la maturation, est le passage de la forme soluble à la forme insoluble qui résulte, probablement, d'une combinaison avec les protéines.

Pratiquement, lorsque les dattes perdent leur couleur verte et deviennent jaunes ou rouges, le tanin se dépose dans les cellules géantes où il était présent jusqu'alors sous forme soluble (goût astringent) et y constitue des granules insolubles (tanin condensé ou précipité) (goût insipide); l'astringence disparaît alors et la datte devient plus savoureuse (**Dowson** et **Aten**, 1963). La synchronisation du processus (vitesse d'insolubilisation) diffère selon les variétés et détermine largement le goût agréable ou pas de la datte au stade mûr.

Par ailleurs, **Maier** et **Metzler** (1964) rapportent le cas de la variété molle égyptienne Samani qui englobe un grand nombre de composés phénoliques où on distingue les anthocyanines, les flavones, les flavonols et les tanins qui ne sont pas caractérisés par une couleur définie à l'état soluble; les catéchines et les leucoanthocyanines incolores se transforment en produits bruns après oxydation.

Il est à noter que les polyphénols sont dotés de certaines activités antioxydantes, antifongiques, antibactériennes et anti-inflammatoires qui leur permettent de jouer un grand rôle nutritionnel et thérapeutique.

1.2. Le brunissement de la datte

Les réactions du brunissement sont largement rencontrées dans les produits alimentaires et constituent avec d'autres propriétés organoleptiques la base d'acceptabilité de l'aliment puisqu'ils affectent la qualité nutritionnelle et l'apparence de l'aliment (**Macheix** *et al.*, 1990).

Ce brunissement est attribué à des réactions enzymatiques et non enzymatiques. Les réactions du brunissement enzymatique prennent place dans le matériel végétal lorsque les cellules du tissu sont endommagées, ce qui conduit au contact accidentel, facile et surtout non contrôlé du substrat et l'enzyme. Ce phénomène est le résultat de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques en quinones qui se polymérisent en produits bruns (**Goupy** *et al.*, 1990). Le brunissement enzymatique catalysé par les polyphénoloxydases pose les problèmes de couleur de la datte Deglet-nour, particulièrement, si le fruit est endommagé lors des divers traitements.

Beaucoup de connaissances sur les polyphénoloxydases sont développées notamment dans les problèmes de technologie. Les recherches ont porté sur des végétaux d'importance économique évidente (poires, pommes, bananes, thé....) ; la datte n'en faisant pas partie, peu d'études l'ont concerné.

1.2.1. Les polyphénoloxydases

Les polyphénoloxydases (EC 1.10.3.1 et EC 1.10.3.2) (PPO) jouent un rôle important dans le développement de la couleur de la datte.

Les PPO sont présentes à la fois dans la peau et la pulpe des fruits mais leur répartition est différente selon le type de fruit ou le stade physiologique (**Park** et **Luh**, 1985).

Les PPO appartiennent au groupe des oxydoréductases à deux atomes de cuivre. Elles catalysent l'oxydation des composés phénoliques en présence d'oxygène moléculaire (**figure 3.2**).

L'appellation polyphénoloxydase englobe plusieurs enzymes qui sont divisées en deux principaux groupes en fonction de la spécificité de leur substrat (**Viamos-Vigyazo**, 1981 ; **Mayer,** 1987, **Enzyme Nomenclature**, 1992) :

- la catéchol oxydase (EC 1.10.3.1) ou *o*-diphénol oxygène oxydoréductase qui catalyse deux réactions : a) hydroxylation d'un monophénol qui correspond à l'activité crésolase, suivie habituellement par l'oxydation du diphénol formé, b) l'oxydation des ortho-diphénols qui correspond à l'activité catécholase, fréquemment appelée phénolase, polyphénoloxydase ou tyrosinase.

- les laccases (EC 1.10.3.2) ou *p*-diphénol oxygène oxydoréductases qui oxydent de nombreux substrats mais sont les seules à pouvoir oxyder les *p*-diphénols.

1.2.2. Le brunissement de la datte proprement dit

Dans les fruits, la plupart des PPO impliquées dans le brunissement sont des catéchol - oxydases et non des laccases, à l'exception de la pêche où la présence simultanée des deux enzymes a été rapportée (**Mayer** et **Harel**, 1979). L'activité crésolase des catécholoxydases a été mise en évidence dans quelques fruits mais elle est, généralement, plus faible que l'activité catécholase.

Dans les tissus non endommagés, les PPO ne sont pas activées à cause de leur localisation cellulaire dans des organites spéciaux mais la disparition des barrières

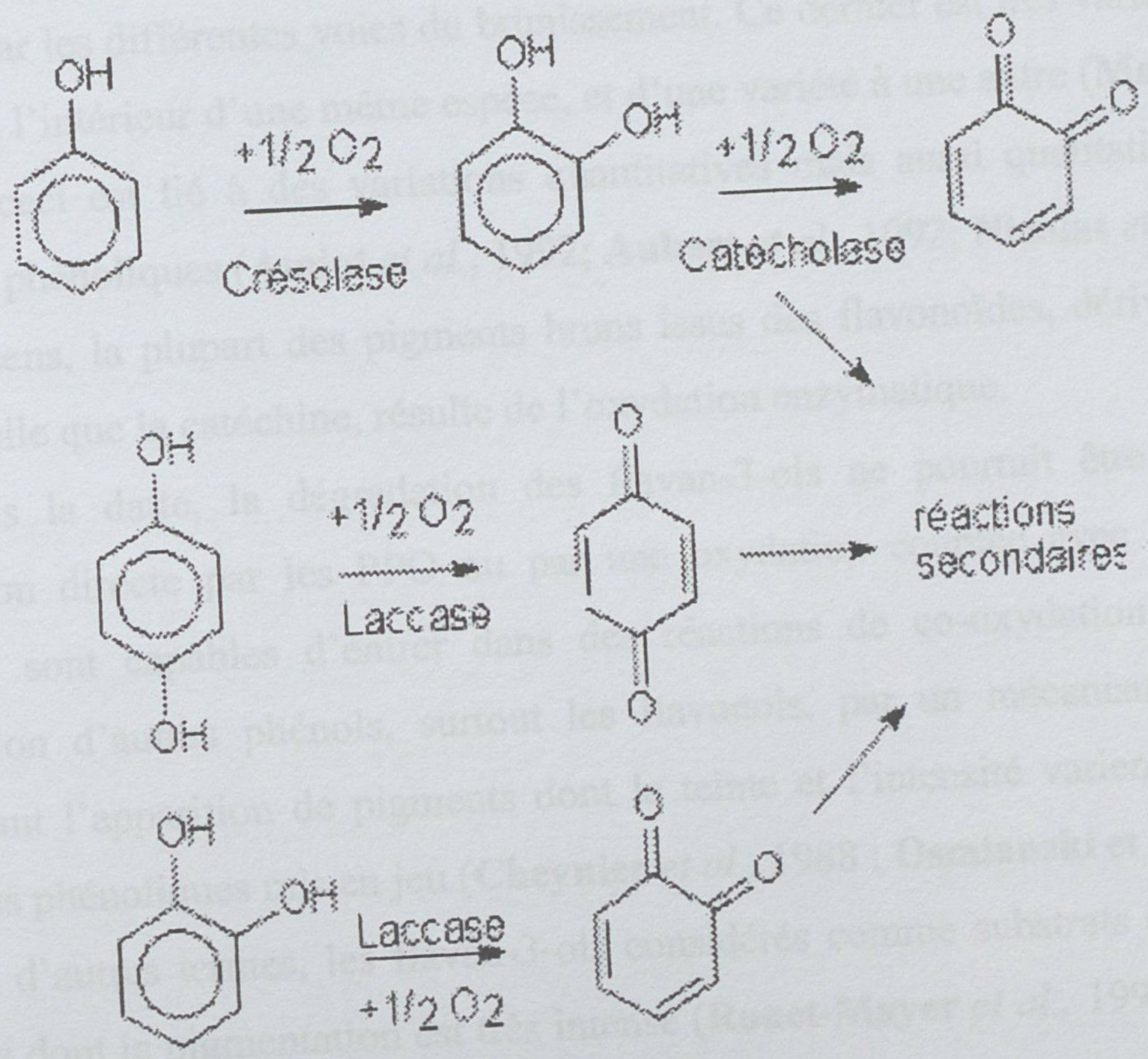


Figure 3.2 : Les différentes réactions catalysées par les PPO

membranaires au cours de la maturation du fruit permet le contact entre le substrat et l'enzyme.

Le brunissement de la datte dépend de l'interaction complexe entre les polyphénoloxydases et le contenu phénolique; ces enzymes catalysent le brunissement enzymatique par leur action sur les mono et diphénols du fruit (**Golbeck** et **Cammarata,** 1981).

Ainsi, la concentration des polyphénols diminue régulièrement durant la maturation et le stockage par les différentes voies du brunissement. Ce dernier est très variable d'une espèce à l'autre et à l'intérieur d'une même espèce, et d'une variété à une autre (**Macheix** *et al.*, 1990). A priori, ceci est lié à des variations quantitatives mais aussi qualitatives des teneurs en composés phénoliques (**Amiot** *et al.*, 1992; **Aubert** *et al.*, 1992; **Nicolas** et *al.*, 1994).
Dans ce sens, la plupart des pigments bruns issus des flavonoïdes, dérivés des flavan-3-ols (tanins) telle que la catéchine, résulte de l'oxydation enzymatique.

Dans la datte, la dégradation des flavan-3-ols ne pourrait être que le résultat de l'oxydation directe par les PPO ou par une oxydation couplée avec les *o*-quinones. Ces dernières sont capables d'entrer dans des réactions de co-oxydation responsables de la dégradation d'autres phénols, surtout les flavonols, par un mécanisme non enzymatique provoquant l'apparition de pigments dont la teinte et l'intensité varient selon la nature des composés phénoliques mis en jeu (**Cheynier** *et al.*, 1988 ; **Osmianski** et **Lee**,1990).

En d'autres termes, les flavan-3-ols considérés comme substrats des PPO donnent des quinones dont la pigmentation est très intense (**Rouet-Mayer** *et al.*, 1993). Ces dernières sont considérées comme des composés très actifs (**Pierpoint**, 1966; **Pierpoint**, 1969; **Singleton**, 1987). L'importance de ces réactions dépend de l'activité PPO et l'équilibre entre les tanins et les quinones. Seulement, il faut noter que l'activité PPO n'est pas responsable du brunissement en tant que tel, mais est liée à la qualité des phénols dégradés (**Amiot** *et al.*, 1992) bien que la quantité initiale des *o*-quinones formées, impliquées dans les réactions de co-oxydation, dépende de l'activité PPO et que la vitesse de la réaction enzymatique contribue à la pigmentation finale du fruit.

Par ailleurs, d'autres facteurs jouent un rôle important dans le brunissement, il s'agit de l'acide ascorbique et de l'acidité du milieu. Ainsi, la perte en vitamine C, qui favorise le brunissement, est provoquée par l'action de certaines oxydases (acide ascorbique-oxydase, peroxydase...) ou par l'intervention de l'acide ascorbique dans des réactions d'oxydation couplées avec les *o*-quinones.

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

La datte (*Phœnix dactylifera*, variété Deglet–nour), décrite précédemment, a été utilisée.

2.2. Méthodes

2.2.1. Extraction et caractérisation des polyphénoloxydases

L'extraction et la caractérisation des PPO sont réalisées selon les méthodes préconisées par **Goupy** *et al.* (1994).

2.2.1.1. Extraction

Toutes les opérations décrites ci-après ont été réalisées à basse température (4 °C).

L'extrait enzymatique est obtenu à partir de 6 dattes (environ 50 g de pulpe fraîche selon les stades de maturation) décongelées et dénoyautées. La pulpe est coupée en fragments puis broyée manuellement au mortier-pilon, pendant 3 min, en présence de 5 volumes de tampon phosphate, pH 7, 0,2 M contenant 30 mM d'acide ascorbique et 1 % de PVP. Le mélange est centrifugé pendant 30 min à 33000 g; le surnageant obtenu, filtré sur papier Whatman n° 4, représente l'extrait enzymatique.

2.2.1.2. Mesure des activités

Le mélange réactionnel est constitué de 0,5 ml d'extrait enzymatique, 2,45 ml de tampon phosphate pH 7 et de 50 µl de solution de catéchol (1,66 mM) utilisé comme substrat.

Le mélange réactionnel (3 ml) est placé dans un bain-marie à 30 °C. La lecture de l'absorbance à 390 nm se fait toutes les 30 secondes pendant 5 min (**Sachde** *et al.*, 1989).

La recherche de l'activité PPO et son dosage sont effectués en référence à une catéchol-oxydase commerciale lyophilisée (Merck) avec le catéchol comme standard.

L'absorbance à 390 nm est enregistrée en continu dès le démarrage de la réaction. La détermination de l'activité PPO est réalisée par la mesure de la vitesse initiale (V_i) qui est donnée par la pente de la tangente à l'origine.

Une unité (UI) PPO est définie comme étant la quantité d'enzyme qui provoque une augmentation de l'absorbance de 0,01 à 390 nm par min, dans les conditions expérimentales.

2.2.2. Conditions et effecteurs

2.2.2.1. Le pH

La détermination du pH optimal est effectuée en variant le pH du milieu réactionnel dans l'intervalle de pH 2 à 8.

2.2.2.2. La température

La détermination de la température optimale de l'activité PPO est obtenue en réalisant une série d'essais dans l'intervalle de températures 15 à 70 °C, dans les conditions opératoires citées précédemment.

2.2.2.3. L'intensité de la coloration

4 g de pulpe de dattes décongelées et dénoyautées sont coupés en fragments puis broyés manuellement au mortier-pilon, en présence d'eau chaude. La solution est refroidie puis ajustée à 200 ml avec de l'eau distillée.

Afin d'éliminer les substances (fibres, pectines) ayant des interférences avec l'intensité de la coloration, la suspension est clarifiée par ajout d'une solution d'acétate neutre de plomb à 10 %, jusqu'à ce que la précipitation cesse, suivie d'une filtration à sec. Le pH du filtrat est ajusté à 6,3 par addition d'une solution tampon phosphate 0,2 M.

1 ml de cet extrait est dilué à 1 % dans l'eau distillée. L'absorbance est mesurée à 270 nm (**Dowson** et **Aten**, 1963; **Arnaud**, 1970).

2.2.2.4. Les composés phénoliques solubles totaux

Les composés phénoliques solubles totaux sont déterminés par la méthode colorimétrique basée sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu proposée par **Singleton** et **Rossi** (1965), **Ribéreau-Gayon** (1970) et **Velioglu** *et al.*, (1998), avec quelques modifications.

A 200 µl de jus de datte clarifié sont ajoutés 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (préalablement dilué 10 fois avec de l'eau distillée). Après 5 min, 1,5 ml d'une solution de carbonate de sodium à 60 g/l sont ajoutés au mélange qui est agité au Vortex puis laissé à la température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 120 min.

La lecture de l'absorbance à 750 nm est effectuée par rapport à un témoin constitué d'eau distillée.

La teneur en composés phénoliques solubles totaux est donnée par rapport à une gamme étalon avec l'acide gallique comme standard; les résultats sont exprimés en mg d'Equivalent Acide Gallique par 100 g MF.

2.2.2.5. Les tanins condensés

La détermination des tanins condensés est réalisée selon la méthode colorimétrique de Folin-Denis décrite par **Joslyn** (1970).

1 ml de solution de datte clarifiée, 5 ml du réactif de Folin-Denis et 10 ml de solution saturée de carbonate de sodium sont mélangés. La suspension est complétée à 100 ml avec de

l'eau distillée puis est soumise à une agitation magnétique. Après 30 min, l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La teneur en tanins condensés est donnée par rapport à une gamme étalon avec l'acide tannique comme standard; les résultats sont exprimés en mg d'Equivalent Acide Tannique par 100 g de matière fraîche.

2.2.2.6. L'acide ascorbique

10 g de dattes décongelées et dénoyautées sont coupés en fragments puis broyés manuellement au mortier-pilon en présence de 20 ml d'eau distillée contenant 4 % d'acide oxalique. Le mélange est filtré sur papier Whatman n° 2 et le filtrat est complété jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance est mesurée à 270 nm.

La teneur en acide ascorbique est donnée par rapport à une gamme étalon avec l'acide ascorbique comme standard ; les résultats sont exprimés en mg d'acide ascorbique par 100 g de matière fraîche (**Loshner** *et al.*, 1990).

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Evaluation de l'activité PPO au cours de la maturation

L'activité PPO est présente dans la datte Deglet-nour aux différents stades de développement. Elle est de 0,22 UI/fruit au stade I puis augmente graduellement, à partir du stade II, pour atteindre une valeur de 2,52 UI/fruit au stade IV (**tableau 3.1**).

Une augmentation remarquable de l'activité PPO, du stade I au stade IV, soit environ 10 fois plus, est relevée.

Ceci peut être expliqué par la présence de formes solubles de PPO qui semblent augmenter avec le taux de maturité du fruit (**Macheix** *et al.*, 1990; **Marques** *et al.*, 1995). En effet, les PPO immatures sont liées aux membranes chloroplastiques alors que dans le fruit mûr presque toute l'activité est soluble grâce à la décompartimentation des plastes (**Ben Shalom** *et al.*, 1977).

Selon la littérature, les polyphénoloxydases sont responsables de l'oxydation enzymatique des polyphénols de la datte par leur action sur les mono et diphénols du fruit. Elles jouent un rôle important dans le brunissement du fruit durant la maturation et continuent par leur activité à contribuer d'une façon non négligeable à la modification des caractères organoleptiques durant le stockage (**Maier** *et al.* , 1964; **Al-Bekr**, 1972; **Golbeck** et **Cammarata**, 1981; **Mayer**, 1987; **Sachde** *et al.*, 1989; **Goupy** *et al.*, 1994; **Nicolas** et **Potus**, 1994).

Dans ce sens, **Hasegawa** et **Maier** (1980) confirment que les PPO de la datte Deglet-nour attaquent les *o*-dihydroxyphénols seulement; le catéchol étant un excellent substrat pour ces enzymes.

3.2. Conditions et effecteurs

3.2.1. Le pH

Il apparaît que les PPO sont très actives en milieu acide (pH 4,5 - 6) avec un pH optimum de 5,5 (**figure 3.3**).

Dans les fruits, l'activité optimale se situe, en général, dans une gamme de pH comprise entre 4 et 7. Pour les variétés de datte Barhi et Zahdi, le pH optimal d'activité et de stabilité est, respectivement, de 6 et 7 (**Sachde** *et al.*, 1989). Pour la PPO d'abricot, le pH optimal varie entre 4,4 et 6,6 (**Dijkstra** et **Walker**, 1991 ; **De Rigal**, 2001) alors qu'il est dans l'intervalle 4,5-6,0 pour celle de la pomme (**Marques** *et al.*, 1995; **De Rigal**, 2001).

Tableau 3.1 : Evaluation de l'activité PPO au cours de la maturation

Stades de maturation	V_i (µmoles min $^{-1}$ l^{-1})	Activité PPO (UI)	Activité PPO (UI/fruit)
I	7, 18	1, 3	0, 22
II	4, 62	0, 8	0, 13
III	46, 49	8, 5	1, 42
IV	82, 30	15, 1	2, 52

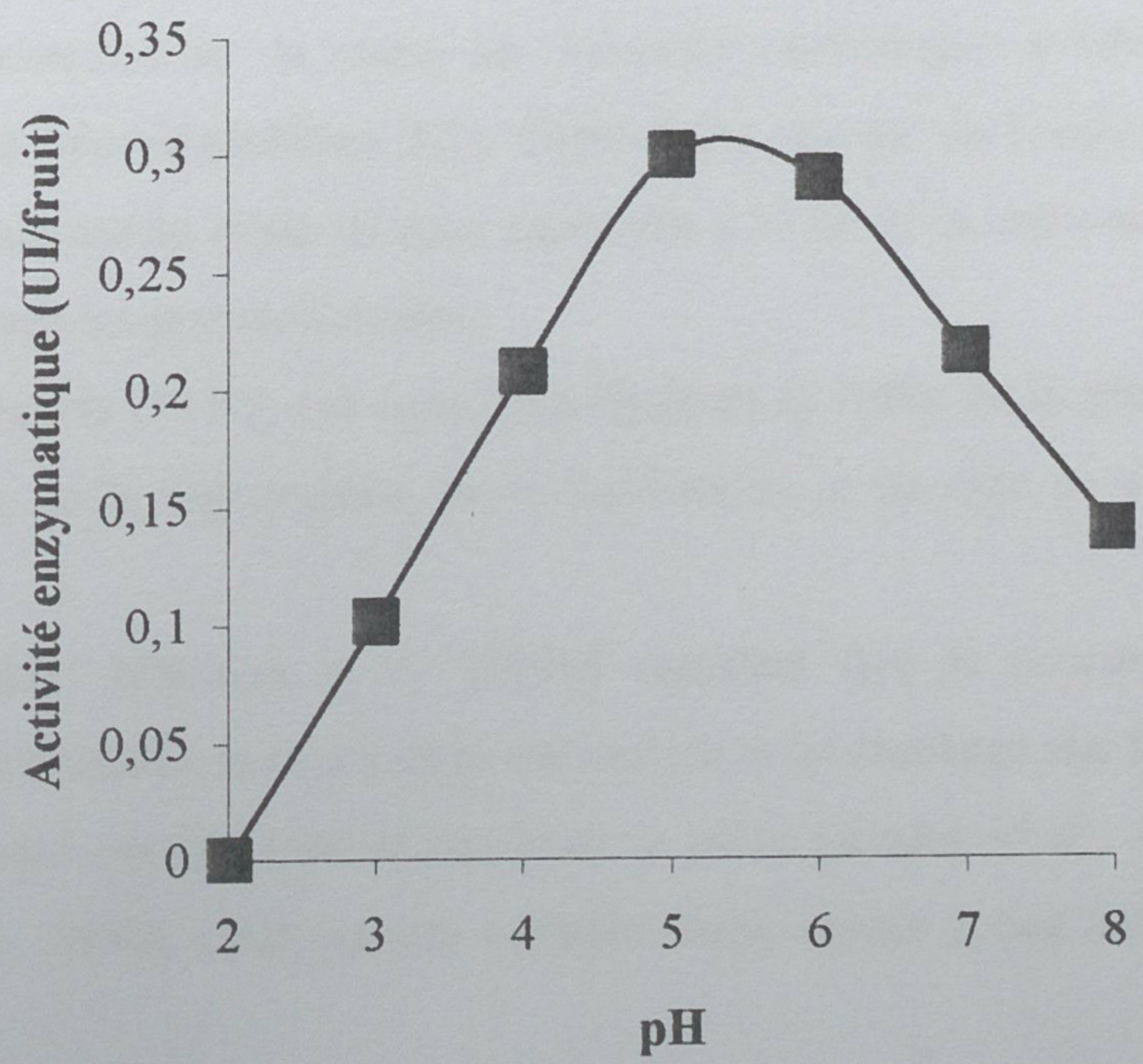


Figure 3.3: Effet du pH sur l'activité PPO

Il est à noter que la réaction enzymatique ne peut avoir lieu que s'il y a une ionisation convenable des acides aminés du site actif; cette ionisation dépend du pH du milieu réactionnel.

3.2.2. La température

Les PPO extraites des dattes présentent une température optimale d'activité de 35 °C (**figure 3.4**).

Une stabilité thermique est relevée (50 % d'activité à 60 °C); ce qui montre que l'enzyme reste, probablement, active durant le traitement après la récolte (**Maier** et **Metzler**, 1965).

Sachde *et al.* (1989) ont trouvé des valeurs similaires, que ce soit pour la température optimale d'activité (35 °C) ou pour la température où l'enzyme est complètement inactive (70 °C).

3.3. Autres facteurs influençant l'activité PPO

Le brunissement de la datte dépend de l'interaction complexe entre les PPO et le contenu phénolique, d'une part, à laquelle s'ajoutent d'autres facteurs qui jouent un rôle actif dans le brunissement, à savoir les tanins condensés, les caroténoïdes et l'acide ascorbique (**tableau 3.2**).

3.3.1. Les composés phénoliques solubles totaux

Une diminution de la teneur en composés phénoliques solubles totaux au cours de la maturation est relevée (**tableau 3.2**). Cette chute, qui est de l'ordre de 50 %, du stade I au stade II, est ralentie au stade III pour reprendre à la fin de la maturation au même rythme que celui relevé dans les premiers stades.

Selon **Harris** (1977), ces variations résultent de l'effet de la génétique, de la lumière, des précipitations, de la topographie, de la fertilisation et du type de sols, de la saison et de la maturité.

Cependant, **Macheix** *et al.* (1990) signalent que la concentration des polyphénols diminue régulièrement au cours de la maturation et du stockage des fruits par différentes voies du brunissement comme c'est le cas pour la poire (**Amiot** *et al.*, 1995) ou pour la pomme (**Burda** *et al.*, 1990). Ceci est très variable d'une espèce à une autre et d'une variété à une autre.

Dans ce sens, la chute de la teneur en composés phénoliques solubles totaux est, probablement, due à leur implication dans le processus de brunissement enzymatique par

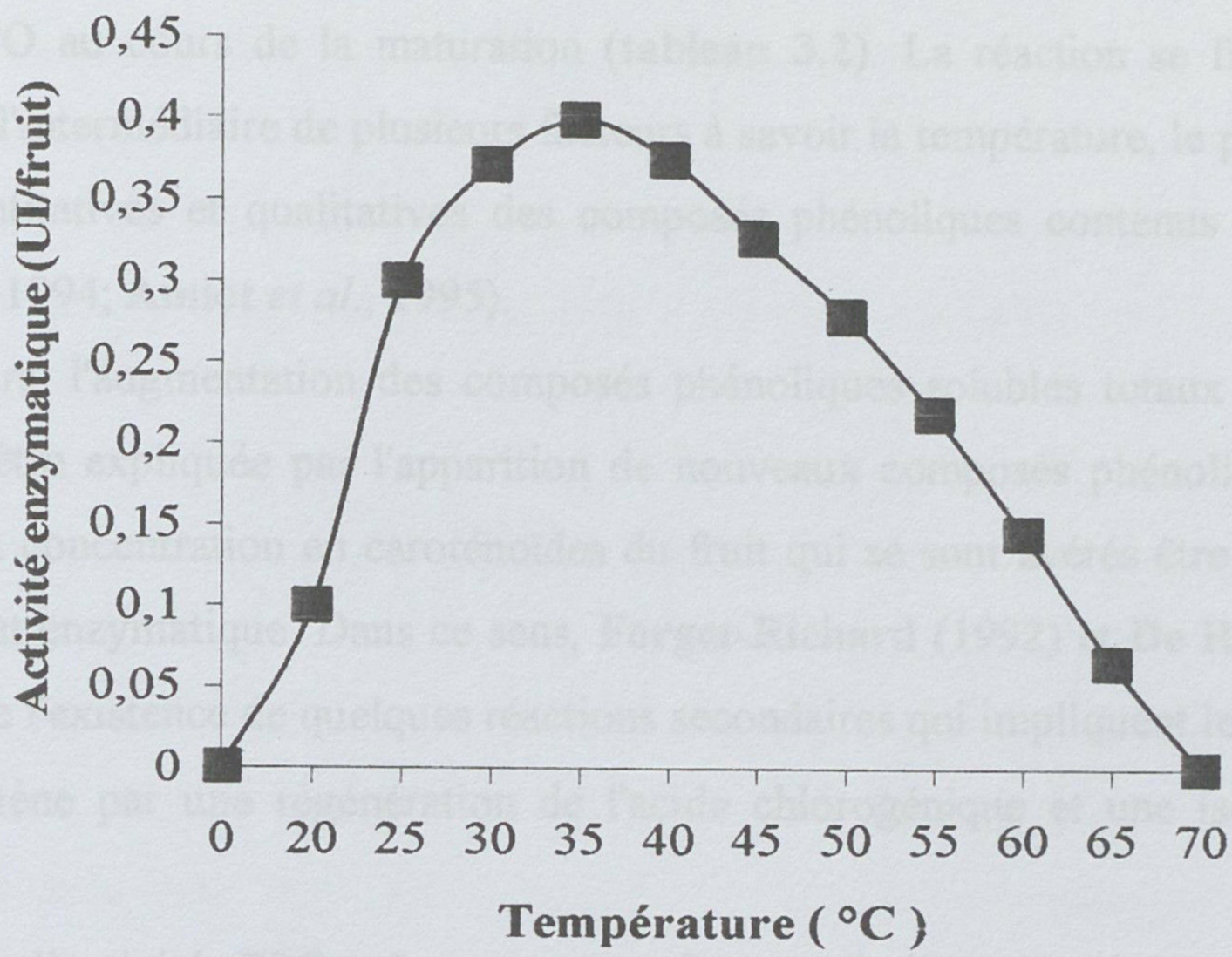


Figure 3.4: Effet de la température sur l'activité PPO

Tableau 3.2 : Evolution des teneurs en composés phénoliques solubles totaux, en tanins condensés, en caroténoïdes totaux, en vitamine C et évaluation de l'intensité de la coloration au cours de la maturation de la datte

Stades de maturation	**I**	**II**	**III**	**IV**
Composés phénoliques solubles totaux (mg Equivalent Acide Gallique/100 g MF)	24,2 ± 0,5	12,4 ± 0,4	15,6 ± 0,3	8,5 ± 0,4
Tanins condensés (mg Equivalent Acide Tannique/100 g MF)	5,0 ± 0,09	5,7 ± 0,08	6,9 ± 0,05	6,7 ± 0,05
Vitamine C (mg Acide Ascorbique/100 g MF)	7,2 ± 0,05	4,6 ± 0,04	3,3 ± 0,04	2,5 ± 0,05
Intensité de la coloration (A_{270})	0,060 ± 0,002	0,065 ± 0,001	0,072 ± 0,001	0,080 ± 0,002
Caroténoïdes totaux (µg/100 g MF)	128,6 ± 25,6	63,2 ± 8,9	130,4 ± 6,2	66,8 ±14,4

l'action des PPO au cours de la maturation (**tableau 3.2**). La réaction se fait en présence d'oxygène, par l'intermédiaire de plusieurs facteurs à savoir la température, le pH ainsi que les variations quantitatives et qualitatives des composés phénoliques contenus dans les fruits (**Nicolas** *et al.*, 1994; **Amiot** *et al.*, 1995).

Par ailleurs, l'augmentation des composés phénoliques solubles totaux du stade II au stade III peut être expliquée par l'apparition de nouveaux composés phénoliques en étroite relation avec la concentration en caroténoïdes du fruit qui se sont avérés être des inhibiteurs du brunissement enzymatique. Dans ce sens, **Forget-Richard** (1992) et **De Rigal** (2001) ont mis en évidence l'existence de quelques réactions secondaires qui impliquent les *o*-quinones et le trans-β-carotène par une régénération de l'acide chlorogénique et une isomérisation du carotène.

A priori, l'activité PPO n'est pas un facteur limitant du brunissement car la polymérisation oxydative induisant la formation des pigments bruns dépend de la nature et de la concentration des composées phénoliques présente.

En effet, selon **Maier** et **Metzler** (1964), les polyphénols solubles dans la datte verte sont la catéchine et l'acide dactylifèrique qui semblent être les meilleurs substrats des PPO de la datte comparés à l'acide chlorogénique qui est considéré comme étant celui des PPO des autres plantes (**Pendharkar** et **Nair**, 1974; **Hasegawa** et **Maier,** 1980).

Les composés phénoliques de la datte sont responsables du goût astringent du fruit qui est lié à la présence de tanins solubles. Ces composés sont impliqués dans le brunissement enzymatique et non enzymatique qui entraine des changements indésirables de l'apparence et de la qualité nutritionnelle de la datte.

3.3.2. Les tanins condensés

L'augmentation de la teneur en tanins condensés durant la maturation (**cf. tableau 3.2**) est due à la conversion des tanins solubles en tanins insolubles et à l'oxydation enzymatique des autres composés phénoliques par les PPO; ce qui explique la disparition de l'astringence de la datte plus ou moins prononcée relevée lors de la première phase de la maturation.

L'insolubilité des tanins pourrait être due à leur taille moléculaire élevée ou à leur interaction avec des fractions tissulaires insolubles telles que les celluloses, les pectines, les hémicelluloses et les protéines.

Ainsi, **Dowson** et **Aten** (1963) rapportent qu'une congélation rapide suivie d'un chauffage modéré des dattes Zahdi au stade Khalal provoque la disparition des tanins astringents par leur conversion en tanins insolubles, ce qui améliore l'apparence et le goût de

la datte. Ceci ne peut être expliqué que par les réactions enzymatiques qui se sont déroulées dans ces conditions.

Il est à noter que l'augmentation du goût sucré, au cours de la maturation, n'influence pas les paramètres de l'astringence alors que l'intensité maximale de l'amertume diminue (**Smith** *et al.*, 1996).

3.3.3. L'acide ascorbique

La datte Deglet-nour renferme une teneur en vitamine C de 2,5 mg/100g MF au stade IV (**cf. tableau 3.2**).

Cette teneur est plus faible que celles des variétés Sayer et Khadrawi qui sont, respectivement, de 17,5 mg/100g MF et 3,2 mg/100g MF (**Kanner** *et al.*, 1978).

Au cours de la maturation, une diminution de 65 % est enregistrée entre le stade vert et le stade mûr. Cette chute est, à peu près, du même ordre de grandeur lorsqu'elle est considérée d'un stade à un autre.

La littérature rapporte que la perte en vitamine C ou son oxydation est catalysée par diverses enzymes (acide ascorbique-oxydase, peroxydase...) en présence de certains phénols ou par l'intervention de l'acide ascorbique dans des réactions d'oxydation couplées avec les *o*-quinones; ceci pourrait expliquer son rôle dans le brunissement (**Salunkh**, 1973).

En effet, **Davidek** *et al.* (1990), signalent que l'acide ascorbique est l'un des composés du fruit qui affectent négativement la stabilité de certains phénols (tels que les anthocyanines) car l'oxydation de cette vitamine provoque leur décomposition rapide; ce qui conduit à la formation de produits bruns.

Par ailleurs, l'acide ascorbique serait capable de réduire les atomes de cuivre du site actif des PPO et conduire à une inactivation de leur activité (**De Rigal**, 2001).

Dans le même contexte, **Rouet-Mayer** *et al.*, (1993) confirment que la réduction des *o*-quinones par l'acide ascorbique induit la formation d'acide déshydro-ascorbique et la régénération des *o*-diphénols parentaux.

Enfin, il a été rapporté que la teneur en vitamine C diminue de la périphérie du fruit vers le centre et que les régions les plus colorées sont aussi les plus riches (**Ulrich**, 1952).

3.3.4. L'intensité de la coloration

L'intensité de la coloration progresse au cours de la maturation avec un même ordre de grandeur, d'un stade à un autre, pour atteindre une augmentation de 25 % entre le stade vert et le stade mûr (**cf. tableau 3.2**).

Il est à rappeler que l'uniformité de la couleur est considérée comme un facteur important pour assurer l'acceptabilité du fruit par le consommateur bien qu'un certain degré de brunissement soit désirable lors de la maturation des dattes (**Cheftel** et **Cheftel**, 1977, **Belarbi** *et al.*, 2003).

En plus, une différence de couleur des fruits cueillis au centre du régime et à la périphérie est notée. A priori, ceci ne peut être expliqué que par le temps d'exposition au soleil et à la température (**Al-Fawal**, 1962 ; **Hussein**, 1970).

D'ailleurs, la vitesse de pigmentation est très faible à 10 °C mais augmente rapidement à 32 °C; ce qui montre l'influence de la température sur l'évolution des paramètres physico-chimiques du fruit (**Hulme**, 1970).

3.4. Evolution des facteurs influençant l'activité PPO au cours du stockage

La datte Deglet-nour stockée pendant 6 mois à une température de 5 °C et à une humidité relative de 80 % montre des modifications notables des caractères organoleptiques. Celles-ci se manifestent par un changement de couleur, de saveur et de consistance.

En effet, à une diminution de la teneur en eau (soit 40 %) se conjugue une diminution du pH (de 6,9 au stade mûr à 5,1), de la teneur en composés phénoliques solubles totaux (soit 50 %) et des tanins condensés (soit 30 %) au bout du stockage.

La littérature rapporte que le brunissement, désiré à un certain degré dans la datte, se manifeste durant la maturation et le stockage par les voies enzymatiques et non enzymatiques et aboutit à l'apparition de flaveurs indésirables, à une perte en nutriments et à la formation de pigments bruns ((**Maier** et **Schiller** ; 1961 ; **Hodge**, 1967 ; **Al-Bekr**, 1972 ; **Labuza** et **Bolin**, 1972 ; **Goupy** *et al.*, 1994; **Nicolas** et **Potus**, 1994).

Les dattes, durant le stockage, subissent un changement de nature chimique et se détériorent lentement, ce qui conduit à la formation de nouveaux composés phénoliques et à la disparition de certains autres composés préexistants (**Maier** et **Metzler**, 1965).

Il est connu que, par leur activité, les PPO contribuent d'une façon non négligeable à la modification des caractères organoleptiques durant le stockage (**Maier** *et al.* , 1964; **Al-Bekr**, 1972; **Golbeck** et **Cammarata**, 1981; **Mayer**, 1987; **Sachde** *et al.*, 1989; **Goupy** *et al.*, 1994; **Nicolas** et **Potus**, 1994).

La diminution de la teneur en tanins condensés au cours du stockage peut être attribuée à leur oxydation par voie non enzymatique en polymères colorés, ce qui confirme leur rôle dans

le brunissement post-récolte (**Maier** et **Metzler**, 1965). Cette oxydation s'accentue lorsque la température de stockage augmente (**Matlak** et **Mann**, 1984).

A partir du 7ème mois de stockage, on peut s'attendre à un ralentissement de la chute de la teneur en composés phénoliques solubles totaux dû à l'inhibition de l'action des PPO par les produits de l'oxydation et par la diminution du pH (**Mohamed** et **Nezam El Din, 1985**).

CHAPITRE II : LES CAROTÉNOÏDES

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Généralités

Les caroténoïdes, pigments photosynthétiques accessoires, ont comme rôle majeur au niveau du tissu végétal d'absorber des photons lumineux pour les transférer à la chlorophylle lors du processus photosynthétique. Leur couleur dans les feuilles est masquée par la chlorophylle, mais à l'automne, cette dernière se désagrège et la couleur jaune-orange de ce type de pigment devient visible. Certains micro-organismes tels que les bactéries et les levures possèdent aussi la capacité de synthétiser les caroténoïdes (**Haard**, 1988). Les animaux, quant à eux, ne produisent pas ce type de pigment.

1.2. Classification des caroténoïdes

Les caroténoïdes appartiennent à une grande classe chimique appelée les terpènes, plus précisément au groupe des tétraterpènes (**Louisot**, 1974).

La structure de base des caroténoïdes est formée par l'enchaînement linéaire de huit unités isopréniques avec de nombreuses doubles liaisons conjuguées (**Goodwin**, 1952).

Les éléments isoprène terminaux peuvent former des cycles à l'intérieur desquels la position des doubles liaisons varie produisant des isomères structuraux tels que l'α et le β-carotène, la zéaxanthine et la lutéine (**Isler**, 1971).

Il est à noter que la présence de nombreuses doubles liaisons est la cause principale de l'instabilité chimique qui caractérise ces pigments, généralement stables dans leur environnement naturel. Les caroténoïdes sont facilement détruits et deviennent incolores sous l'action de la lumière, de l'oxygène, des acides ou des températures élevées (**Liaaen-Jensen**, 1971).

Ces polyènes, insaturés, peuvent être plus ou moins oxygénés, ce caractère permet de les classer en deux groupes:

- les caroténoïdes hydrocarburés
- les caroténoïdes oxygénés.

1.2.1. Les caroténoïdes hydrocarburés

Ce sont des hydrocarbures polyéniques, de formule générale $C_{40}H_{56}$, appelés carotènes. Ces carotènes peuvent être considérés comme la structure de base et tous les autres caroténoïdes en dérivent par cyclisation, déshydrogénation et oxydation (**Newman**, 1972).

Les principaux représentants de ce groupe sont les β-carotène, connus comme précurseurs de la vitamine A et, à moindre degré, l'α-carotène. Cette activité est essentielle pour la vie humaine (**Olson**, 1989).

2.2.2. Les caroténoïdes oxygénés

Les caroténoïdes oxygénés appelés aussi xanthophylles possèdent, de plus, par rapport aux carotènes, des atomes d'oxygène (groupes cétoniques et groupes hydroxyles) (**Liaaen-Jensen** et **Storebakken**, 1990). Ces xanthophylles sont initialement des produits d'hydroxylation des carotènes; c'est le cas de la zéaxanthine et de la lutéine.

A titre d'exemple, la **figure 3.5** donne les formules chimiques de quelques caroténoïdes.

1.3. Les caroténoïdes de la datte

Les pigments caroténoïdes sont responsables de la couleur rouge, orange ou jaune de nombreux fruits et légumes.

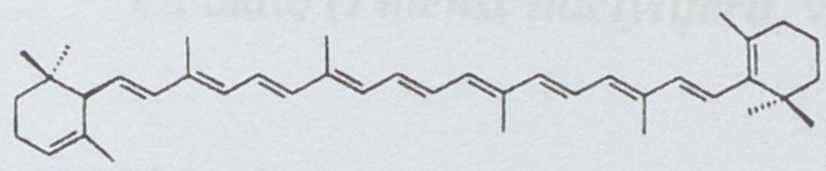
Les études actuelles tendent à identifier le contenu en caroténoïdes de chaque aliment avec un intérêt à la présence ou à l'absence d'activité provitamine tout en indiquant la valeur de l'aliment comme source d'activité antioxydante.

Hart et **Scott** (1995) ont estimé les teneurs en caroténoïdes de huit fruits consommés en Grande Bretagne. Les teneurs fluctuent entre 17 et 2263 µg/100g MF, les plus faibles pour les fraises et les plus élevées pour les mandarines. Ces auteurs considèrent la datte, comparée à d'autres fruits, comme une bonne source de caroténoïdes.

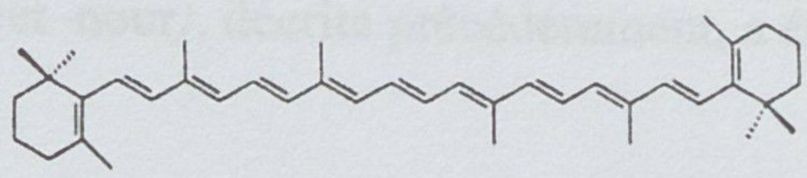
Les rares travaux concernant les caroténoïdes de la datte indiquent des teneurs qui fluctuent beaucoup ((**Gross** *et al.*, 1983; **Al-Farsi** *et al.*, 2005; **Boudries** *et al.*, 2007).

Dans ce sens, il a été rapporté que la teneur en caroténoïdes des fruits est affectée par plusieurs facteurs tels que la variété, le stade de maturité, le climat, les conditions écologiques ou la région géographique de production comme elle varie en fonction des pratiques culturales, des traitements et du stockage ((**Rother**, 1979; **Gross**, 1987; **Rodriguez-Amaya**, 1993).

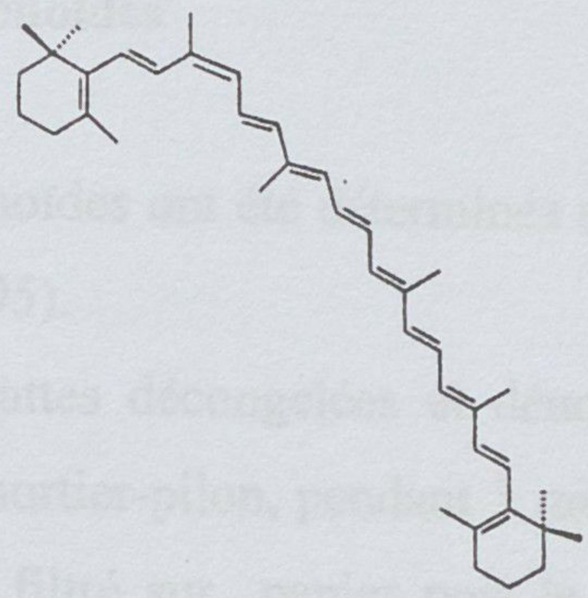
α-carotène



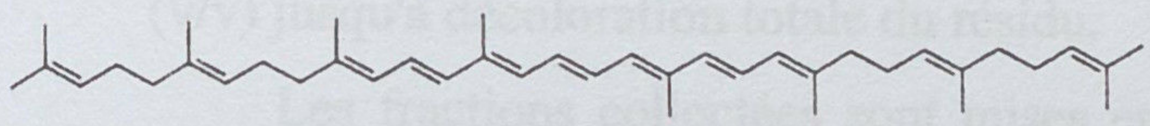
β-carotène



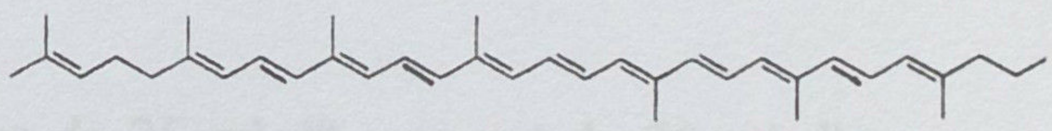
9-cis-β-carotène



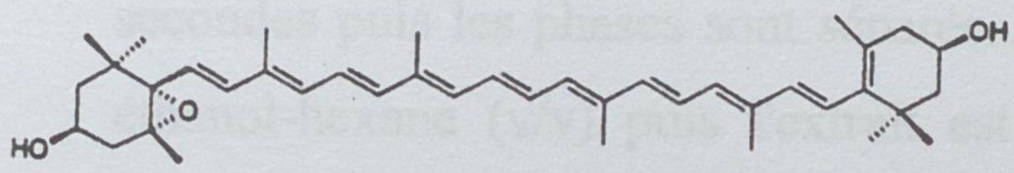
ξ-Carotène



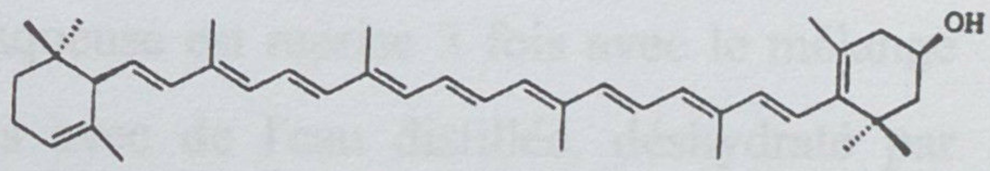
Lycopène



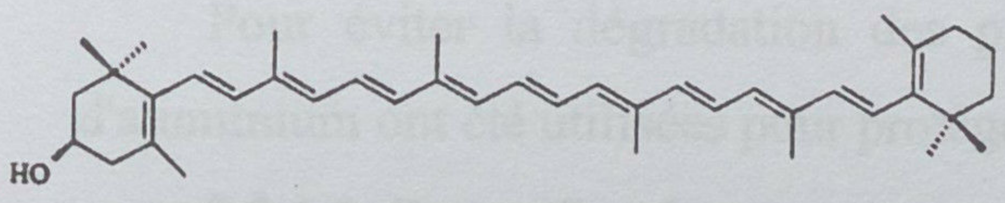
Antheraxanthine



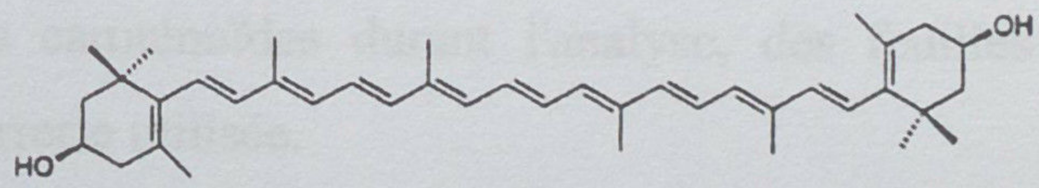
α-Cryptoxanthine



β-Cryptoxanthine



Zéaxanthine



Lutéine

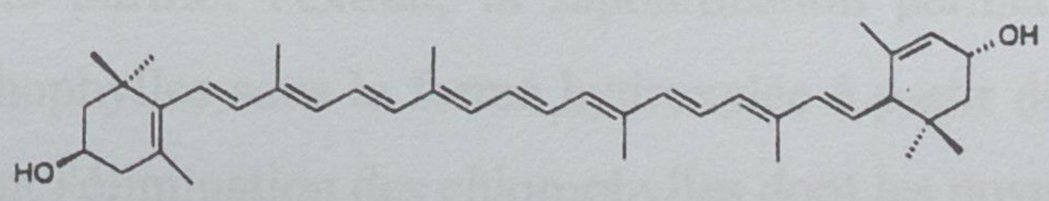


Figure 3.5 : Formules chimiques de quelques caroténoïdes

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

La datte (*Phœnix dactylifera*, variété Deglet–nour), décrite précédemment, a été utilisée.

2.2. Méthodes

2.2.1. Dosage des caroténoïdes

2.2.1.1. Extraction

Les pigments caroténoïdes ont été déterminés selon la méthode préconisée par **Wilberg** et **Rodriguez-Amaya** (1995).

25 g de pulpe de dattes décongelées et dénoyautées sont coupés en fragments puis broyés manuellement au mortier-pilon, pendant 3 min, en présence d'eau distillée ou de NaCl (100 g/l). L'ensemble est filtré sur papier puis le résidu et le filtrat subissent l'extraction séparément. Ces deux phases sont épuisées 3 fois avec 40 ml du mélange éthanol-hexane (v/v) jusqu'à décoloration totale du résidu.

Les fractions collectées sont mises en présence de 25 ml d'hexane et de 20 ml d'eau distillée dans une ampoule à décanter. L'ensemble est soumis à une agitation pendant 30 à 60 secondes puis les phases sont séparées. La phase aqueuse est reprise 3 fois avec le mélange éthanol-hexane (v/v) puis l'extrait est lavé 3 fois avec de l'eau distillée, déshydraté par filtration sur du sulfate de sodium anhydre puis évaporé sous vide (40 °C).

Pour éviter la dégradation des pigments caroténoïdes durant l'analyse, des feuilles d'aluminium ont été utilisées pour protéger la verrerie utilisée.

2.2.1.2. Saponification

Dans le but de purifier l'extrait, la saponification permet l'élimination des cires et l'obtention des xanthophylles sous la forme hydroxylée à partir de leurs esters d'acides gras; elle permet également l'élimination des chlorophylles dont les noyaux tétrapyrols perturbent la détermination par spectrophotométrie des caroténoïdes.

Elle consiste en l'ajout à l'extrait d'un volume égal de KOH à 10 % dans le méthanol. Après chauffage pendant 5 min, le mélange est rapidement mis dans de la glace pilée. Après saponification, l'extrait est lavé à l'hexane puis le volume est ajusté à 25 ml avec de l'hexane.

2.2.1.3. Mesure et calcul de la concentration

La teneur en caroténoïdes est déterminée par la mesure de l'absorbance à 450 nm dans un spectrophotomètre de type Jenway 6105.

La concentration en caroténoïdes est calculée à partir de la formule suivante:

$$X\ (\mu g / g) = \frac{A \times Y\ (ml) \times 10^{6}}{A^{1\%} \times 100 \times M}$$

avec:

A : absorbance à 450 nm

X : concentration en caroténoïdes

Y : volume de l'extrait

$A^{1\%}$: coefficient d'extinction moyen du mélange de caroténoïdes à 1 %, soit 2500 (**Britton**, 1995).

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Evolution des caroténoïdes totaux au cours de la maturation

Une diminution de la teneur en caroténoïdes totaux, au cours des deux premiers stades de la maturation, est relevée (**cf. tableau 3.2**). Cette chute, qui est de l'ordre de 50 % entre le stade I et le stade II, est stoppée au stade III, où l'on enregistre une augmentation suivie d'une rechute, du même ordre de grandeur, à la fin de la maturation. **Boudries** *et al.* (2007), au même titre que **Gross** *et al.* (1983), attribuent cette diminution, probablement due à la dégradation de ces caroténoïdes, à celle de la teneur en eau de la datte au cours de la maturation. Cependant, **Boudries** *et al.* (2007) ont relevé l'augmentation de la teneur en caroténoïdes totaux au stade III puis sa chute au stade mûr.

Dans ce sens, il est connu que la dégradation des pigments est un phénomène naturel lors du jaunissement des feuilles et de la maturation des fruits. Certains pigments disparaissent et sont remplacés par d'autres; l'essentiel est que le rapport pigments / protéines soit constant pour que le système granaire de la cellule reste organisé (**Levasseur** *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les résultats obtenus (soit 66, 8 µg / 100 g MF au stade mûr)) sont confirmés par les travaux de **Boudries** *et al.* (2007) qui ont déterminé la composition en caroténoïdes totaux de trois variétés de dattes algériennes Deglet-nour, Hamraia et Tantebouchet durant les trois derniers stades de maturation. Au stade mûr, la teneur en caroténoïdes totaux est de 61,7 ; 32,6 et 37,3 µg / 100 g MF, respectivement, pour les dattes Deglet-nour, Tantebouchet et Hamraia.

Ces teneurs sont très faibles par rapport à celles rapportées par **Gross** *et al.* (1983) et par **Al-Farsi** *et al.* (2005). En effet, **Gross** *et al.* (1983) ont quantifié les caroténoïdes de deux variétés de dattes molles Hayani et Barhi et une variété demi-molle Deglet-nour d'Israël. Le contenu en caroténoïdes totaux dans le fruit mûr est compris entre 1000 et 1200 µg/100g MF.

Au cours de la maturation, des pertes dans les teneurs en caroténoïdes ont été observées chez les variétés Hayani et Deglet-nour. Ceci pourrait être dû à la chute de la teneur en eau plutôt qu'au brunissement graduel du fruit mûr (**Gross** *et al.*, 1983). Bien que le brunissement soit prépondérant au cours des derniers stades de maturation, ces auteurs estiment qu'il n'a pas d'effet sur la stabilité des caroténoïdes.

Pour **Al-Farsi** *et al.* (2005), les quantités de caroténoïdes évaluées, sur des dattes d'Oman, sont encore plus élevées, soient entre 1310 et 3030 µg/100g MF pour les variétés Fard, Khassab et Khalas.

Parmi les caroténoïdes identifiés, la lutéine représente 93 % des caroténoïdes totaux de la datte Deglet-nour d'Algérie (**Boudries** *et al.*, 2007) et 50 % de ceux de la datte Deglet-nour d'Israël (**Gross** *et al.*, 1983).

La teneur élevée en lutéine, supérieure à la moitié de celle des caroténoïdes totaux, montre que la lutéine est la plus stable des xanthophylles (**Chichester** et **McFeeters**, 1971).

Il est connu que la lutéine, qui est la xanthophylle jaune, se trouve sur toutes les feuilles vertes. Elle a une grande importance sur le plan nutritif et on la trouve dans le sang et les tissus humains, y compris dans la région de la rétine où elle sert d'antioxydant et absorbe la lumière bleue de forte puissance, protégeant de ce fait les bâtonnets et les cônes rétiniens sensibles.

QUATRIÈME PARTIE

LES ARÔMES DE LA DATTE

CHAPITRE I : LES ARÔMES DE LA DATTE

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Généralités

Les composés odorants, que l'on désigne sous le nom d'arômes, sont des molécules organiques de faible masse moléculaire (PM < 400) dont la tension de vapeur à pression atmosphérique, à la température ambiante, est suffisamment élevée pour que ces molécules se trouvent à l'état vapeur (**Multon**, 1992).

C'est une sensation perçue par l'organe olfactif par voie rétronasale lors de la dégustation d'un aliment ou d'une boisson (**Villanua** et **Villanua** ,1978).

Les arômes ne représentent qu'une part infime du produit alimentaire à l'intérieur duquel ils se trouvent, soit 50 ppm environ dans les fruits et légumes, 0,1 à 1 % dans les herbes aromatiques et de 1 à 20 % dans les épices.

L'arôme constitue un facteur important et indispensable pour la fabrication des produits alimentaires : il confère à ces derniers une odeur et une flaveur caractéristiques.

Il joue un rôle essentiel dans la relation avec l'aliment en agissant directement sur la capacité d'assimilation des autres ingrédients : prédisposition de l'individu à sa prise d'aliment, sécrétion de salive ou de suc gastrique ; il joue donc un rôle nutritionnel.

Il est obligatoirement lié à l'aliment et soumis aux mêmes traitements. Il ne peut être donc considéré comme figé mais évolue très rapidement (**Jaubert**, 1980; **Linden** et **Lorient**, 1994).

Selon le mode de fabrication, les arômes se présentent sous forme d'extraits naturels, d'origine essentiellement végétale ou de produits de synthèse ou de réaction résultant de traitements enzymatiques, microbiologiques ou physiques (**Linden** et **Lorient**, 1994).

Un arôme naturel est constitué de plusieurs centaines de composés volatils. Les composants volatils les plus importants dans la perception de la flaveur des aliments sont: les hydrocarbures, les alcools, les composés carbonylés, les esters et les lactones, les phénols et les hétérocycles.

Selon la littérature, et aux différents stades de l'évolution du fruit, la formation des arômes se fait selon plusieurs processus dont les principaux ont fait l'objet d'hypothèses.

Ainsi, pour **Crouzet** *et al.* (1984), les composants de l'arôme se forment selon trois mécanismes: biosynthèse, réactions enzymatiques directes et réactions enzymatiques indirectes.

Les voies qui conduisent à la formation des composés volatils de l'arôme sont principalement : les métabolismes des acides gras, des acides aminés et des glucides.

Le métabolisme des acides gras concerne deux réactions : la biosynthèse *de novo* et la β-oxydation qui est une réaction de dégradation.

Ces deux voies conduisent à des méthylcétones, à des alcools secondaires (pentanol 2, heptanol 2), à des esters et à des lactones.

Le métabolisme des acides aminés conduit à la formation d'aldéhydes, d'alcools, d'esters et de γ-lactones. Ces réactions interviennent surtout au cours du mûrissement du fruit.

Dans un fruit arrivé à maturité ou intact, les enzymes et les précurseurs ont des localisations cellulaires telles qu'on ne perçoit aucune émission volatile. Au cours des processus de vieillissement des tissus, il y a des dégradations plus ou moins importantes des structures, les enzymes et leurs substrats peuvent alors être en contact et il y a formation de composants d'arôme.

Certaines enzymes participent à la formation de composants de l'arôme, c'est le cas par exemple de la lipoxygénase qui par son action sur les acides gras polyinsaturés permet la formation d'aldéhydes aliphatiques (hexanal, nonenal,...).

Les réactions enzymatiques indirectes concernent les réactions de fermentation et les réactions chimiques et enzymatiques. Au cours de la fermentation, on observe la formation de composés volatils à partir de précurseurs : acides aminés, caroténoïdes, acides gras insaturés. Cette voie conduit à la formation d'aldéhydes (**Sanderson** et **Graham**, 1973).

L'hypothèse de **Drawert** (1975) propose de faire la distinction entre les arômes spécifiques et non spécifiques, et entre les arômes primaires, c'est à dire originels et les arômes secondaires.

Les arômes primaires sont ceux du fruit intact, tandis que les arômes secondaires sont ceux qui se forment lors de la destruction des cellules à cause des processus enzymatiques.

Pour pouvoir mieux comprendre la composition des arômes déterminant la qualité d'un fruit, une série biologique a été établie (**figure 4.1**).

Par ailleurs, l'acide linoléique, après dégradation par la lipoxygénase, donne des aldéhydes et des acides aldéhydiques. Il est à noter qu'à partir de la biosynthèse *de novo* qui résume le métabolisme des acides gras, on obtient des aldéhydes saturés et insaturés, des alcools, des cétones et des lactones.

La troisième hypothèse, énoncée par **Vernin** et **Vernin** (1982), indique que deux voies principales sont à l'origine de la formation des composés volatils dans l'aliment :

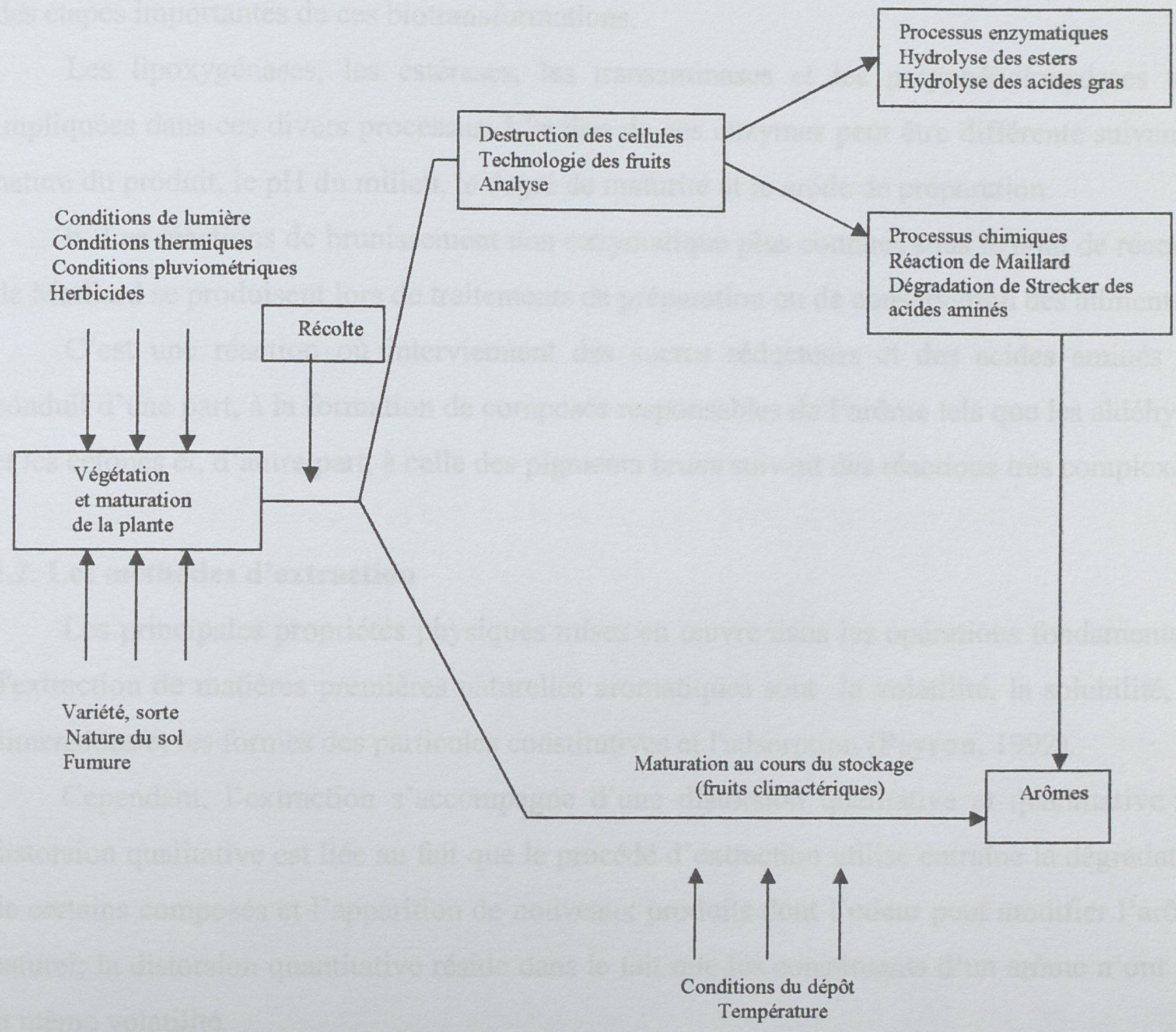


Figure 4.1 : Série biologique des arômes (**Drawert,** 1975)

a- Les processus enzymatiques et de fermentation qui interviennent dans les aliments à l'état naturel.

Ces processus impliquent les métabolismes de biosynthèse des composés volatils dans les végétaux qui sont généralement complexes.

L'oxydation des lipides, le mécanisme de formation des alcools et des aldéhydes sont des étapes importantes de ces biotransformations.

Les lipoxygénases, les estérases, les transaminases et les polyphénoloxydases sont impliquées dans ces divers processus. L'action de ces enzymes peut être différente suivant la nature du produit, le pH du milieu, le degré de maturité et le mode de préparation.

b- Les réactions de brunissement non enzymatique plus connues sous le nom de réaction de Maillard se produisent lors de traitements de préparation ou de conservation des aliments.

C'est une réaction où interviennent des sucres réducteurs et des acides aminés qui conduit d'une part, à la formation de composés responsables de l'arôme tels que les aldéhydes et les cétones et, d'autre part, à celle des pigments bruns suivant des réactions très complexes.

1.2. Les méthodes d'extraction

Les principales propriétés physiques mises en œuvre dans les opérations fondamentales d'extraction de matières premières naturelles aromatiques sont la volatilité, la solubilité, les dimensions et les formes des particules constitutives et l'adsorption (**Peyron**, 1992).

Cependant, l'extraction s'accompagne d'une distorsion qualitative et quantitative : la distorsion qualitative est liée au fait que le procédé d'extraction utilisé entraîne la dégradation de certains composés et l'apparition de nouveaux produits dont l'odeur peut modifier l'arôme naturel; la distorsion quantitative réside dans le fait que les constituants d'un arôme n'ont pas la même volatilité.

Les méthodes, très variées, dépendent non seulement des caractéristiques physico-chimiques des composés volatils (tension de vapeur, volatilité, solubilité, polarité ...) mais aussi, de la nature de l'aliment, de sa composition et de sa consistance.

Chacune de ces méthodes donne une image différente de la composition de l'arôme de l'aliment. Parmi celles-ci, les principales sont l'analyse des vapeurs de l'espace de tête « Headspace », l'extraction par solvant et l'entraînement à la vapeur.

1.2.1. Analyse des vapeurs de l'espace de tête

C'est la méthode la moins critiquable et la plus simple, du moins dans son principe, qui consiste à aspirer, avec une seringue, les gaz ou vapeurs qui se trouvent autour de l'aliment et

qui sont responsables de la perception olfactive directe à travers les fosses nasales. Ces vapeurs sont directement injectées dans le chromatographe (**Villanua** et **Villanua**, 1978).

Cette technique permet d'éviter les manipulations et l'introduction d'artefacts dus à l'emploi de solvants, mais il existe aussi des contraintes de la CPG qui interdisent de dépasser un certain volume. Si de plus grands volumes de gaz à prélever sont désirés, il faut prévoir une préconcentration avant l'injection.

1.2.2. Extraction par solvant

C'est une méthode classique dans l'étude des arômes et qui repose sur le pouvoir d'extraction des solvants organiques vis à vis des molécules responsables de l'arôme.

Cette méthode est réservée aux cas où le milieu à extraire est exempt de lipides ou de substances à caractère lipophile.

Les critères principaux qui doivent prévaloir dans le choix d'un bon solvant sont : un point d'ébullition bas pour éviter les pertes de composés volatils lors d'une concentration ultérieure de la solution organique diluée, pas de sélectivité vis à vis de la plupart des constituants de l'arôme afin d'en extraire la plus grande partie et une forte volatilité afin d'être facilement éliminé.

L'utilisation de cette méthode n'est pas exempte de critiques en raison des risques de formation d'artefacts difficiles à éliminer. En outre, l'extrait obtenu après concentration est inutilisable en analyse sensorielle à cause de la toxicité ou de l'odeur trop intense du solvant. Il est, donc, difficile d'en estimer la représentativité avant d'en continuer l'analyse (**Abbott** *et al.*, 1993).

Il existe une autre technique d'extraction par solvant, celle utilisant les fluides supercritiques ou subcritiques, en particulier le dioxyde de carbone, solvant bon marché et dépourvu de toxicité. L'extraction s'effectue à basse température, ce qui limite les risques de dénaturation thermique.

Cette technique nécessite un appareillage fort coûteux limitant considérablement son développement à l'échelle du laboratoire (**Multon**, 1992).

1.2.3. Entraînement à la vapeur

Lorsque les méthodes de l' « Headspace » et de l'extraction par solvant ne peuvent pas être utilisées, faute de garantir un taux d'extraction suffisant (cas des produits riches en lipides), il faut recourir à la technique de l'entraînement à la vapeur. Cette dernière peut être utilisée soit à pression atmosphérique, soit à pression réduite pour diminuer l'effet thermique sur le substrat.

En dépit d'avantages apparents (efficacité de l'extraction, condensation des produits volatils dans l'eau), l'entraînement à la vapeur à pression atmosphérique est une méthode brutale susceptible d'introduire de nombreux artefacts (formation de produits indésirables, et, selon le pH, destruction de produits labiles, en particulier certaines esters et lactones).

Son utilisation est surtout réservée à l'obtention d'huiles essentielles à partir des épices et des herbes aromatiques ou médicinales (**Richard** et **Multon**, 1992); la technique à pression réduite, plus délicate à mettre en œuvre mais particulièrement bien adaptée si l'on désire extraire des composés assez volatils d'un milieu liquide riche en eau, lui est préférée.

Dans ce sens, un appareil basé sur l'entraînement à la vapeur dans lequel l'énergie thermique est apportée par les microondes existe. L'intérêt de ce dispositif réside dans sa rapidité d'extraction. Cette méthode a été conçue pour l'extraction rapide d'huiles essentielles et de composés volatils. La libération rapide et complète des arômes de plantes séchées, de fleurs et de concentrés de fruits est due à l'effet conjugué des micro-ondes et du vide pulsé.

Cette technologie permet de réduire les temps d'extraction de cinq à dix fois par rapport aux techniques classiques de distillation. De plus, les dégradations thermiques sont mieux maîtrisées (**Lemoine,** 1996).

1.2.4. Distillation Extraction Simultanées

La combinaison de l'entraînement à la vapeur et de l'extraction par solvant a donné naissance à une nouvelle méthode : la distillation - extraction simultanées (SDE) décrite par **Likens** et **Nickerson** (1964).

Cette dernière permet de rassembler les avantages de l'un et l'autre et de réduire leurs inconvénients. Son utilisation est simple, elle offre un rendement d'extraction qui peut atteindre 95 %. De plus, la quantité de solvant utilisée est faible et l'extraction ne dure en moyenne qu'une à trois heures.

Cependant, l'échantillon est toujours exposé à des températures élevées d'où le risque d'apparition d'artefacts et de modifications de la nature des composés volatils.

Afin de pallier à ces contraintes, il suffit de travailler à pression réduite après ajustement du pH de la phase aqueuse au voisinage de 6,5.

La SDE décrite par **Likens** et **Nickerson** (1964) a été utilisée par de nombreux auteurs après modification. A titre indicatif, nous citons quelques exemples d'utilisation :

- extraction des composés volatils de l'arôme de champignons sauvages comestibles pendant 1 heure en utilisant le pentane comme solvant (**Audouin** *et al.*, 1989).
- extraction des composés volatils de l'arôme de l'abricot et de l'arôme de prune à l'hexane pendant 3 heures (**Gomez** et **Ledbetter**, 1997).

- extraction des composés volatils de l'arôme de deux variétés de mangue pendant 2 heures en utilisant comme solvant le mélange pentane - éther (1:1) (**Engel** et **Tressl**, 1983).
- extraction des composés volatils de l'arôme de banane en utilisant le dichlorométhane (**Cosio** et **Rene**, 1996, b).
- extraction de l'huile essentielle de deux agrumes hybrides (*Citrus clementina* × *Citrus sinensis*) à l'aide du mélange pentane - diéthyl éther pendant 3 heures (**Starrantino**, 1997).

Quelle que soit la méthode utilisée, il faut noter que les méthodes d'extraction sont elles-mêmes susceptibles d'induire la formation de composés volatils, notamment lorsque l'on travaille sur des substrats où des réactions enzymatiques (action des lipoxygénases sur les fruits) ou thermiques (réaction de Maillard) sont possibles (**Adda** et **Richard**, 1992).

Pour ce qui est des méthodes de concentration, après extraction, on obtient un extrait aromatique dilué, qui doit être concentré avant son injection dans le chromatographe.

Selon les moyens disponibles, la méthode d'extraction utilisée et les conditions expérimentales, on choisit l'une des méthodes de concentration suivantes :

- décantation suivie d'une congélation à - 20 °C. L'extrait est ensuite concentré sous balayage d'azote jusqu'au volume voulu (2 ml). Cette technique a été appliquée après extraction (SDE) à la pulpe de banane (**Cosio** et **Rene**, 1996, a).
- séchage sur sulfate de magnésium ou de sodium anhydre et concentration de l'extrait jusqu'à un volume de 0,3 ml en utilisant une colonne Vigreux. Cette technique a été utilisée après SDE appliquée à deux variétés de mangue (**Engel** et **Tressl**, 1983).
- congélation de l'extrait dilué à -40 °C pour éliminer l'eau résiduelle et concentration à l'aide d'une colonne Vigreux sous pression réduite (200 mm Hg) jusqu'à un volume final de 0,3 à 0,4 ml. Cette technique a été utilisée après une SDE appliquée à l'abricot et à la prune (**Gomez** et **Ledbetter**, 1997).
- séchage de l'extrait récupéré sur sulfate de magnésium anhydre et concentration sous courant d'azote jusqu'à 100 µl environ. Cette technique a été utilisée après une SDE appliquée à des champignons sauvages comestibles (**Audouin** *et al.*, 1989) .
- distillation à basse température sous vide poussé de l'extrait jusqu'à 0,5 ml: technique utilisée au *Feronia limonia* après une distillation à l'aide d'un appareil de type Soxhlet (**Mac Leod** et **Pieris,** 1983).

En ce qui concerne les bilans d'extraction, les rendements varient selon la méthode d'extraction utilisée. Dans le cas où cette dernière fait intervenir un solvant, le rendement varie selon le type de solvant utilisé.

Selon **Schultz** *et al.* (1977), le rendement obtenu lors d'extractions par la SDE est supérieur à celui obtenu par les autres méthodes.

Une fois la fraction volatile d'une matière végétale est isolée, l'identification et la caractérisation de ses constituants se fait par plusieurs techniques dont les plus utilisées sont la CPG et le couplage CG-SM.

La CPG est l'une des méthodes les plus appropriées à la séparation et à l'identification des divers constituants même à l'état de traces.

La CPG est actuellement employée dans les laboratoires et dans les industries aussi bien pour l'analyse qualitative, que pour l'isolement et la purification des substances d'un mélange gazeux ou liquide. C'est une méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges éventuellement très complexes dont les constituants peuvent différer par leur nature et leur volatilité.

Par ailleurs, le développement important de la spectrométrie de masse dans l'identification des constituants des arômes a été rendu possible grâce au couplage de la CPG directement à la SM. Grâce à ce couplage, il n'est plus nécessaire de recourir à l'isolement des constituants purs par chromatographie préparative, et simultanément il devenait possible d'obtenir un spectre de masse interprétable pour des quantités de substances allant du microgramme au nanogramme (**Bricout**, 1992).

Ce couple CG - SM est généralement équipé d'un ordinateur qui analyse les spectres avec ceux contenus dans une bibliothèque construite à partir de composés de référence analysés sur le même appareil. La confirmation des identifications est basée sur l'identité des indices de rétention (**Audouin** *et al.*, 1989).

Cette méthode permet l'identification des constituants des arômes, leur dosage spécifique, et même dans certains cas la vérification de leur origine grâce à leur teneur en carbone 13.

Toutefois, si cette technique est extrêmement performante, elle doit être mise en application dans un environnement bien adapté. L'extraction des arômes, en particulier, doit faire l'objet de soins attentifs pour éviter la formation d'artefacts et la pollution par des impuretés provenant des solvants ou du matériel plastique.

La CPG est une méthode utilisée pour des analyses de routine alors que le couple CG - SM est de plus en plus utilisé surtout pour des analyses précises ainsi que pour confirmer les résultats obtenus par CPG.

1.3. Les arômes de la datte

La composition aromatique des dattes rapportée par la littérature est succincte. Les études ont concerné l'analyse des stérols (**Kikuchi** et **Miki**, 1978), l'isolation de dérivés des stérols (**Fernandez** *et al.,* 1983) et les composés aromatiques (**Cardona** *et al.*, 1985). Les travaux relatifs aux composés volatils de la datte ont concerné les changements de la teneur en aldéhydes volatils totaux au cours du stockage de la datte Deglet-nour (**Norman** et **Fouse**, 1977), les composés volatils de la variété irakienne Zahdi (**Jaddou** *et al.*, 1984) et les composés volatils de la datte cultivée à Elche (**Torres** *et al.*, 1995).

Dans l'étude des composés de l'arôme de la variété irakienne Zahdi, la méthode d'isolement des composés volatils par la distillation sous pression réduite à basse température (10 à 15 mm Hg à 45 °C) a été retenue par **Jaddou** *et al.*,(1984).

Pour cela, une hydrodistillation suivie d'une concentration du distillat par la technique de congélation a été réalisée. Le concentré aqueux est alcalinisé avec la soude et subit 3 extractions successives à l'éther. L'éther résiduel est éliminé par évaporation et la fraction non acide qui renferme les composés volatils est ainsi obtenue; cette dernière est acidifiée à pH=3 et subit une triple extraction par l'éther dont le résultat est la fraction constituée d'acides gras libres.

L'identification des deux fractions a été effectuée par chromatographie gaz liquide avec des colonnes appropriées; 38 composés volatils ont été détectés dans la datte Zahdi. Ces composés sont représentés par 6 hydrocarbures saturés, 2 hydrocarbures insaturés, 3 aldéhydes, 6 cétones, 3 phénols et 11 acides gras libres.

Dans une autre étude des composés volatils de la datte, **Torres** *et al.* (1995) ont utilisé la méthode « Headspace ». Les variétés de dattes utilisées sont cultivées à Elche (Espagne). L'identification des composés volatils a été réalisée par chromatographie phase gazeuse (CPG) et par le couplage chromatographie phase gazeuse - spectrométrie de masse (CG-SM); 60 composés, dont quelques uns à l'état de traces, ont été détectés.

Les composés principaux sont l'éthanol, l'isobutanol et l'isopentanol. Ceux de moindre importance sont les aldéhydes tels que l'acétaldéhyde, l'hexanal, l'octanal, le nonanal et le décanal ; les cétones tels que le 2- butanone, le 2- pentanone, le 2- heptanone et les esters tels que le méthyl et l'éthyl acétate sont également présents.

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

La datte (*Phœnix dactylifera*, variété Deglet–nour), décrite précédemment, a été utilisée. L'analyse de l'arôme a été réalisée sur la datte au stade mûr.

2.2. Méthodes

2.2.1. Distillation Extraction Simultanées

La SDE est réalisée dans l'appareil de **Likens** et **Nickerson** (1964) (**figure 4.2**). Cet appareil est constitué d'un ballon **A** de 250 ml (mélange à extraire), d'un ballon **B** de 100 ml (solvant), d'un extracteur **C** (chambre de mélange) et d'un décanteur. Une calotte chauffante, un bain-marie, un réfrigérant et un condenseur complètent le dispositif expérimental.

2.2.1.1. Préparation de l'échantillon

20 g de pulpe de dattes décongelées et dénoyautées sont coupés en fragments puis broyés manuellement au mortier-pilon en présence de 100 ml de phosphate de sodium 0,1 M à pH 6,5 (**Schultz** *et al.*, 1977). Après agitation, le mélange est transvasé dans le ballon **A** dans lequel sont ajoutés l'étalon interne, le valérate d'éthyle dilué au 1/1000, et quelques gouttes d'huile de silicone comme anti-mousse.

2.2.1.2. Fonctionnement de l'appareil

Le solvant (50 ml) est placé dans le ballon **B** puis les deux ballons sont reliés à l'appareil. Ces derniers sont portés à ébullition, les flux de vapeur se rencontrent dans la chambre de mélange **C** avant d'être condensés sur le réfrigérant. De par leur densité différente, l'eau et le solvant se séparent dans la portion en **U** de l'appareil. Le solvant, chargé de composés organiques entraînés par la vapeur d'eau, retourne au ballon **B**, et l'eau au ballon **A**.

Ainsi, ce dispositif permet, à partir de quantités réduites de solvant, de réaliser simultanément un entraînement à la vapeur et une extraction (**Adda** et **Richard**, 1992). Le temps nécessaire pour l'extraction est d'environ 1 h.

2.2.2.1.3. Extraction

Trois solvants ont été utilisés successivement afin de tirer partie de la sélectivité de chacun pour extraire le plus de composés aromatiques (**Adda** et **Richard**, 1992). Il s'agit du chlorométhane, de l'éther diéthylique et de l'hexane.

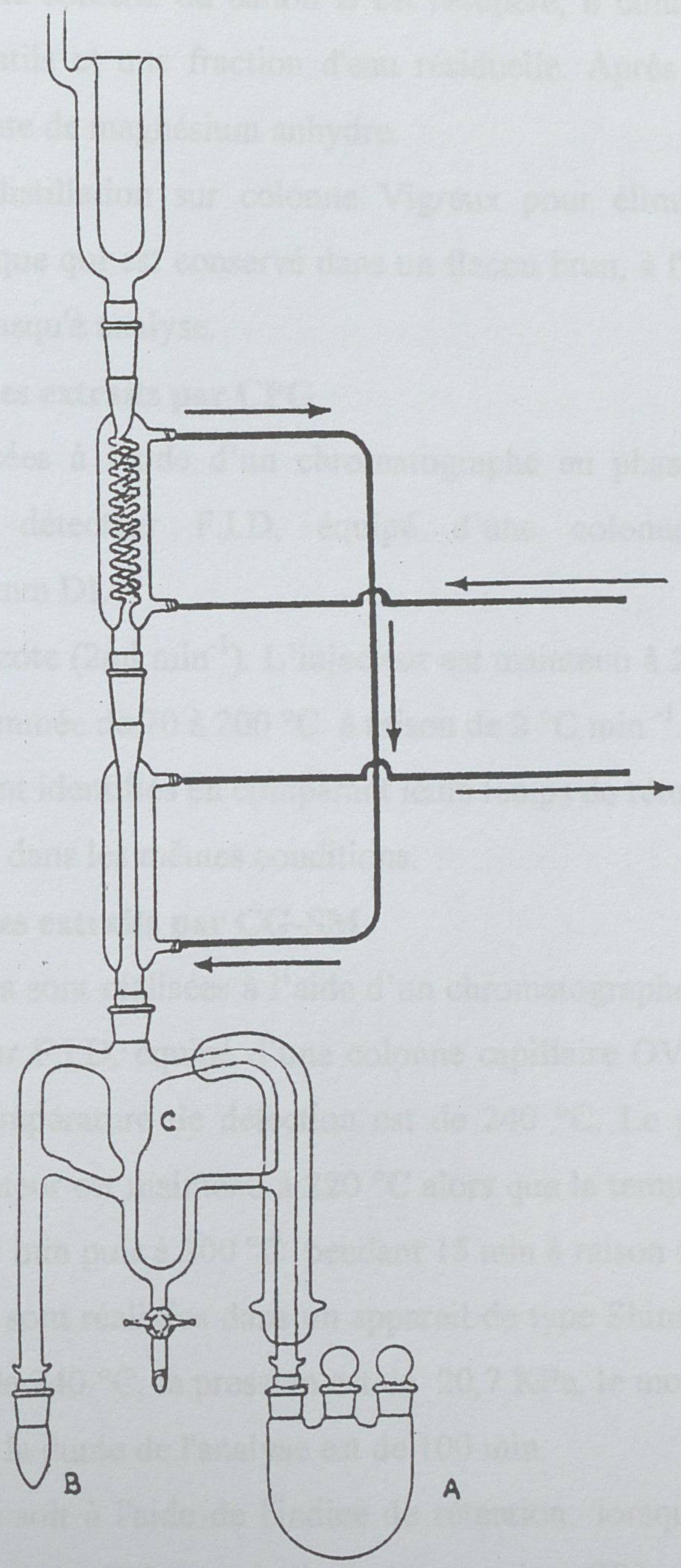


Figure 4.2: Appareil d'extraction de **Likens** et **Nickerson** (1964)

2.2.2.1.4. Concentration

A la fin de l'extraction, le contenu du ballon **B** est récupéré; il contient le solvant qui renferme les constituants volatils et une fraction d'eau résiduelle. Après décantation, cette dernière est séchée sur du sulfate de magnésium anhydre.

La fraction subit une distillation sur colonne Vigreux pour éliminer le solvant et l'obtention de l'extrait aromatique qui est conservé dans un flacon brun, à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur jusqu'à analyse.

2.2.2. Analyse qualitative des extraits par CPG

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Fisons Instruments GC 9000), à détecteur F.I.D, équipé d'une colonne capillaire DB_1 (méthylsilicone), 30 m x 0,25 mm DI.

Le gaz vecteur est de l'azote (2ml min^{-1}). L'injecteur est maintenu à 240 °C alors que la température du four est programmée de 70 à 200 °C à raison de 2 °C min^{-1}.

Les composés volatils sont identifiés en comparant leurs temps de rétention par rapport à ceux des produits purs injectés dans les mêmes conditions.

2.2.3. Analyse qualitative des extraits par CG-SM

Pour la CPG, les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Shimadzu GC 17), à détecteur F.I.D, équipé d'une colonne capillaire OV_1 (méthylsilicone), 25 m x 0,25 mm DI. . La température de détection est de 240 °C. Le gaz vecteur est de l'hélium (1,7ml min^{-1}). L'injecteur est maintenu à 220 °C alors que la température du four est programmée à 30 °C pendant 5 min puis à 200 °C pendant 15 min à raison de 2 °C min^{-1}.

Pour la SM, les analyses sont réalisées dans un appareil de type Shimadzu QP 5000. La température de l'interface est de 240 °C, la pression est de 20,7 KPa, le mode de détection est de type impact électronique et la durée de l'analyse est de 100 min.

Le composé est identifié soit à l'aide de l'indice de rétention lorsque les étalons sont disponibles, soit en recourant à la SM. Les indices de rétention (IR) sont obtenus après conversion des temps de rétention (TR) (**Jennings** et **Shibamoto**, 1980) alors que l'ordinateur donne le spectre de masse de chaque molécule et un certain nombre de suggestions par comparaison avec ceux d'une bibliothèque de référence (NIST12 LIB. et NIST62 LIB.).

Pour l'identification d'un composé donné, la suggestion proposée est retenue soit en la comparant à la littérature, soit en retenant celle dont la probabilité est la plus élevée.

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Bilans d'extractions de la SDE

Les bilans d'extractions de la SDE selon le solvant utilisé sont donnés dans le **tableau 4.1.**

Si le rendement le plus élevé est obtenu avec l'hexane, ce qui était attendu sachant que ce solvant est apolaire et non sélectif, il semble que sa température d'ébullition élevée (69 °C) n'influe pas sur le rendement mais plutôt sur la nature des composés extraits. En effet, elle peut provoquer la destruction des constituants à poids moléculaire faible et les composés hydrosolubles (acétate d'éthyle et éthanol forment des azéotropes avec l'hexane) (**Schultz** *et al.*, 1977). Néanmoins, ces auteurs considèrent l'hexane comme un excellent solvant pour la plupart des composés volatils.

Par ailleurs, bien que l'éther éthylique et le dichlorométhane soient des solvants moyennement polaires, le rendement obtenu par le premier est supérieur à celui du second ; ce qui est probablement dû à la différence des températures d'ébullition (34,5 contre 40 °C).

3.2. Analyse qualitative des extraits par CPG

3.2.1. Chromatogrammes des étalons

Les chromatogrammes des étalons ont été établis dans les conditions opératoires déjà décrites. Les étalons injectés et leurs temps de rétention (TR) en min sont indiqués dans le **tableau 4.2.**

L'identification des constituants des extraits aromatiques est réalisée par comparaison aux indices de rétention des étalons (IR-Std).

3.2.2. Extrait aromatique au dichlorométhane

5 composés volatils ont été détectés dont 3 ont été identifiés (**tableau 4.3**). Le nombre de composés extraits est faible, ces derniers font partie des composés oxygénés dont l'acétaldéhyde est le composé prépondérant.

Ce résultat peut être expliqué, a priori, par la densité du dichlorométhane supérieure à celle de l'eau, ce qui a provoqué le retour du solvant vers le ballon A, entraînant par la même les composés volatils.

Tableau 4.1. Rendements d'extraction selon les solvants

Poids de l'extrait (g)	Dichlorométhane	Ether éthylique	Hexane
	0,04	0,12	0,17
Rendement (%)	0,20	0,62	0,85

Tableau 4.2. Temps de rétention des étalons identifiés par CPG

Composé	TR	Composé	TR
Pentanol	2,36	Nonanal	16,87
Acétaldéhyde	2,76	δ terpinéol	19,69
Heptanol	6,25	Décanal	20,47
α pinène	8,51	Dodécane	22,57
β pinène	10,19	Hexadécane	22,79
Octanal	11,08	Geraniol	22,91
Carène	11,87	Acétate de terpényl	26,49
α terpinène	12,13	Acétate de géranyl	27,86
Valérate d'éthyl *	13,23	Heptadécane	32,23
δ terpinène	14,07	Nérolidol	33,60
α terpinéol	14,88	Octadécane	36,18
1- octanol	15,43	Benzaldéhyde	36,46
Linalool	16,03	-	-

*: étalon interne

Tableau 4.3. Composés volatils identifiés par extraction au dichlorométhane

Composé	% d'aire	TR	Concentration (g / kg de MS)
Acétaldéhyde	3,52	2,78	0,10
Octanal	0,76	11,25	0,02
1- octanol	2,75	15,42	0,08
Non identifiés	92,97		

3.2.3. Extrait aromatique à l'éther

Sur 58 composés volatils détectés, 14 ont été identifiés (**tableau 4.4**). Parmi ces composés, 15 % sont des hydrocarbures et 85 % sont des composés oxygénés dont l'acétaldehyde est le mieux représenté, soit 34,5 %.

3.2.4. Extrait aromatique à l'hexane

Sur 44 composés volatils détectés, 15 ont été identifiés (**tableau 4.5**). Les composés volatils identifiés se répartissent en 46,6 % d'hydrocarbures et 53,3 % de composés oxygénés dont l'acétaldéhyde est le composé majoritaire, soit 64,42 %.

3.2.5. Résultats de la SDE

Selon les solvants, les teneurs comparées en composés volatils montrent que les composés oxygénés constituent 100, 85 et 53,3 %, et les hydrocarbures 0, 15 et 46,6 %, respectivement pour le dichlorométhane, l'éther éthylique et l'hexane.

Bien que le nombre de composés extraits par l'éther éthylique soit plus élevé que celui extrait par l'hexane (58 contre 44) (effet de la température), les concentrations de ces composés sont plus importantes pour ce dernier.

La combinaison des résultats obtenus avec les trois solvants par CPG donne une idée sur les composés volatils susceptibles de constituer le bouquet aromatique de la datte Deglet-nour **(tableau 4.6).**

A priori, la note fruitée de la datte Deglet-nour serait essentiellement due aux composés oxygénés alors que les hydrocarbures n'y participent que faiblement. Il ressort que l'acétaldéhyde est le composé le plus important puisqu'il représente jusqu'à 64,42 % des composés oxygénés.

Dans ce sens, **Norman** et **Fouse** (1977) rapportent que l'acétaldéhyde représente environ 73 % des composés carbonylés volatils totaux de la datte Deglet-nour de Californie.

Il est à noter que ce composé oxygéné n'est pas spécifique à la datte puisqu'il fait partie de la composition aromatique d'autres fruits tels que la pomme (**Flath** *et al.*, 1969), la fraise, la banane et l'orange (**Nursten** et **Williams**, 1967) mais à des concentrations moindres.

Il faut signaler que les hydrocarbures aliphatiques identifiés n'ont probablement qu'un rôle secondaire dans l'arôme de la datte. Dans ce sens, **Buttery** (1961) suggère que les hydrocarbures saturés peuvent être produits à partir des lipides.

De leur côté, les alcools ne jouent qu'un rôle mineur dans l'arôme, ils dérivent de la décomposition des groupements carboxylés des acides gras insaturés, d'une part, et des composés carbonylés présents, d'autre part.

Tableau 4.4. Composés volatils identifiés par extraction à l'éther

Composé	% d'aire	TR	Concentration (g / kg de MS)
Pentanol	10,53	2,50	0,28
Acétaldéhyde	30,58	2,81	0,88
Octanal	0,16	11,90	$4,6 .10^{-3}$
1- octanol	0,036	15,17	$1,03. 10^{-3}$
Linalool	0,06	16,31	$1,73. 10^{-3}$
Nonanal	0,08	17,18	$1,18. 10^{-3}$
δ terpinéol	0,018	19,82	$0,51. 10^{-3}$
Décanal	0,31	20,71	$0,89. 10^{-3}$
Hexadécane	0,55	23,05	0,015
Acétate de terpényl	0,84	26,45	0,024
Acétate de géranyl	0,036	27,62	$1,03. 10^{-3}$
Heptadécane	0,12	32,29	$3,4. 10^{-3}$
Nérolidol	0,08	33,08	$1,18. 10^{-3}$
Non identifiés	56,6		

Tableau 4.5. Composés volatils identifiés par extraction à l'hexane

Composé	% d'aire	TR	Concentration (g / kg de MS)
Acétaldéhyde	64,42	2,89	1,86
α pinène	0,04	8,93	$1,15 .10^{-3}$
β pinène	0,04	10,28	$1,15 .10^{-3}$
Octanal	0,04	11,27	$1,15 .10^{-3}$
Carène	0,15	11,85	$4,33. 10^{-3}$
α terpinène	0,06	12,13	$1,73. 10^{-3}$
δ terpinène	0,03	13,88	$0,86. 10^{-3}$
α terpinéol	0,19	14,58	$5,4. 10^{-3}$
Linalol	0,35	16,59	0,010
Nonanal	1,91	16,94	0,055
δ terpinéol	0,09	19,73	$2,59. 10^{-3}$
Décanal	0,89	20,07	0,025
Hexadécane	0,25	22,89	$7,2. 10^{-3}$
Nerolidol	0,20	33,67	$5,7. 10^{-3}$
Octadécane	0,06	35,20	$1,73. 10^{-3}$
Non identifiés	31,12		

Tableau 4.6. Composition aromatique par CPG de la datte Deglet-nour

Composés oxygénés	Hydrocarbures
Acétaldéhyde	α pinène
Octanal	β pinène
Décanal	α terpinène
Nonanal	δ terpinène
Nerolidol	Hexadécane
Linalool	Octadécane
Pentanol	Carène
Nérolidol	
α terpinéol	
δ terpinéol	
Acétate de terpényl	
Acétate de géranyl	

3.3. Analyse de l'extrait aromatique par CG-SM

L'analyse de l'extrait aromatique, obtenu par extraction à l'hexane, par CG-SM a donné des spectres de masse assez riches en constituants volatils (**tableau 4.7**).

Tableau 4.7. Les composés volatils de l'arôme de la datte Deglet-nour identifiés par CPG et par CG –SM

Composés	TR	Identification
Hydrocarbures saturés		
Tridécane	23,633	IR, SM
Décane	16,508	IR, SM
Décane-5 méthyl	20,358	SM
Décane diméthyl	20,008	SM
Dodécane	20,900	IR, SM
Heptane méthyl (Isomères)	3,350	SM
Hexane-3 éthyl-2 méthyl	3,525	SM
Hexadécane	37,292	IR-Std, SM
Octane	4,258	SM
Octane-3 méthyl	7,408	SM
Octane diméthyl	9,250	SM
Diphényl propane	53,192	SM
Tétradécane	24,783	IR, SM
Tridécane	27,383	IR, SM
Undécane- 4 méthyl	27,642	SM
Undécane	30,600	SM
Nonane diméthyl (Isomères)	18,058	SM
Nonane	5,377	SM
Nonane-3 méthyl	11,350	SM
Octadécane-6 méthyl	28,400	SM
Cyclohexane diméthyl	3,608	SM
Cyclohexane triméthyl	5,233	SM
Cyclooctane	8,283	SM
Cyclopentane-1 éthyl-3 méthyl	3,742	SM
Cyclopropane-1 butyl-2 méthyl	14,325	SM
Octadécane	35,21	IR-Std

Hydrocarbures insaturés		
Benzène diméthyl (Isomères)	6,267	SM
Benzène propyl	11,042	SM
Décène-1	10,542	SM
Décène-4 méthyl-6	14,750	SM
Hexène-3 diméthyl	4,800	SM
Heptène-1 éthyl-3	7,792	SM
Hexadécène	65,957	SM
Heptadécène	85,150	SM
Heptène-3 propyl-4	8,658	SM
Ethylbenzène	5,567	SM
Benzènacétaldéhyde	19,092	SM
Octène-2	3,817	SM
Octadécène	75,992	SM
Pentène-1	5,033	SM
Téradécène	24,783	SM
Undécène-4 méthyl	8,392	SM
Undécène-2	7,150	SM
Nonène-4	5,875	SM
Acénaphtène	44,792	SM
Azulène	26,292	SM
Biphenyl-3-3 diméthyl	52,767	SM
Hydroperoxyde-1 méthyl-1-1phenyl éthyl	13,675	SM
Isopropyl biphényl	57,200	SM
1 H-indène	31,500	SM
Fluorène	50,733	SM
Toluène	3,067	SM
Naphtalène diméthyl (isomères)	42,258	SM
Naphtalène-1méthyl	34,025	SM
Naphtalène-1 éthyl	40,267	SM
α-Pinène	8,93	IR-Std
β-Pinène	10,28	IR-Std

α-Terpinène	12,13	IR-Std
δ-Terpinène	13,88	IR-Std
Carène	11,85	IR-Std
Aldéhydes		
Acétaldéhyde	2,89	IR-Std
Octanal	11,27	IR-Std
Nonanal	16,94	IR-Std
Décanal	20,07	IR-Std
Alcools		
Butanol-1	3,217	SM
Cycloheptane méthanol	9,875	SM
Hexanol-1 méthyl-2	12,675	SM
Décanol-1 chloro-10	22,150	SM
Farnesol	96,667	SM
Pentanol-1	5,567	SM
Tridécanol	21,608	SM
1- Octanol	15,17	IR-Std
Linalool	16,59	IR-Std
Nérolidol	33,67	IR-Std
α-Terpinéol	14,58	IR-Std
δ-Terpinéol	19,73	IR-Std
Nonadécanol	10,31	SM
Pentanol	2,5	IR-Std
Cétones		
Cyclopentanone	8,075	SM
Décen-5 one-5	3,467	SM
Hexanone-3 diméthyl-3-4	19,900	SM
Esters		
Acétate de géranyl	27,62	IR-Std
Acétate de terpényl	26,45	IR-Std
Phénols		
Eugénol	49,425	IR, SM

Acides		
Phényl valérique	15,017	SM
Octadécanoïque	18,225	SM

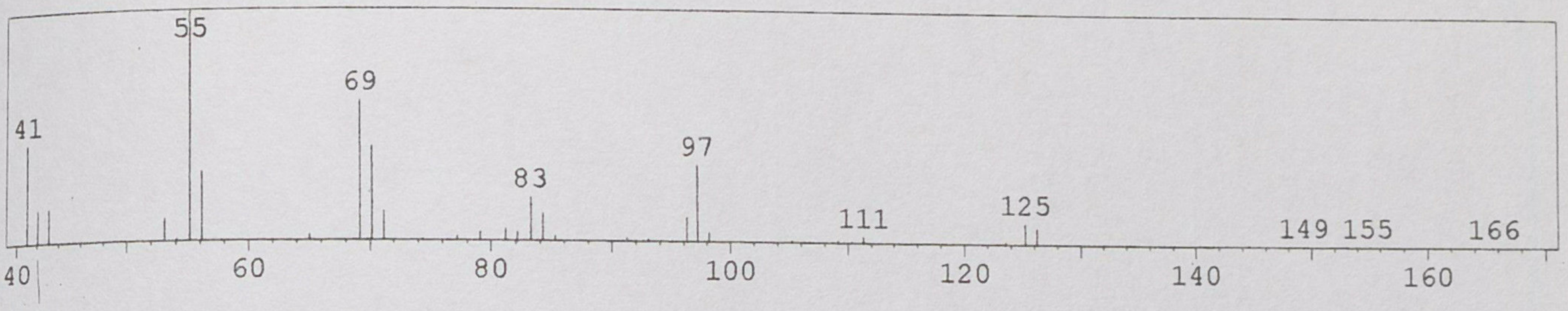
La **figure 4.3** donne les spectres de masse de quelques composés identifiés.

Le bouquet aromatique de la datte Deglet-nour s'avère riche en composés volatils, il renferme : 26 hydrocarbures saturés, 34 hydrocarbures insaturés, 14 alcools, 4 aldéhydes, 3 cétones, 2 esters, 2 acides gras et 1 phénol.

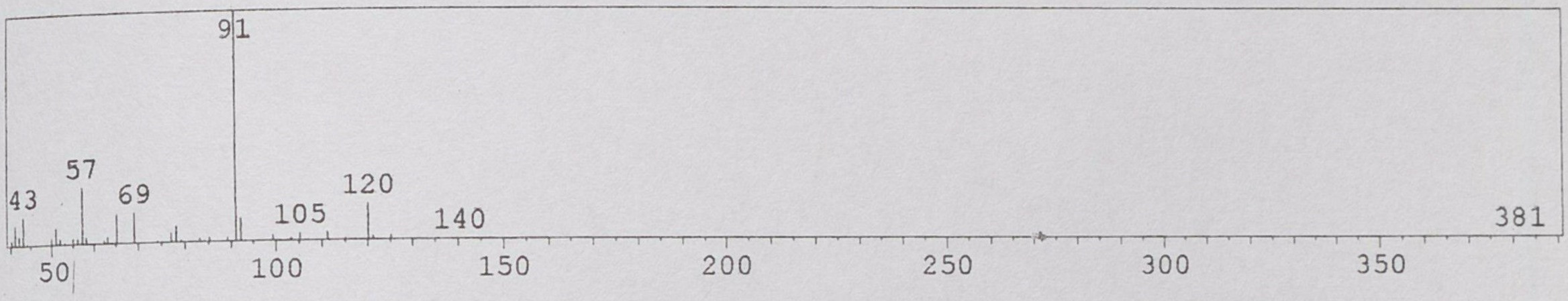
Si dans la plupart des cas, les hydrocarbures ne participent que très modestement à la note aromatique du produit, on aurait tort de mésestimer pour autant leur importance (**Richard** et **Multon**, 1992)

Comme pour les alcools, les aldéhydes et les cétones sont des composés importants dans les arômes en participant à de très nombreuses notes olfactives alors que les esters, quoique peu représentés, sont des composés qui apportent essentiellement des notes fruitées, et qui sont très souvent caractéristiques d'un arôme particulier.

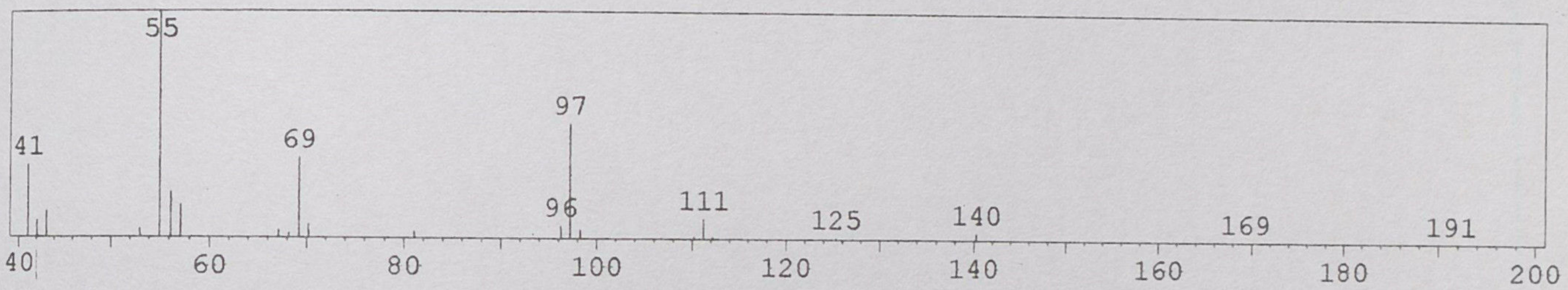
Enfin, la plupart des composés hétérocycliques sont générés lors des réactions thermiques entre un composé de nature glucidique réducteur et un acide aminé.



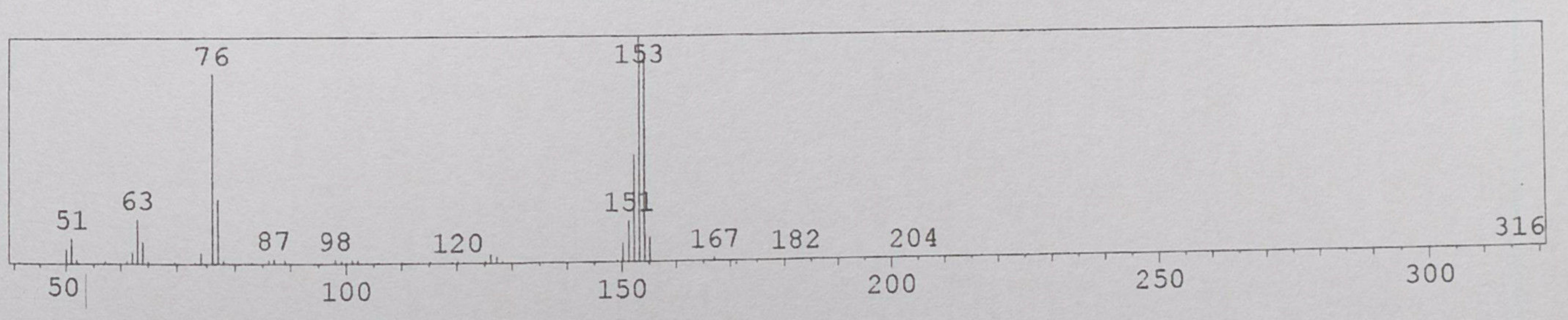
α-Pinène



Octanal



α-Terpinéol



Dodécane

Figure 4.3: Spectres de masse de quelques composés identifiés

Conclusion ...

Au cours de la maturation de la datte Deglet-nour, une diminution de la teneur en eau est associée à une augmentation de la teneur en sucres totaux (> 60 % MS) qui fait de la datte un aliment glucidique de qualité.

Ces résultats montrent que la datte Deglet-nour a tendance à perdre plus d'eau que d'autres variétés au cours de son développement. Arrivée au stade III, la datte a déjà perdu plus de 50 % de sa teneur en eau enregistrée au stade vert avec un début d'accumulation des sucres réducteurs (4 fois plus qu'au stade vert) qui se stabilise au stade mûr d'où l'existence d'une relation étroite entre la réduction des sucres et la teneur en eau des dattes, contrôlée par l'invertase. En effet, à ce stade III, une solubilisation maximale de cette enzyme induit la conversion de plus de 50 % du saccharose en sucres réducteurs.

Durant le stade mûr, l'activité de l'invertase diminue alors que les autres enzymes commencent à être actives. Donc, l'invertase est une enzyme-clé qui contrôle le taux de sucres réducteurs et d'eau dans le fruit; paramètres qui influent sur les qualités organoleptiques de la datte.

Dans ce sens, la littérature rapporte que l'activité invertasique se déclenche avant les activités des polygalacturonases et des cellulases, responsables de la texture; ainsi que celle des polyphénoloxydases, responsables du brunissement enzymatique; elle influence l'activité de ces enzymes (**Kanner**, 1967). L'activité polyphénoloxydase diminue rapidement lors de l'augmentation des composés solides solubles, particulièrement le saccharose, et c'est l'inversion de ce dernier qui déclencherait l'activité polyphénoloxydase (**Hulme**, 1970). En effet, les activités qui ont été exprimées reflètent exactement cette possibilité et font que l'invertase et la polyphénoloxydase soient des enzymes intéressantes dans la datte.

L'évolution remarquable de l'activité polyphénoloxydase peut être expliquée par la présence de formes solubles de polyphénoloxydases qui augmentent avec le taux de maturité du fruit (**Macheix** *et al.*, 1990; **Marques** *et al.*, 1995). Ces polyphénoloxydases sont responsables de l'oxydation enzymatique des polyphénols de la datte matérialisée par la chute de la teneur en composés phénoliques solubles totaux et par l'augmentation de la teneur en tanins condensés au cours de la maturation due à la conversion des tanins solubles en tanins insolubles; ce qui explique la disparition de l'astringence de la datte plus ou moins prononcée relevée lors de la première phase de la maturation. Les polyphénoloxydases contribuent à ces réactions par voie enzymatique alors que la condensation des sucres avec les acides aminés et l'oxydation des lipides sont responsables du brunissement non enzymatique.

L'évaluation de la teneur en acides aminés n'a pas permis de mettre en évidence le rôle précis de ces derniers dans le développement de la réaction de Maillard conduisant à la formation de pigments et d'arômes spécifiques. Toutefois, **Maier** et **Schiller** (1961) ont suggéré que l'unique voie possible du brunissement non enzymatique dans la datte est la condensation des acides aminés avec les sucres réducteurs qui produisent des composés carbonyles volatiles responsables de la flaveur (**El'Odé** *et al.*, 1966). La chute des teneurs en protéines et en acides aminés, au cours de la maturation, explique probablement leur implication dans la réaction de Maillard bien que, la réaction entre les sucres et les acides aminés étant équimoléculaire, le facteur limitant est la faible concentration en ces acides aminés et en ces peptides solubles.

Les interactions entre les lipides et les protéines dans les végétaux revêtent une grande diversité due à la multitude des lipides et des protéines impliquées (**Godon**, 1982). Dans ce sens, l'importance des phénomènes d'oxydoréduction des lipides dans la datte sont à considérer sachant que leur oxydation est catalysée par la lipoxygénase, la température, les ions métalliques ou les radicaux libres pour aboutir dans tous les cas à la formation de produits instables. Ces derniers, au même titre que les quinones, augmentent au cours du stockage

En somme, pour maintenir le brunissement enzymatique à un niveau minimal durant le stockage, il est nécessaire d'inactiver les enzymes par l'exclusion de l'oxygène, l'abaissement de la température et la réduction de l'humidité relative.

D'un autre côté, une diminution des teneurs en composés de la paroi végétale est relevée au cours de la maturation. Ceci est certainement dû à une activité enzymatique spécifique à chaque constituant pariétal (**Mustapha** *et al.* , 1986).

Avec une teneur de plus de 10 %, la datte Deglet-nour est riche en fibres totales comparée aux dattes sèches considérées comme une source de fibres. En effet, plus la teneur en fibres est élevée et plus la datte est sèche. Parmi ces fibres, un intérêt particulier a été porté aux substances pectiques qui ont été très peu étudiées puisque la littérature ne propose que quelques données globales sur les caractéristiques générales des pectines totales.

Les fractions pectiques (PSE, PSO, PSH) extraites se caractérisent par des teneurs élevées en oses neutres (> 15 % MS) et par des taux faibles en Gal A (< 5O % MS) ; et cela au cours des différents stades de la maturation, contrairement aux valeurs proposées pour d'autres fruits où il n'est pas rare d'obtenir des teneurs en Gal A de l'ordre de 65 à 80 % MS et des taux d'oses neutres de 10 % MS. Ces résultats contribuent à une meilleure connaissance des substances pectiques de ce fruit.

A ces substances pectiques sont associées les enzymes pectiques dont le rôle dans le ramollissement des fruits est essentiel. En effet, l'augmentation des activités PG et PME est accompagnée par une diminution de la teneur en pectines totales (exprimées en % MS) au cours de la maturation et par une augmentation de la teneur en PSE du stade I au stade IV. La caractérisation des PG a montré que ces dernières seraient de type exo-PG mais la présence d'endo-PG ne peut être formellement exclue.

Par ailleurs, une augmentation de l'activité des cellulases, absente au stade vert, dans les derniers stades de développement (environ 300 %), est matérialisée par une chute de la teneur en cellulose de plus de 50 % du stade III au stade IV, au niveau d'une datte. Ceci démontre l'effet des cellulases qui, conjugué à celui des PG et des PME, joue un rôle majeur dans la texture de la datte et, par la-même, sur son ramollissement au stade mûr.

Chez les végétaux, les composés carbonylés sont considérés comme des arômes issus, principalement, de la biocatalyse par la lipoxygénase avec les acides gras essentiels comme précurseurs (**Cf.Partie II, chapitre II, paragraphe 3.2**). Les hydroperoxydes de l'acide linoléïque conduisent par scission à la formation d'aldéhydes, constituant majoritaires de l'odeur rance. **Norman** et **Fouse** (1977) ont proposé leur utilisation comme indice de qualité chez la datte Deglet-nour.

Cependant, les composés volatils de la datte Deglet-nour d'Algérie, bien qu'ayant des similitudes avec une dizaine de composés déjà attribués à l'arôme de différentes variétés de dattes par **Jaddou** *et al.* (1984) et **Torres** *et al.* (1995), montrent des différences importantes dans la composition du bouquet final. A priori, ces différences sont en relation avec la méthode d'extraction des constituants volatils adoptée, à savoir la SDE. Cette dernière a permis, à partir de 20 g de dattes et d'un faible volume de solvant, l'obtention d'un extrait aromatique suffisant pour des analyses qualitatives et quantitatives.

Si pour les dattes cultivées à Elche, les résultats ont montré qu'elles renferment 60 composés dont 25 ont été identifiés, la datte Deglet-nour étudiée renferme plus de 100 composés dont 86 ont pu être identifiés. Le nombre élevé de composés volatils identifiés par CG-SM montre, a priori, que cette technique est adaptée à l'analyse des arômes de la datte.

Le nombre remarquable de composés identifiés, dont l'acétaldéhyde est le composé majeur auquel est attribuée la note aromatique de la datte, est à prendre en considération sachant le peu d'études effectuées sur les arômes de la datte.

Références bibliographiques...

ABBAS J., ROUET-MAYER M.A, TREMOLIERES A., PHILIPPON J. (1988). Décoloration de la chlorophylle A par la lipoxygénase 1 du soja, effets de différentes conditions d'oxygénation. *Sciences des Aliments*, **8**, 83-96

ABBOT N., ETIEVANT P.X., LANGLOIS D., LESSCHAEVE I., ISSANCHOU S. (1993). Evaluation of representativeness of the odour of beer extracts prior to analysis by eluate sniffing. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 777-780

ABU-SARRA A.F., ABU-GOUKH A.A. (1992). Changes in pectinesterase, polygalacturonase and cellulase activity during mango fruit ripening. *J. Hort. Sci.*, **67**, 561-568

ACKER L.W. (1969). Water activity and enzyme activity. *Food Technol.*, **23**, 1257

ADDA J., RICHARD, H. (1992). Analyse des arômes : préparation des extraits en vue de l'analyse. *In:* RICHARD H., MULTON J.L. (Eds), *Les arômes alimentaires*, Tec & Doc-Lavoisier, APRIA, Paris, 255-274

ADRIAN J., RABACHE M., FRANGNE R. (1982). Eventualité d'une réaction de Maillard dans les boissons. *Sciences des Aliments*, **2**, 1-11

AL-BAKIR A., WHITAKER J.R. (1978). Purification and characterization of invertase from dates (*Phoenix dactylifera* L., var.Zahdi). *J. Food Biochem.*, **2**, 133-160

AL-BEKR A.J. (1972).The date palm. Ed. Al-Uni Press, Bagdad, 506

ALEXANDER A.G. (1972). Physiology of sugar cane. Ed. Elsevier, New-York, Chap. 2

AL-FARSI M., ALASALVAR C., MORRIS A., BARON M., SHAHIDI F. (2005). Compositiona and sensory characteristics of three native sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7586-7591

AL-FAWAL A.N. (1962). Study of fruit development and methods and degrees of fruit thinning in some Egyptian date varieties. *Date Grow. Inst. Rep.*, **39**, 3

AL-JASIM H.A., AL-DELAIMY K.S. (1972). Pectinesterase activity of some Iraqi dates at different stages of maturity. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 915-917

AL-OBAIDY H.M., SIDDIQI A.M. (1981). Properties of broad bean lipoxygenase. *J. Food Sci.*, **46**, 622-626

AL-OGAIDI H.K.H., AREF A.A. (1985).
In: HAMDI S., HAMDI M. Adsorption de la phosphine par les dattes fumiguées. *Fruits*, **46**, 587-592, 1991

AL-RAWI N., MARKAKIS P., BAUER H. (1967). Amino acid composition of Iraqi dates. *J. Sci. Food Agric.*, **18**, 1-2

AL-SHAHIB W., MARSHALL R.J. (2002). Dietary fiber content of dates from 13 varieties of date palm (*Phoenix dactylifera* L). *Int. J. Food Sci. Technol.*, **37**, 719-721

ALONSO J., HOWELL N., CANET W. (1997). Purification and characterization of two pectinemethylesterases from persimon. *J. Sci. Food Agric.*, **75**, 352-358

AMIOT M.J, TACCHINI M., AUBERT S., NICOLAS J. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.*, **57**, 958-962

ARNAUD J. (1970). Récolte et conditionnement de la datte. *Programme d'Enseignement Professionnel*, Biskra, Algérie

ARNOLD W.N. (1965). β-Fructofuranosidase from grape berries. *Biochem. Biophys. Acta*, **110**, 134-147

ASPINALL G.O. (1980). Chemistry of cell wall polysaccharides. *In*: STUMPF P.K., CONN E.E. (Eds), *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*, **3**, Academic Press, New-York, 473-500

AUBERT S., AMIOT M.J., NICOLAS J.(1992). Les critères de brunissement des pommes. *Sciences des Aliments,* **12**, 625-647

AUDOUIN P., VIDAL J.P., RICHARD H. (1989). Etude des fractions minérales de l'arôme de quelques champignons sauvages comestibles. *Sciences des Aliments,* **9**, 185-193

AWAD M., YOUNG R.E., 1979. Postharvest variation in cellulase, polygacturonase, and pectinmetylesterase in Avocado (*Persea american Mill*, CV. Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol.*, **64**, 306-308

BA-ANGOOD S.A., AHMED M.S., 1984. Chemical composition of major date cultivars grown in the United Arab Emirates. *Date Palm J.*, **3**, 381-394

BARBIER M., 1980. Etude des substances pectiques de la cerise. Thèse Ing., ENSBANA, Dijon, 60

BARREVELD W.H., 1993.Date palm products. *FAO, Agricultural Services Bulletin,* **101**, 41-42

BARON A., THIBAULT J.F. (1985). Les enzymes pectolytiques. *In* : MOURANCHE A., COSTES C., (Eds), *Les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés,* Gauthier Villars, Paris, 143-164

BARTLEY I. M., KNEE M. (1982). The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food Chem.*, **9**, 47-58

BELARBI A., AYMARD C., HEBERT J.P. (2003). The *Deglet-Noor* date polyphenoloxidase activity is very thermolabile and exhibits peculiarities in its thermal inactivation kinetics. *Food Biotechnol.*, **17**, 193-202

BENHURA A.N.M., MAVHUDZI I. (1996). Use of crosslinked mucilage prepared from ruredzo (*Dicerocaryum zanguebarium*) in the purification of polygalacturonase extracted from tomato. *Food Chem.*, **56**, 433-437

BEN SHALOM N, KAHN V., HAREL E., MAYER A.M. (1977). Olive catechol-oxidase changes during development. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 545-550

BERSET C., CUVELIER M. E. (1996). Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sciences des Aliments*, **16**, 219-245

BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489

BONNET J. L., CROUZET J. (1977). Lipoxygenase from tomato fruit: partial purification and study of some properties. *J. Food Sci.*, **42**, 625-628

BONNIN E., RENARD C., THIBAULT J.F., DUCROO P. (1997). Les enzymes de dégradation des parois végétales : mode d'action et utilisations alimentaires. *In*: LARRETA-GARDE V., (Ed), *Enzymes en agroalimentaire*, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 169-200

BOOIJ I., PIOMBO G., RISTERUCCI J.M., COUPE M., THOMAS D., FERRY M. (1992). Etude de la composition chimique des dattes à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivars de palmiers dattiers (*Phoenix dactylifera* L.). *Fruits*, **47**, 667-677

BOUDRIES H., KEFALAS P., HORNERO-MENDEZ D. (2007). Carotenoid composition of Algerian date varieties (*Phoenix dactylifera*) at different edible maturation stages. *Food Chem.*, **101**, 1389-1394

BOURGEOIS G., VIVAS N., GLORIES Y., VITRY C. (1995). Identification par spectrométrie de masse des produits couplée à la chromatographie en phase gazeuse des produits de dégradation des hydroperoxydes formés de l'acide linoléique. *Sciences des Aliments*, **15**, 625-630

BOURZEIX M., WEILAND D., HEREDIA N. (1986). A study of catechins of grape clusters, the wine and other by-product of the wine. *Bull. Org. Int. Vigne et Vin*, **669-670**, 1173-254

BOYCE C.O.L. (1986). Cellulase, enzyme that hydrolyse fiber. *In:* NOVO INDUSTRIE, (Ed), *Novo's Handbook of Practical Biotechnology*, 77-89

BRADY C.J., MCGLASSON W.B., PEARSON J.A., MELDRUM S.K., KOPELIOVITCH E. (1985). Interaction between the amount and molecular forms of polygalacturonase, calcium and firmness in tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **110**, 254-258

BRETT C., WALDRON K. (1996). Physiology and biochemistry of plant cell wall. Ed. Chapman and Hall, London

BRICOUT J. (1992). Spectrométrie de masse. Couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. *In:* RICHARD H., MULTON J.L. (Eds), *Les arômes alimentaires*, Tec & Doc-Lavoisier, APRIA, Paris, 216-240

BRITTON G. (1995). UV/visible spectroscopy. *In*: BRITTON G., LIAAEN-JANSEN S., PFANDER H. (Eds), *Carotenoids: spectroscopy*, **1 B**, Birkhauser Verlag, Basel, 13-63

BROWNLEADER M.D., JACKSON P., MOBASHERI A., PANTELIDES A.T., SUMAR S., TREVAN M. DEY P.M. (1999). Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **39**, 149-164

BRUMMELL D.A., HARPSTER M.H. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, **47**, 311-340

BUESCHER R.W., HUDSON J.M., ADAMS J.R. (1981). Utilization of calcium to reduce pectinolytic softening of cucumber pickles in low salt conditions. *Lebensm.Wiss. U. Technol.*, **14**, 65-69

BURDA S., OLESZEC W., LEE C.Y. (1990). Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 945-948

BURNS J.K., PRESSEY R. (1987). Ca^{2+} in cell walls of ripening tomato and peach. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **112**, 783-787

BUTTERY R.G. (1961). Autoxidation of potato granules. 2. Formation of carbonyls and hydrocarbons. *J. Agric. Food Chem.*, **9**, 248

CARDONA M.L., FERNANDEZ M.I., PEDRO J.R., SEOANE E. (1985). Chemical constituents of *Phoenix dactylifera*. *An. Quim. Ser. C*, **81**, 208-210

CAMERON R.G., GROHMANN K. (1996). Purification and characterization of thermally otlerant pectinmethylesterase from commercial Valencia fresh orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 458-462

CHAN H.T. Jr, TAM S.Y.T. (1982). Partial separation and characterization of papaya endo and exo-polygalacturonase. *J. Food Sci.*, **47**, 1478-1483

CHANG Y.S., SMIT J.C.B. (1973). Characteristics of pectin isolated from soft and firm fleshed peach varieties. *J. Food Sci.*, **38**, 646-648

CHANG C.C., ESSELMAN W.J., CLAGETT C.O. (1971). The isolation and specificity of alfalfa lipoxygénase. *Lipids*, **6**, 100-106

CHARLES A., GUY L. (1997). Abrégé de biochimie alimentaire, Ed. Masson, Paris, 45-46

CHAUDIERE J., GERARD-MONNIER D. (1995). Measurement of lipid peroxidation. *In:* BISMUTH C., HALL A.H., (Eds), *Paraquat poisoning*, Marcel Dekker Inc., NewYork, 65-88

CHEFTEL J.C., CHEFTEL H. (1977). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Ed. Technique et Documentation, Paris, 411

CHEYNIER V.F., OSSE C., RIGAUD J. (1988). Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *J.Food Sci.*, **53**, 1729-1732

CHEYNIER V.F., RIGAUD J., RICARDO- DA-SILVA J. M. (1992). Structure of proanthocyanidin oligomers isolated from grape seeds in relation to some of their chemical properties. *In*: LAKS P.E., (Ed), *Plant Polyphenols, synthesis, properties and significance.* Plenum Press, New-York

CHIBRE B. (1979). Industrialisation des dattes. *Projet régional de recherche sur les palmiers dattiers et les dattes dans le Proche-Orient et l'Afrique du Nord.* F.A.O., Bagdad, 2-24

CHICHESTER C.O., McFEETERS R. (1971). Pigment degeneration during processing and storage. *In*: HULME A.C., (Ed), *The biochemistry of fruits and their products*, **2**, Ed. Academic Press, London, 707-717

CLAYTON T. A., MORRISON W. R. (1972). Changes of flour lipids during the storage or wheat flour. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 721-736

CLEEMPUT G., LAERE K.V., HESSING M., LEUVEN F.V. TORREKENS S., DELCOUR J.A. (1997). Identification and characterization of a novel arabinoxylanase from the wheat flour. *Plant Physiol.*, **115**, 1619-1627

CLEVELAND M.M., FELLERS C.R. (1932). Mineral composition of dates. *Indust. Engineer. Chem.*, **4**, 267-268

COGGINS C.W., Jr., KNAPP J.C.F. (1969). Growth, development and softening of the Deglet Noor date fruit. *Date Grow. Inst. Rep.*, **46**, 11

COGGINS C.W., Jr., LEWIS L.N., KANNER J. (1967). Progress report: chemical and histological studies of tough and tender Deglet Noor dates: physical, chemical. *Date Grow. Inst. Rep.*, **44**, 15

COOK, J.A., FURR, J.R. (1952). Sugars in the fruit of soft, semi-dry and dry commercial date varieties. *Date Grow. Inst. Rep.*, **29**, 3-4

COSGROVE D.J. (1997). Relaxation in high-stress environment: the molecular basis of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell*, **9**, 1031-1041

COSIO R., RENE F. (1996, a). I- Etude comparative de deux méthodes d'extraction. *Sciences des Aliments*, **16**, 383-392

COSIO R., RENE F. (1996, b). II- Etude comparative de deux méthodes d'extraction appliquées à la pulpe de banane. *Sciences des Aliments*, **16**, 515-528

CROUZET J., NICOLAS M., MOLINA I., VALENTIN G., 1984. Enzymes occurring in the formation of six-carbon aldehydes and alcohols in grape. *In:* ADDA J. (Ed), *Progress in flavour research,* Elsevier Sci. Pub B.V., Amsterdam, 401-408

DAVIDEK J., VELISET J., ROKORNY J. (1990). Development in food science. Ed. Elsevier Applied Science, London, 332

DEL CURA B., ESCRIBANO M.I., ZAMORANO J.P., MERODIO C. (1996). High carbon dioxide delays postharvest changes in RubPcase and polygalacyturonase-related protein in *Cherimoya* peel. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **121**, 735-739

DE RIGAL D. (2001). Recherches sur l'inhibition du brunissement enzymatique: utilisation de préparations enzymatiques, substituts aux sulfites. Thèse Doc., Université de Droit, d'Economie et des Sciences d'Aix, Marseille III, 168

DIANE M.B., CARLOS G. (1994). Activity of softening enzymes during cherry maturation. *J. Food Sci.*, **59**, 574-577

DIJKSTRA L., WALKER J.R.L. (1991). Enzymatic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric.*, **54**, 229-234

DOESBURG J.Y. (1965). Pectic substances in fresh and preserved fruits and vegetables. Inst. Res. Stor. & Proc. Hort. Prod., Wageningen, Netherlands

DOWSON V.H.W., ATEN A. (1963). Récolte et conditionnement des dattes. F.A.O., Rome, 397

DRAPRON R., BEAUX Y. (1969). L'oxydation des acides gras essentiels par la lipoxygénase en panification et la formation de composés volatils intervenant dans l'arôme du pain .*C.R.A. Acad. Sci., Paris*, **261**, 2598-2601

DRAWERT F. (1975). Formation des arômes à différents stades de l'évolution du fruit; enzymes intervenant dans cette formation. *In: Colloques Internationaux du CNRS. Facteurs et régulation de la maturation des fruits*, CNRS, Paris, **258**, 309-319

DROBY S., WISNIEWSKI M.E., COHEN L., WEISS B., TOUITOU D., EILAM Y., CHALUTZ E. (1997). Influence of $CaCl_2$ on *Penicillium digitatum*, grapefruit peels tissue and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology*, **87**, 310-315

DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 1948-1954

DUBOST D. (1992). Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis algériennes. Thèse de Doc., UFR, Centre d'Etudes et de Recherche sur l'Urbanisation du Monde Arabe, URBAMA, 545

DUTT N.V.K., RAVIKUMAR Y.V.L., VEDANAYAGAM H.S. (1992). Quantitative structure, property relationships normal saturated and unsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 1263-1265

DUVAL L. (1962). Dosage cérulé molybdique de l'acide phosphorique dans les sols, les végétaux et les engrais. *Ann. Agro.*, **13**, 469

EL'ODE K.E., DORNSEIFER T.P., KEITH E.S., POWERS J.J. (1966).
In: NORMAN S.M., FOUSE D.C. (1977). Changes in total volatile aldehyde content with storage of Deglet Noor dates. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 686-688

EL-ZOGHBI M. (1994). Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. *J. Food Chem.*, **49**, 33-37

EL-ZOGHBI M. (1989). Studies on pectin and other polysaccharids in mango and guava. PhD Thesis, Faculty of Agriculture, Zagazig University, Egypt

ENGEL K.H, TRESSL R. (1983). Studies on the volatile components of two mango varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 796-801

ENZYME NOMENCLATURE. (1992). Recommendation of the Nomenclature Commitee of th International Union of Biochemistry. International Union of Biochemistry, Academic Press, San Diego, CA, **114**, 313-314

ERIKSSON K.E., WOOD T.M. (1985). Biodegradation of cellulose. Academic Press, London, 469-504

F.A.O. (2006). Production de dattes dans le monde : année 2004. FAOSTAT Database results, F.A.O. Rome

FAYYAZ A., ASBI B.A., GHAZALI H.M., CHEMAN Y.B., JINAP S. (1995). Kinetics of papaye pectinesterase. *J. Food Chem.*, **53**, 129-135

FERNANDEZ M.I., PEDRO J.R., SEOANE E. (1983). Constituents of a hexane extract of *Phoenix dactylifera*. *Phytochem.*, **22**, 2819-2821

FISHER R.L., BENNETT A.B. (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**, 1675-1703

FORGET-RICHARD F. (1992). Recherches sur le brunissement enzymatique. Etudes sur l'oxydation des phénols et sur l'inhibition de la polyphénoloxydase isolée de la pomme (*Malus sylvestris*, var. Red delicious). Thèse Doc., Université de Paris VII, 278

FLATH R.A., BLACK D.R., FORREY R.R., McDONALD G.M., MON T.R., TERANISHI R. (1969). Volatiles in gravenstein apple essence identified by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromat.Sci.*, **7**, 508-512

FRITSCH C. (1994). Lipid oxydation. The other dimensions. *Inform.*, **5**, 423 – 436

GARSSEN G.J., VLIEGENTHART J.F.G., BOLDINGH J. (1971). An anaerobic reaction between lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxydes. *Biochem. J.*, **122**, 327-332

GODON B. (1996). Protéines végétales. Ed. Tec & Doc-Lavoisier, Paris, 666

GOETZ G., FKYERAT A., METAIS N., KUNZ M., TABACCHI R., PEZET R., PONT V. (1999). Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolic inhibitors of *Botirytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochem.*, **52**, 759-767

GOLBECK K.H., CAMMARATA K.V. (1981). Spinach thylakoid polyphénols oxidase: isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.*, **67**, 977-984

GOMEZ E., LEDBETTER C.A. (1997). Development of volatil compounds during fruits maturation. *J. Sci. Food Agric.*, **74**, 541-546

GOODWIN T. W. (1952). The comparative biochemistry of the carotenoids. Ed. Chapman and Hall Ltd, London

GOUPY P., MACHEIX J.J., NICOLAS J., VAROQUAUX P. (1994). Partial purification and characterization of endive (*Cichorium endivia* L.) polyphenoloxidase. *Sciences des Aliments*, **14**, 751-762

GOUPY P.M., VAROQUAUX P.J.A., NICOLAS J.J., MACHEIX J.J. (1990). Identification and localization of hydroxyciamonyl and flavan derivation from endive (*Cichorium endivia* L.) C.V. Géante Maraîchère leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 2116-2121

GRANT-REID J.S. (1997). Carbohydrate metabolism. *In*: DEY P.M, HARBORNE J.B. (Eds), *Plant Biochemistry*, 2050, Academic Press, London

GRIERSON D. (1987). Senescence in fruits. *Hort. Science*, **22**, 859-862

GROBBELAAR, N., POLLARD, J.K., STEWARD, F.C. (1955). New soluble nitrogen compounds in plants. *Nature*, **175**, 703

GROSS J. (1987). Pigments in fruits. Ed. Academic Press, London, 87-285

GROSS J., HABER O., IKAN R. (1983). The carotenoid pigments of the date. *Sci. Hort.*, **20**, 251-257

HAARD N. F. (1988). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol. Lett.*, **10**, 609-614.

HAAS A.R.C., BLISS D.E. (1935). Growth and composition of Deglet Nour dates in relation to water injury. *Hilgardia*, **9**, 295-344

HAMDI S., HAMDI M. (1991). Adsorption de la phosphine par les dattes fumiguées. *Fruits*, **46**, 587-592

HANIS T., MNUKOVA J., JELEN P., KLIR P., PEREZ B., PEZEK M. (1988). Effect of γ-irradiation on survival of natural microflora and some nutrients in cereal meals. *Cereal Chem.*, **65**, 381-383

HARBORNE J. B., GRAYER R. J. (1988). The flavonoids, advances in search since 1980. Ed. Harborne, Chapman and Hall, London, 1-20

HARRIS R.S. (1977). Effects of agricultural practices on the composition of foods. *In:* HARRIS R.S., KARMAS E., (Eds), *Nutritional evaluation of food proceeding*. The Avi Publishing Company Inc., Westport, CT, 33-57

HART D.J., SCOTT K.J. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.*, **54**, 101-111

HASEGAWA S., MAIER V.P. (1980). Polyphenol oxidase of dates. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 891-893

HASEGAWA S., SMOLENSKY D.C. (1971). Cellulase in dates and its role in fruit softening. *J. Food Sci.*, **36**, 966

HASEGAWA S., SMOLENSKY D.C. (1970). Date invertase: properties and activity associated with maturation and quality. *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 902-904

HASEGAWA S., SMOLENSKY D.C., MAIER V.P. (1972). Hydrolytic enzymes in dates and their application in the softening of tough dates and sugar wall dates. *Date Grow. Inst. Rep.*, **49**, 6

HASEGAWA S., MAIER V.P., KASZYCKI H.P., CRAWFORD J.K. (1969). Polygalacturonase content of dates and its relation to maturity and softness. *J. Food Sci.*, **34**, 527-529

HASLAM E. (1988). Plant polyphenols (*syn.*vegetable tannins) and chemical defence- a reappraisal. *J. Chem. Ecol.*, **14**, 1789-1805

HASSOUNA M., GHRIR R., MAHJOUB A., HAMDI S. (1994). Influence de la fumigation au bromure de méthyle sur la composition chimique des dattes tunisiennes. *Fruits*, **49**, 197-204

HAWKER J.S. (1969).
In: HASEGAWA S., SMOLENSKY D.C. (1970). Date invertase: properties and activity associated with maturation and quality. *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 902-904

HELLER R., ESNAULT R., LANCE C. (1995). Physiologie végétale **2** : Développement. Ed. Masson, Paris, 315

HEMINGWAY R. W. (1992). Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives. *In*: HEMINGWAY R. W., LAKS P. E. (Eds), *Plant polyphenols: synthesis. Properties, significance*, New-York

HIGHLY T.L. (1997). Carbohydrolase assays. *In*: DASHEK W.V. (Ed.), *Methods in plant biochemistry and molecular biology*, CRC Press, New York, 309-321

HILDBRAND D. F., HYMOURTZ T. (1981). Two soybean genotypes lacking lipoxygenase 1. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 583-586

HINTON D.M., PRESSEY R. (1974). Cellulase activity in peaches during ripening. *J. Food Sci.*, **39**, 783-785

HODGE J.E. (1967). Origin of flavor in foods: nonenzymatic browning reactions. *Chem. Physiol.*, **12**, 465-492

HOPKINS G.W. (1999). Introduction to plant physiology. Ed. WILEY J. and Sons Inc., New York, 512

HUBER D.J. (1983). The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Hort. Rev.*, **5**, 169-219

HULME A.C. (1970). The biochemistry of fruits and their products, **1**, Ed. Academic Press, London, 270

HUSSEIN F. (1970). Fruit growth and composition of some arabian soft date cultivars. *Ann. Agric. Trin.*, **47**, 157-162

ISLER O. (1971). Carotenoids. Ed. Birkhauser Verlag, Basel. 11-27

JADDOU H., MHAISEN M.T, Al-HAKIM M. (1984). Flavour volatile analysis of Zahdi dates by gaz-liquid chromatography. *Date Palm J.*, **3**, 367-379

JAUBERT J.N. (1980). Arômes et Aromatisants. *Ind. Alim. Agric.*, 453-456

JENNINGS W., SHIBAMATO T. (1980). Qualitative analysis of flavors and fragrance volatiles by glass capillary chromatography. Ed. Academic Press, New York

JOSLYN M..A. (1970). A serie of monographies. *Food Science and Technology, 2nd Ed.*, 310

JOUANY J.P. (1972). Chromatographie en phase gazeuse des oses, des di- et trisaccharides dans les milieux complexes. *Ann. Biophy.*, **12**, 493-501

KADDOURI F.R. (1998). Evolution de la matière organique sous palmier. Incidences sur le fruit (El-Oued). Thèse de Magister, INA, Alger, 141

KANNER J., EL MALEH H., REVENI O., BEN-GERA I. (1978). Invertase (β-Fructofuranosidase) activity in three date cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 1238-1240

KETSA S., CHIDTRAGOOL S., KLEIN J.D., LURIE S. (1998). Effect of heat treatment on changes in softening, pectic substances and activities of polygalacturonase, pectinesterase and β-galactosidase of ripening mango. *J. Plant Physiol.*, **153**, 457-461

KETSA S., DAENGKANIT T. (1999). Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase, ß-galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity. *Sci. Hort.*, **80**, 181-188

KIKUCHI, N., MIKI, T. (1974). A study on the free fatty acid constituents in the sarcocarps of the date palm. *J. Agric. Chem. Soc. (Japan)*, **48**, 2

KIVILAAN A., BEAMAN T.C., BANDURSKI R.S. (1961). Enzymatic activities associated with cell wall preparations from corn coleoptiles. *Plant Physiol.*, **36**, 605-610

KNEE M. (1978). Properties of polygalacturonate and cell cohesion in apple fruit cortical tissue. *Phytochem.*, **17**, 1252-1260

KNEE M., PAULL R.E., BEN-ARIE R., HAWKER J.S. (1991). Enzymes in fruits. *In*: FOX P.F. (Ed.), *Food enzymology*, Elsevier Applied Science, London, 545-598

LABUZA M., BOLIN D. (1972). Stability of intermediate moisture foods. 1- Lipid oxydation. *J. Food Sci.*, 37, 154-159

LARRETA-GARDE V. (1995). La lipoxygénase en panification et biscuiterie. *Oléagineux Corps gras Lipides*, **2**, 363-365

LAZAN H., ALI Z.M. (1993). Cell wall hydrolases and their potential in manipulation of ripening of tropical fruits. *Asian Food J.*, **8**, 47-53

LEMOINE D. (1996). Vers de nouveaux profils aromatiques. *Revue de l'Industrie Alimentaire*, **558**, 6-7

LEVASSEUR C., MEYBERGER C., MISCHLER R., SCHOTT S. (2001). Stabilité des pigments (chlorophylles et caroténoïdes) et vitamine E dans les denrées végétales. Thèse de Master, Substances Naturelles Végétales d'Intérêt Economiqie, ULPL, Strasbourg

LIAAEN-JENSEN S. (1971). Isolation, reaction. *In*: ISLER O., (Ed.), *Carotenoids*. Birkhauser Verlag, Basel, 61-188

LIAAEN-JANSEN S., STOREBAKKEN T. (1990). The pigmentation of salmonids. 1. Carotenoids. Ed. Hoffmann and Co., Basel, 2265

LIKENS S.T., NICKERSON G.B. (1964). Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1**, 5-13

LINDEN G., LORIENT D. (1994). Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole. Ed. Masson, Paris, 355

LIN TANG H.C., McFEETERS R.F. (1983). Relationships among cell wall constituents, calcium and texture during cucumber fermentation and storage. *J. Food Sci.*, **48**, 66-70

LOPEZ-NICOLAS J. M., BRU R., GARCIA-CARMONA F. (1997). Enzymatic oxydation of linoleic acid by lipoxygenase forming inclusion complexes with cyclodextrins as starch model molecules. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1144-1148

LOSHNER J., KROH L., VOGEL J. (1990). Ascorbic acid ascorbonyl component of non enzymatic browning reactions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **191**, 302-305

LOUISOT P. (1974). Biochimie structurale II: vitamines et coenzymes. Ed. Dunod, Paris

LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.I., RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275

MACHEIX J.J., FLEURIET A., BILLOT J. (1990). Phenolic compounds in fruit processing. *In* : *Fruit phenolics*, 295-322. C.R.C. Press, Boca-Raton

MAIER V.P., SHILLER F.H. (1961). Studies on domestic dates II. Some chemical changes associated with deterioration. *J. Food Sci.*, **26**, 529

MAIER, V.P., METZLER, D.M. (1965). Quantitative changes in date polyphenols and their relation to browning. *J. Food Sci.*, **30**, 747

MAIER V.P., METZLER D.M. (1964). Phenolic constituents of the date *(Phoenix Dactylifera)* and their relation to browning. *First International Congress of Food Science and Technology*, Science Publishers Inc., New York

MAIER V.P., METZLER D.M., HUBER A.E. (1964). Effects of heat processing on the properties of dates. *Date Grow. Inst. Rep.*, **41**, 8

MANNING K., MAW G.A. (1975). Distribution of acid invertase in the tomato plant. *Phytochem.*, **14**, 1965-1969

MARCZY J.S., SIMON M.L., MOZSIK L., SZAJANI B. (1995). Comparative study on the lipoxygenase activities of some soybean cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 313-315

MARKOVIC O., HEINRICHOVA K., LENKEY B. (1975). Pectolytic enzymes from banana. *Coll. Czech. Chem. Comm.*, **40**, 769-774

MAROUF B.A., ZEKI L. (1982). Invertase from date fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 990-993

MARQUES L., FLEURIET A., MACHEIX J.J. (1995). Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Biochem.*, **33**, 193-200

MASSIOT P. (1988). Caractérisation structurale et dégradation enzymatique des polysaccharides des parois cellulaires de la racine de carotte (*Daucus carota* L.). Thèse Doc., Université de Rennes, France.

MATLAK H.H., MANN J. (1984). Darkening of date control by microwave heating. *Date Palm J.*, **3**, 303-316

MATOBA T., HIDAKA H., NARITA H., KITAMURA K., KAIZUMA N., KITO M. (1985). Lipoxygenase-2 isozyme is responsable of generation of n-hexanal in soybean homogenate. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 852-855

MAYER A.M. (1987). Polyphenol oxidases in plants. Recent progress. *Phytochem.*, **26**, 11-20

MAYER A.M., HAREL E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem.*, **18**, 193-215

MAZLIAK P. (1974). Métabolisme des lipides dans les plantes supérieures. Ed. Masson, Paris

MC LURE J.W. (1979). Biochemistry of plant phenolics. SWAIN T., HARBORNE J. B., VAN SUMERE C. F., (Eds), Plenum Press, New-York., 525

MC DONALD H.M., EVANS R., SPENCER J.W. (1993). Purification and properties of of the major pectinesterase in lemon fruit (*Citrus lemon*). *J. Sci. Food Agric.*, **70**, 321-326

MC DONALD H.M., EVANS R. SPENCER J.W. (1994).The use of continuous flow electrophoresis to remove pectin in the purification of the minor pectinesterase in lemon fruits (*Citrus lemon*). *J. Sci. Food Agric.*, **64**, 129-134

MAC LEOD A.J., PIERIS N.M. (1983). Volatile flavor components of wood apple (*Feronia limonia)* and a processed product. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 796-801

MILLER G.L., DALMASSO J.P., KRETCHMAN D.W. (1987). Mechanical stress, storage time and temperature influence cell wall-degrading enzymes, firmness and ethylene production by cucumbers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **112**, 666-671

MINESSY F.A., BACHAM A.A., EL-AZAB E.M. (1975). Changes in sugars and nutrition element content in fruits of four soft date varieties in Egypt. *Alex J. Agric. Res.*, **23**, 301

MOHAMED N.A., NEZAM ELDIN A.N. (1985).A study on browning reaction in the major stages maturity of Zahdi date. *Dep. Date and Palm Agric. Water.* Reso. Res. Cent. Sci. Res. Council, Bagdad

MOUSTACAS A.M., NARI J., BOREL M., NOAT G., RICHARD J. (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell wall extension: the role of metal ions in plant cell wall extension. *Biochem. J.*, **279**, 351-354

MU'AYED F.A., MADJID A.I. (1996). The role of ethylene in the regulation of fruit ripening in the Hillawi date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *J. Sci. Food Agric.*, **72**, 306-308

MULTON J.L. (1992). Technique d'analyse et de contrôle dans les IAA. Ed. APRIA, Paris.

MUNIER P. (1973). La datte. *In*: *Le palmier dattier.* Ed. Maisonneuve et Larose, Paris, 141-150

MUSTAFA A.B., HARPER D.B., JOHNSON D.E. (1986). Biochemical changes during ripening of some Sudanese date varieties. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 43-53

NARI J., NOAT G., RICHARD J. (1991). Pectinmethylesterase, metal ions and plant cell wall extension. Hydrolysis of pectin by plant cell wall pectinmethylesterase. *Biochem. J.*, **279**, 343-350

NELSON N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Amer. Chem. Soc.*, **66**, 1628-1632

NEWMAN A.A. (1972). Chemistry of terpens and terpenoids. Ed. Academic Press, London and New York

NICOLAS J., POTUS J. (1994). Phénomènes d'oxydation enzymatique et cooxydation. Exemple du rôle de la lipoxygénase en panification et la polyphenoloxydase en technologie des fruits. *Sciences des Aliments*, **14**, 627- 642

NICOLAS J., RICHARD-FORGET F.C., GOUPY M., AMIT M.J., AUBERT S.Y. (1994). Enzymatic browning in apple and apple products. *CRC, Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, **34**, 109-157

NICOLAS J., DRAPRON R. (1981). Les lipoxygénases végétales. Etat actuel de nos connaissances. 1-Aspects biochimiques. *Sciences des Aliments*, **1**, 91-156

NICOLAS J., DRAPRON R. (1977). Nordihydroguaiaretic acid and butylated hydroxytoluene as inhibitors of purified lipoxygenase from horse bean (*Vicia faba* L.). *Riv. Ital. Sost. Grasse*, **54**, 284-288

NICOLAS J., BEAUX Y., DRAPRON R. (1974). Les méthodes de mesure de l'activité lipoxygénasique. Mise au point d'une nouvelle méthode. *Ann. Technol. Agric.*, **23**, 287-308

NORMAN S.M., FOUSE D.C. (1977). Changes in total volatile aldehyde content with storage of Deglet Noor dates. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 686-688

NOUR A.A.M., MAGBOUL B.I. (1985). Amino acid composition of some Sudanese date cultivars. *Date Palm J.*, **4**, 51-54

NURSTEN H.E., WILLIAMS A.A. (1967). Fruit aromas: a survey of components identified. *Chem. Ind.*, **12**, 486-497

OLSON J. A. (1989). Biological actions of carotenoids. *J. Nutr.*, **119**, 94-95

OSZMIANSKI J., LEE C.Y. (1990). Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in model system. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1202-1204

OTHMAN A.M.A. (1995). Perspectives de développement et de protection du palmier dattier dans les pays arabes. *The Arab Center for Studies of Arid Zones and Dry Land*, **14**

OWENS H.S., LOTZHAR H., SCHULTZ T.H., MACLAY W.D. (1946). Shape and size of pectinic acid molecules from viscosimetric measurements. *J. Amer. Chem. Soc.*, **68**, 1628-1632

PADIVAL R.A., RANGANNA S., MANJREKAR S.P. (1981). Stability of pectins during storage. *J. Food Technol.*, **16**, 367-378

PARK E.Y., LUH B.H. (1985). Polyphenol oxidase of kiwi fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 678-684

PECH J.C., BALAGUE C., LATCHE A., BOUZAYEN M. (1994). Postharvest physiology of climacteric fruits: recent development in the biosynthesis and action of ethylene. *Sciences des Aliments*, **14**, 3-15

PENDHARKER M.B., NAIR P.M. (1974). Alterations in *Solanum tuberosum* polyphenol oxidase activity induced by gamma irradiation. *Phytochem.*, **13**, 1373-1377

PESIS E., FUCHS Y. , ZAUBERMAN G. (1978). Cellulase activity and fruit softening in avocado. *Plant Physiol.*, **61**, 416-419

PEYRON L. (1992). Techniques classiques actuelles de fabrication de matières premières naturelles organiques.*In:* RICHARD H., MULTON J.L. (Eds.), *Les arômes alimentaires*, Tec & Doc- Lavoisier, APRIA, Paris, 216-240

PIERPOINT W.S. (1969). *O*-quinones formed in plant extracts. Their reaction with amino acids and peptides. *Biochem. J.*, **112**, 609-616

PIERPOINT W.S. (1966). The enzymatic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochem. J.*, **98**, 567-580

PILNIK W., VORAGEN A.G.J. (1991). The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in fruit and vegetable processing. *Food Enzym.*, **1**, 303-336

POLACSEK-RACZ M., POZSAR-HAJNAL K. (1976). Determination of pectin-methylesterase, polygalacturonase and pectic substances in some fruits and vegetables. *Acta Alim.*, **5**, 189-204

PORTER L. N., HIRTSTICH L. N., CHANG B. G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphindins. *Phytochem.*, **25**, 223-230

PRESSEY R. (1986). Changes in polygalacturonase isoenzymes and converter in tomatoes during ripening. *J. Hort. Sci.*, **21**, 1183-1185

PRESSEY R., HINTON D.M., AVANTS J.K. (1971). Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peaches during ripening. *J. Food Sci.*, **36**, 1070-1072

PRIVETT O.S., NICKELL C., LUNDBERG W.O. (1955). Products of the lipoxidase-catalysed oxidation of sodium linoléate. *J. Chem. Soc.*, **32**, 505-511

RAGAB M.H.H., EL-TABEY SHEHATA A.M., SEDKY A. (1956). Studies on Egyptian dates II. Chemical changes during development and ripening of six varieties. *Food Technol.*, **10**, 407-410

RALET M.C., BONNIN E., THIBAULT J.F. (2003). Pectins. *In:* STEINBÄCHEL A. (Ed.), *Biopolymers*, **6**, *Polysaccharids* II, Wiley. VCH Verlag, Weinheim, Allemagne, 345-380

RENARD C. (1989). Etude des polysaccharides pariétaux de la pomme. Extraction et caractérisation par les méthodes chimiques et enzymatiques. Thèse Doc., Université de Nantes, France.

REYNES M., BOUABIDI H., PIOMBO G., RISTERUCCI A.M. (1994). Caractérisation des princpales variétés de dattes cultivées dans la région de Djerid en Tunisie. *Fruits*, **49**, 289-289

REYNOLDS P.A., KLEIN B.P. (1982). Purification and characterization of type-1 lipoxygenase from pea seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1157-1163

REXOVA-BENKOVA L., MARCOVIC O. (1976). Pectic enzymes. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **33**, 323-385

RHODES M.J.C. (1980). Respiration and senescence of plant organs. *In*: STUMPF P.K., CONN E.E. (Eds), *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*, **2**, Academic Press, New York, 419-462

RIBEREAU-GAYON P. (1970). Recherches technologiques sur les composés phénoliques des vins rouges. *Conn. Vigne et Vins*, **4**, 63-74

RIBEREAU-GAYON P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris, 254

RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., SUDRAUD P., RIBEREAU-GAYON P. (1976). Traité d'œnologie. Sciences et techniques du vin. Ed. Dunod, Paris

RICARDO-DA-SILVA J. M., CHEYNIER V.F., SOUQUET J. M., MOUTOUNET M., 1991. Interaction of grape seed procyanidin with various proteins in relation to wine fining. *J. Sci. Food Agric.*, **57**, 111-125

RICARDO C.P.P., APREES T. (1970). Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochem.*, **9**, 239-247

RILLO L., CASTALDO D., GIOVANE A., SERVILLO L., BALESTRIERI C., QUAGLIUOLO L. (1992). Purification and properties of pectin-methylesterase from mandarin, orange fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 591-593

RINDERKNECHT, H. (1959). The free amino acid pattern of dates in relation to their darkening during maturation and storage. *Food Res.*, **24**, 3

RODRIGUEZ-AMAYA D.B. (1993). Nature and distribution of carotenoids in foods. *In*: CHARALAMBOUS G. (Ed.), *Shelf life studies of foods and beverages. Chemical, biological, physical and nutrional aspects*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 547-589

ROE B., BRUEMMER J.H. (1981). Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of "Keitt" mangos. *J. Food Sci.*, **46**, 186-189

ROTHER H. (1979). Extraction, dosage et stabilisation des caroténoïdes d'agrumes. *Fruits d'Outre-Mer*, **34**, 479-488

ROUAU X. (1982). Les substances pectiques du jus de pommes. DEA Biologie et Physiologie végétale, INRA, Nantes.

ROUET-MAYER M.A., PHILIPPON J., NICOLAS J. (1993). Enzymatic browning, biochemical aspects. *In*: MACRAE R., ROBINSON R.K., SADLER M.J., (Eds) *Encyclopeadia of food science, food technology and nutrition*, **1**, Academic Press, London, 499-506

ROUX J.L. (1994). Conserver les aliments. Comparaison des méthodes et des technologies. Ed. Tec & Doc-Lavoisier, Paris, 44-524

RYGG G.L. (1971). Observations on Deglet-Noor date production in Algeria. *Report of the date Growers'Institute, Coachella Valley (U.S.A.)*, **48**, 12-13.

SACHDE A.G., AL-BAKIR A.Y., ABDUL-RAHEEM J.A.K. (1989). Polyphenol oxidase from Barhee and Zahdi dates. II. Characterization. *J. Food Biochem.*, **12**, 241-251

SACHER J.A. (1966). The regulation of sugar uptake and accumulation in bean pod tissue. *Plant Physiol.*, **41**, 181-189

SALEM S.A., HEGAZI S.M. (1971). Chemical composition of the Egyptian dry dates. *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 632-633

SALUNKH D.K. (1973).Developments in technology and nutritive value of deshydrated fruits, vegetables and their products. *Crit. Rev. Food Technol.*, **4**, 2

SANCHEZ J.A., ZAMORANO J.P., ALIQUE R. (1998). Polygalacturonase, cellulase and invertase activities during cherimoya fruit ripening. *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, **73**, 87-92

SANDERSON G.W., GRAHAM H.N. (1973). On the formation of black tea aroma. *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 577-585

SAWAYA W.N., KHATCHDOURIAN H.A., KHALIL J.K. (1982).Growth and compositional changes during the various developmental stages of some Saudi Arabian date cultivars. *J. Food Sci.*, **41**, 1489-1493

SAWAYA W.N., KHALIL J.K., SAFI W.M., AL-SHALHAT A. (1983, a). Physical and chemical characterization of three Saudia date cultivars at various stages of development. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **16**, 87-91

SAWAYA W.N., KHALIL J.K., KHATCHADOURIAN H.A., SAFI W.M., MASHADI A.S. (1983, b). Sugars, tannins and some vitamin contents of twenty-five date cultivars grown in Saudi Arabia at the Khalaal (mature colour) and Tamr (ripe) stages. *Proceedings of the First Symposium on the Date Palm*, Saudi Arabia

SCHULTZ T.H., FLATH R.A., MON R., EGGLING S.B., TERANISHI R. (1977). Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 446-449

SEYMOUR T.A., PRESTON J.F., WICKER L. (1991, a). Stability of pectinesterase of march white grapefruit. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1075-1079

SEYMOUR T.A., PRESTON J.F., WICKER L., LINDSAY J.A., WEI C., MARSHALL M.R. (1991, b). Purification and properties of pectinesterase of march white grapefruit pulp. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1081-1085

SINGLETON V.L. (1987). Oxygen with phenols and some related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 69-77

SINGLETON V.L., ROSSI J.A. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, **15**, 134-145

SINGLETON. V. L., TIMBERLAKE. C. F., LEA A. H. (1978). The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J. Sci .Food Agric.*, **29**, 403-10

SMITH C.A., WOOD E.J. (1996). Les biomolécules. Protéines, Glucides, Lipides, Acides nucléiques. Ed. Masson, Paris, 159-160

SMITH A.K., JUNE H., NOBLE A.C. (1996). Effects of viscosity in the bitterness and astringency of grape seed tanin. *Food Qual. Prefer.*, **34**, 61-66

SNIR R., KPEHLER P.E., SIMS K.A., WICKER L. (1995). pH and cations influence permeability of March grapefruit pectinesterase on polysulfone ultrafiltration membrane. *J. Agri. Food Chem.*, **5**, 1159-1162

SNYDER J.M., FRANKEL E.N., SELKE E., WARNER K. (1988). Composition of gas chromatographic methods for volatile lipid oxidation compounds in soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 1617-1620

SOMOGYI M. (1937). A reagent for the copper iodometric determination of very small amounts of sugar. *J. Biol. Chem.*, **117**, 771

SOSULSKI F., LIN M.J.Y. HUUMBERT E.S. (1978). Gelation characterisrics of acid precipitated pectin from sunflower heads. *Can. Inst. Food Sci. Technol.*, **2**, 113- 116

SOUCI S.W. FACHMANN W., KRANT H. (1994). Food composition and nutrition tables. Ed. CRC Press, London, 1091

SPEIRS J., BRADY G.J. (1991). Modification of gene expression in ripening fruit. *J. Plant Physiol.*, **18**, 519-532

STARRANTINO A. (1997). Essential oil of two new pigmented citrus hybrids, *Citrus clementina* × *Citrus sinensis*. *J. Agri. Food Chem.*, **45**, 467-471

SU C. T., SINGLETON V. L. (2001). Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochem.*, **8**, 153-1558

SURREY K. (1964). Spectrophotometric method for determination of lipoxydase activity. *Plant Physiol.*, **39**, 65-70

TERESA F.W., MC RAE E.A. (1992). Pectinesterase, polygalacturonase and ß-galactosidase during softening of ethylene-treated kiwi fruit. *J. Hort. Science*, **27**, 900-902

THIBAULT J.F. (1980). Les substances pectiques. *In* : COSTES C., MONTIES B. (Eds), *Les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, Gauthier - Villars, Paris, 232-251

THIBAULT J.F., PETIT R. (1979). Les substances pectiques : généralités et domaines d'application dans les industries alimentaires. *Ind. Alim. Agric.*, **12**, 1231-1240

TIJSKENS L.M.M., HERTOG M.L., VAN DIJK C. (1999). A generic enzyme system on stimulation and inactivation during storage and processing. *In*: HÄGG M., AHVENAINEN R., EVERS A.M., TIILIKKALA K. (Eds.), *Agricultural food quality II: Quality management of fruits and vegetables*, Royal Society of Chemistry, R.S.C., Finland, 81-85

TIJSKENS L.M.M., RODIS P.S., HERTOG M.L., VAN DIJK C. (1998). Kinetics of polygalacturonase activity and firmness of peaches during storage. *J. Food Eng.*, **35**, 11-126

TOLLIER M.T., ROBIN J.T. (1979). Adaptation de la méthode à l'orcinol sulfurique aux dosages automatiques des glucides neutres totaux. *Ann. Technol. Agric.*, **28**, 1-15

TORRES P., REYNES M., LEBRUN M., FERRY M. (1995). Volatile constituents of dates from Phoenix *dactylifera* grown in Elche. *Journées Internationales sur le Palmier Dattier dans l'Agriculture d'Oasis dans les Pays Méditerranéens,* 25-27 Avril 1995, Elche (Espagne)

TSAY L.M., WU M.C. (1990). Studies on the physio-chemical properties of postharvest sugar apple. *Acta Hort.*, **269**, 241-247

ULRICH R. (1952). La vie des fruits. Ed. Masson et Cie, Paris, 560

VAROQUAUX P., SARRIS J., AVISSE C. (1973). Dosage spectrophotométrique semi-automatique de l'activité lipoxygénasique du pois. *Ann. Technol. Agric.*, **22**, 59-67

VAN SOEST P.J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous fieeds. II. A rapid method of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Agric. Chemists,* **46**, 829-835

VAUGHAN D., MAC DONALD I.R. (1967). Development of soluble and insoluble invertase activity in washed storage tissue slices. *Plant Physiol.*, **42**, 456-458

VELIOGLU Y.S., MAZZA G., GAO L., OOMAH B.D. (1998). Antioxydant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agri. Food Chem.*, **46**, 4113-4117

VERNIN G., VERNIN G. (1982). Les arômes alimentaires: développements récents. Ed. APRIA, Paris, 308

VIAMOS-VIGYAZO L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *In*: La maîtrise de la qualité des fruits frais. *Neuvième Colloque sur les Recherches Fruitières.* (1990),Ed. Lavoisier, Paris, 249-258

VILLANUA L., VILLANUA M.P (1978). L'extraction dans l'analyse des composés aromatisants des aliments. *Labo-Pharma, Problèmes et Techniques,* **277**

VINSON A.E. (1908). The endo- and ecto invertase of the date. *J. Am. Chem. Sci.*, **30**, 1005-1020

VIVAS N., BOURGEOIS G., GLORIES Y., VITRY C. (1995). Identification par spectrométrie de masse des produits formés par autoxydation de l'acide linoléique en milieu hydroalcoolique. *Sciences des Aliments,* **15**, 49-58

VORAGEN A.G.J., TIMMERS J.P.J., LINSSEN J.P.H., SCHOLS H.A., PILNIK W. (1983). Methods of analysis for cell-wall polysaccharides of fruit and vegetables. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.*, **177**, 251-256

WATE B.K., MERILL M. (1963). Composition of food, raw, processed and prepared. *Agricultural Handbook*, **8**, U.S.D.A.

WICKER L. (1992). Selective extraction of thermostable pectinesterase. *J. Food Sci.*, **57**, 534-535

WILBERG V.C., RODRIGUEZ-AMAYA D.B. (1995). HPLC quantisation of major carotenoids of fresh and processed guava, mango and papaya. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, **28**, 474-480

WILLAMS D.C., LIM M.H., CHEN A.O., PANGBORN R.M., WHITAKER J.R. (1986). Blanching of vegetables for freezing with indicator enzyme to choose. *Food Technol.,* **2**, 130-139

WOLFF J. P. (1968). Manuel d'analyse des corps gras. Ed. Azoulay, Paris, 552

YOUSSIF M., MOHAMMED S., NOUR A.A.M. (1982).
In: SAWAYA W.N., MISKI A.M., KHALIL J.K., KHATCHADOURIAN H.P., MASHADI A.S., 1983. Physical and chemical characterization of the major date varieties grown in Saudia Arabia. *Date Palm J.*, **2**, 1-25