

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU



-----  
Ecole Doctorale

Sciences et Technologies  
-----

Laboratoire de Biochimie Alimentaire,  
Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et  
Bioinformatique (BAEBIB)

N °d'ordre :

**Thèse Présentée**

**Par Mme Mamounata DIAO épouse BAKO**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Ouagadougou**

Option : Sciences Appliquées

**PEROXYDASES DES PLANTES SUPERIEURES DU BURKINA FASO : APPLICATION A  
LA BIODEGRADATION DES COMPOSES PHENOLIQUES DES EFFLUENTS DE  
TANNERIE**

Soutenue le 27 Janvier 2012 devant le jury composé de :

**Président :**

**Jean KOULIDIATI**, Professeur titulaire, Université de Ouagadougou, Burkina Faso

**Membres :**

**Georges N'Guessan AMANI**, Professeur titulaire, Université d'Abobo-Adjamé, Côte d'Ivoire (**Rapporteur**)

**Mamoudou H. DICKO**, Maître de conférences, Université de Ouagadougou, Burkina Faso (**Directeur de thèse**)

**Lamine S. BABA-MOUSSA**, Maître de conférences, Université d'Abomey-Calavi, Bénin (**Rapporteur**)

**Eloi PALE**, Maître de conférences, Université de Ouagadougou, Burkina Faso

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bioinformatique (BAEBIB), à l'UFR-SVT, de l'Université de Ouagadougou. La construction de ce laboratoire a été faite grâce à un projet de recherche sur le sorgho financé par le New Partnership for African Development (NEPAD) sous le projet « West African Biosciences Network » (WABNet). Ce travail est la première thèse de doctorat générée dans ce laboratoire en germination. Nous remercions fermement le NEPAD, le WABNet ainsi que leur représentant, le Prof Diran M. MAKINDE, PhD, directeur du NEPAD-African Biosafety Network of Expertise (ABNE), au Burkina Faso.

Ce travail de thèse de doctorat de l'Université de Ouagadougou (PhD) a été réalisé sous la direction du Professeur Mamoudou Hama DICKO, mon Directeur de Recherche, qui a toujours fait preuve en mon égard. J'ai le grand honneur de l'en remercier. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Ce projet de recherche a été financé par l'Agence Universitaire de la Francophonie dans le cadre des micro-projets du groupe « Génie des Procédés Appliqués à l'Agro-Alimentaires (GP3A) ». Que cet organisme international soit assuré de mes sincères remerciements.

L'aspect purification des enzymes a été développé au laboratoire des Bioprocédés de l'Université d'Abobo-Adjamé à Abidjan (Côte d'Ivoire) sous la direction de Monsieur Patrice KOUAME, Professeur titulaire et Directeur du laboratoire qui a été très proche par ses conseils et sa bienveillance tout au long de cette thèse. C'est une joie pour moi de lui exprimer toute ma gratitude.

Je tiens à remercier le Professeur Jean KOULIDIATI, Professeur titulaire et ministre de l'environnement et du développement durable, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je vous suis reconnaissante de l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Je tiens également à remercier le Professeur Georges N'Guessan AMANI, professeur titulaire de Biochimie-Biotechnologie à l'Université d'Abobo-Adjamé pour

avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et membre de ce jury. C'est le moment de vous remercier pour m'avoir facilité notre collaboration avec le laboratoire des Bioprocédés de l'université d'Abobo-Adjamé.

Au professeur Lamine S. BABA-MOUSSA, maître de conférences à l'université d'Abomey-Calavi, je vous remercie d'avoir bien voulu être rapporteur de ma thèse et membre de ce jury.

J'adresse mes remerciements au professeur Eloie PALE, maître de conférences à l'université de Ouagadougou pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je remercie le professeur Boukaré ZEBA, Maître de conférences à l'université de Ouagadougou pour avoir accepté de consacrer son temps à l'évaluation de ce travail de thèse en tant que rapporteur.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude envers le Professeur Soumaila DABONNE, maître de conférences pour ses précieux conseils, sa disponibilité mais surtout pour sa rigueur scientifique qui m'a permis de faire progresser rapidement ce travail.

Je tiens à remercier le Docteur Imael Henri BASOLE pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail, pour sa disponibilité et ses encouragements tout au long de ce projet.

J'exprime ma profonde gratitude aux professeurs Alfred S. TRAORE, Boukaré ZEBA, Hamidou BOLY, Laya L. SAWADOGO et Nicolas BARRO pour leur soutien matériel et leur contribution dans la réalisation de ce travail.

Je suis également particulièrement reconnaissante envers le Docteur Sophie ACHO pour son aide, son écoute et son dynamisme de tous les instants, ainsi qu'envers le Docteur Hubert KONAN pour sa grande disponibilité, ses nombreux conseils et l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail au cours mes recherches à Abidjan.

Mes remerciements s'adressent également à Brice NCHO AYEKOUE, Jocelyn YAPI Judicaël KOUAME et Alphonse BOSSON, qui ont tous les quatre accepté de m'encadrer sur la paillasse durant mon stage à Abidjan. Leurs précieux conseils techniques ont également contribué à la réussite de cette thèse.

Je tiens à remercier Dr Louis Clément OBAME, Dr Olivier GNANKINE, Dr Amadé OUEDRAOGO, Dr Maurice OUEDRAOGO, Dr Roger B. BAYALA, Dr Aly SAWADOGO et Crépin DIBALA qui m'ont fourni des conseils pratiques qui me servent toujours.

Merci également aux nombreux doctorants et stagiaires de ces deux laboratoires, qui ont su contribuer avec brio aux expériences réalisées, tout en assurant une excellente ambiance de travail. Merci à Oumou KONE, Nafissétou OUEDRAOGO, Fatouma ABDOUL-LATIF, Walter MILLOGO, Romaric BAYILI, Romuald BOUA, Jérémie NANA, Patrice BAZONGO, Daniel SORO, Alizeta SAWADOGO, Bedel FOUGBUOM, Philomène ZRAN, Michel KOFFI, Hubert NYAMKE, Yve DJINA, Amélie AMENSAN, Sika BLEI, N'GOLLI, Bernard.

Le traitement statistique des données a grandement bénéficié de l'encadrement efficace de mon époux, Monsieur Dramane BAKO. Qu'il en soit également remercié.

Ces remerciements seraient bien sûr incomplets sans évoquer les autres membres de ma famille et de ma belle famille qui m'ont supporté dans les bons et moins bons moments indissociables de tout travail de recherche.

Merci aussi à tous mes ami(e)s pour leur bonne humeur, leur sincérité, leur gentillesse et leur fidélité.

Je ne saurai terminer sans remercier évidemment le Gouvernement Burkinabè qui a supporté ma thèse par une bourse d'étude.

Vraiment.....Merci à vous tous.....Jamais je n'oublierai.....

## DEDICACE

*A mon très cher époux BAKO Dramane*

*A mes très chers parents DIAO Assimi et OUBDA Fatimata*

*A ma très chère maman Tachoukakou BAKO*

## **ABREVIATIONS**

A°: Radicaux libres de composés phénoliques

An : Polymères insolubles

ATP : Adenosine Triphosphate

APX : Ascorbates peroxydases

BSA : Serum Albumine Bovin

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CCP : Cytochromes C Peroxydases

CM : Carboxy Méthyl

CP : Catalases Peroxydases

DEAE : Diethylamine Amino-Ethane

DNOC : 4,6-Dinitro-O-Crésol

EC : Enzyme Commission

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétate

FADH<sub>2</sub>: Flavine Adénine Dinucléotide

GCMS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

HRP : Horse-Radish Peroxidase

INSD: Institut National de Statistique et de la Démographie

LNAE: Laboratoire National d'Analyses des Eaux

NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

PCMB: *Para*-Chloromercuribenzoate de sodium

PEG : Polyéthylène Glycol

POX : Peroxydase

POXr : Peroxydase de Radis

POXp : Peroxydase de Patate douce

T.E.M.E.D : Tétraméthyléthylènediamine

UDP : Uridine Diphosphate

UI: Unité Internationale

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	ii
ABREVIATIONS.....	vi
TABLE DES MATIERES .....	viii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE .....	5
I. DESCRIPTION DU MATERIEL VEGETAL.....	6
I-1 <i>Allium sativum</i> L. ( <i>Liliaceae</i> ).....	6
I-2 <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam ( <i>Convolvulaceae</i> ).....	7
I-3 <i>Raphanus sativus</i> L. ( <i>Brassicaceae</i> ) .....	8
I-4 <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench ( <i>Poaceae</i> ).....	10
II. LES PEROXYDASES .....	11
II. 1 Définition .....	11
II.2 Historique.....	11
II. 3 Origine des peroxydases chez les eucaryotes .....	12
II. 4 L'oxygène dans la cellule .....	13
II.5 Classification.....	14
II.6 Structure des peroxydases.....	16
II.7 Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique.....	17
II.8 Rôles physiologiques des peroxydases.....	18
II.9 Applications biotechnologiques des peroxydases.....	20
III. GENERALITE SUR LES EAUX USEES .....	24
IV. PROBLEMATIQUES ENVIRONNEMENTALE GENEREE PAR LES POLLUANTS PHENOLIQUES .....	28
IV.1 Origine des polluants phénoliques toxiques .....	28
IV.2 Toxicité des polluants phénoliques .....	29
V. BIODÉGRADATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES PAR LES PEROXYDASES	31



VI. PRESENTATION DE L'INDUSTRIE DE TANNERIE « TAN ALIZ » DONT LES EFFLUENTS ONT ETE UTILISES.....	32
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....	34
I. MATERIEL .....	35
I.1 Produits chimiques et réactifs.....	35
I.2 Matériel biologique .....	35
II. METHODES .....	37
II.1. Comparaison des activités des peroxydases et leurs activités de biodégradation .....	37
II. 1.1 Extraction des enzymes .....	37
II.2. Purification et caractérisation des peroxydases efficaces dans la biodégradation .....	41
II.2.1. Préparation des extraits bruts.....	41
II.2.2. Techniques de purification des peroxydases.....	41
II.2. 3 détermination des propriétés moléculaires des peroxydases purifiées .....	46
II.2.4 détermination des caractéristiques physico-chimiques des peroxydases purifiées .....	48
II.2.5 Détermination de l'effet des agents chimiques .....	49
II.2.6 Détermination de la spécificité pour les substrats phénoliques.....	50
CHAPITRE III : RESULTATS-DISCUSSION .....	51
I. SCREENNING DES ACTIVITES DES PEROXYDASES ET LEURS ACTIVITES DE BIODEGRADATION.....	52
I .1. Comparaison des activités peroxydasiques des quatre plantes.....	52
I.2. Comparaison des pHs et des températures optima.....	53
I. 3. Etude de la biodégradation des eaux phénoliques .....	54
I.4. Etude de la biodégradation des composés phénoliques des eaux usées .....	57
II. PURIFICATION ET CARACTERISATION DES PEROXYDASES DE RADIS ET DE PATATE DOUCE.....	61
II.1. Etapes de purification.....	61

II.2. Bilan de la purification .....	64
II.3. Détermination des propriétés moléculaires des peroxydases purifiées.....	65
II.4. Propriétés physico-chimiques des peroxydases de radis et de patate douce .....	67
II.5. Etude de l'effet des agents chimiques sur l'activité des peroxydases .....	73
II.6. Test de spécificité de substrat .....	76
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	80
LISTE DES PUBLICATIONS .....	96
ANNEXES: PUBLICATIONS .....	97

## LISTE DES FIGURES

Figure 1:Gousse de <i>Allium sativum</i> .....	6
Figure 2:Tubercules d' <i>Ipomoea batatas</i> .....	7
Figure 3:Les tubercules de <i>Raphanus sativus</i> .....	9
Figure 4:Les grains non germés et des grains germés de <i>Sorghum bicolor sariasso 11</i> .....	10
Figure 5:Structure tridimensionnelle de la peroxydase de l'orge .....	16
Figure 6:Mécanisme de catalyse des peroxydases. ....	17
Figure 7:Mécanisme réactionnel développé.....	18
Figure 8:Exemples de composés phénoliques à plusieurs noyaux benzéniques .....	30
Figure 9:Exemples de Dihydroxyphénols et trihydroxyphénols.....	30
Figure 10:Exemples d'alkyl phénols .....	31
Figure 11:Exemples de phénols substitués.....	31
Figure 12:Dégradation des composés phénoliques en fonction du temps de réaction avec l'enzyme. ....	56
Figure 13:Dégradation des composés phénoliques des eaux usées en fonction de la quantité d'extrait enzymatique .....	60
Figure 14:Profil chromatographique des peroxydases de l'extrait brut de radis sur le gel CM-Sepharose CL-6B. ....	61
Figure 15:Profil chromatographique de la peroxydase POXr1 de radis sur gel DEAE-Sepharose CL-6B. ....	62
Figure 16:Profil chromatographique de la peroxydase POXr2 de radis sur gel Phényl-Sepharose CL-4B. ....	62
Figure 17:Profil chromatographique de la peroxydase de patate douce POXp sur gel Sephacryl S-200 HR. ....	63
Figure 18:Profil chromatographique des peroxydases de patate douce sur le gel DEAE-Sepharose CL-6B. ....	64
Figure 19:Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % (p/v) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des peroxydases POXr1 et POXr2 de radis et POXp de patate douce.....	66
Figure 20:pH optimum de la peroxydase de patate douce POXp. ....	68
Figure 21:pH optimum de la peroxydase POXr1 de radis.....	68

Figure 22:pH optimum de la peroxydase POXr2 de radis.....	69
Figure 23:Influence du pH et de la nature du tampon sur l'activité de la peroxydase de patate douce POXp. ....	70
Figure 24:Influence du pH et de la nature du tampon sur l'activité de la peroxydase POXr1 de radis.....	70
Figure 25:Influence du pH et de la nature du tampon sur l'activité de la peroxydase POXr2 de radis.....	71
Figure 26:Température optimale des peroxydases POXp, POXr1 et POXr2. ....	72
Figure 27: Dénaturation thermique des peroxydases POXp, POXr1 et POXr2 .....	72

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: comparaison des activités des peroxydases de quatre (04) plantes .....	53
Tableau II: Comparaison des pH et des températures optimum d'activité des peroxydases de quatre (04) plantes supérieures.....	54
Tableau III: Bilan global de la purification de la peroxydase de <i>Raphanus sativus</i> .....	65
Tableau IV: Bilan de purification de la peroxydase du tubercule de <i>Ipomoea batatas</i> .....	65
Tableau V: Effet des ions cationiques sur l'activité des peroxydases de radis et de patate ...	74
Tableau VI: Effet des détergents et des agents réducteurs sur l'activité des peroxydases de radis et de patate douce .....	75
Tableau VII: Test de spécificité des substrats.....	77

## RESUME

L'objectif majeur de cette étude est d'analyser les capacités des enzymes telles que les peroxydases isolées des plantes locales dans la biodégradation des composés phénoliques contenus dans les effluents d'industries de tannerie. Les techniques d'amélioration des processus enzymatiques de biodégradation de ces composés sont également discutées dans ce travail. Un screening des activités peroxydasiques a été fait à partir de quatre plantes supérieures du Burkina Faso : *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* et le *Sorghum bicolor*. Ces plantes ont été ciblées pour rechercher de nouvelles sources de peroxydases pour la dégradation des composés phénoliques des effluents émanant des industries de tannerie. Parmi toutes ces quatre plantes, le radis et la patate douce ont été retenus comme sources pour la purification des peroxydases en raison de leur forte capacité à dégrader les composés phénoliques. Ces enzymes ont été donc purifiées et caractérisées pour une meilleure maîtrise des conditions optima de catalyse enzymatique. La purification de ces peroxydases a été faite par extraction des enzymes suivie des méthodes de chromatographie d'échange d'anions, chromatographie d'échange de cations, chromatographie d'exclusion moléculaire et chromatographie d'interaction hydrophobique. Ainsi, deux peroxydases (POXr1 et POXr2) ont été purifiées à partir de l'extrait brut enzymatique de radis et une seule peroxydase (POXp) a été purifiée avec l'extrait de patate douce. L'étude des propriétés moléculaires indique que ces trois peroxydases sont monomériques avec des poids moléculaires variant de 40 à 70 kDa. L'étude des propriétés physico-chimiques indique que ces enzymes ont leur pH optimum d'oxydation compris entre pH 5,6 et 6,0 et leurs températures optimales variant de 35 à 45°C. Elles sont activées par certains composés chimiques tels que le  $Ba^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , le  $Mg^{2+}$  et Polyéthylène glycol. Par contre, ces peroxydases sont inhibées par les cations  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , et les composés réducteurs. L'efficacité des peroxydases pour la catalyse dépend étroitement de la nature du substrat mais aussi de la source botanique des enzymes. Ces enzymes dégradent non seulement les composés phénoliques libres mais aussi ceux contenus dans les effluents des industries de tannerie. La peroxydase du radis possède la plus grande efficacité catalytique. Les résultats montrent que ces peroxydases dégradent les composés

phénoliques présent des les industries de tannerie locale telle que l'industrie TAN-ALIZ de Ouagadougou. La détoxification des effluents industriels par ces enzymes est fortement améliorée par la présence du polyéthylène glycol dans le milieu réactionnel. Cette contribution montre la possibilité d'utilisation des enzymes de sources locales pour la bio-préservation de l'environnement.

**Mots clés** : Peroxydase, Activité, Composés phénoliques, Plante, Biodépollution, Polyéthylène glycol

## SUMMARY

A screening of peroxidase activity was carried out from four plants of Burkina Faso: *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor*. These plants have been targeted to find a new source of peroxidases for the degradation of wastewater containing phenolic compounds from leather industry. Among these plants, radish and sweet potato have been identified as the best peroxidase sources. These enzymes were then purified and characterized for a better control of their optimal conditions for enzymatic catalysis. Purification of these peroxidases was performed by extraction of enzymes followed by the methods of liquid chromatography, e.g. anion exchange, cation exchange, and hydrophobic interaction. Thus, two peroxidases (POXr1 and POXr2) were isolated from the crude radish enzymatic extract and a single peroxidase (POXp) was obtained with the extract of sweet potato. The study of molecular properties showed that these three peroxidases are monomeric proteins with molecular masses ranging from 40 to 70 kDa. The study of physicochemical properties indicates that these enzymes had their optimum oxidation pH between pH 5.6 and 6.0 and optimal temperatures ranging from 35 to 45 °C. They are activated by certain chemical compounds such as Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and polyethylene glycol. However, these peroxidases are inhibited by Mn<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and all reducing compounds. These enzymes degrade aqueous phenolic compounds. Radish peroxidase has the highest catalytic efficiency. Efficiency of peroxidase catalysis depends strongly on the chemical nature of phenolic substrates and on the botanical source of the enzymes. Results also show that POXs can also remove phenolic compounds present in industrial wastewater from leather industry. Detoxification of industrial effluents by these enzymes is greatly enhanced by the presence of polyethylene glycol in the reaction medium. This contribution shows the possibility of using local enzymes for environmental bio-protection.

**Keywords:** Peroxidase, Phenolic compounds, *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor*, Biodepollution, Polyethylene glycol



# **INTRODUCTION GENERALE**

Au Burkina Faso, la production du cuir, occupe une place importante dans l'économie du pays (**INSD, 2011**). Cependant elle constitue une source de problème environnemental. On estime à environ 250.000 m<sup>3</sup> la production annuelle d'eaux résiduaires, de ce secteur (**LNAE, 2008**). En plus de la charge organique apportée par les peaux d'animaux, ces effluents sont pollués par les composés phénoliques lors du processus de retannage (**Kibora, 2011**). Cependant ces composés se trouvent sur de nombreuses listes de polluants les plus néfastes (**Mackay, 1991**). Ce sont des composés toxiques et potentiellement cancérigènes (**Belaid et al., 2002**). En plus de la toxicité aiguë, certains polluants phénoliques tels que les bisphénols A et les alkylphénols possèdent des activités endocriniennes potentielles de perturbation, même à très faibles concentrations (**Singleton et Khan, 2003**). D'autres s'accumulent dans les êtres vivants (**Nath et al., 1997**) et passent d'un maillon de la chaîne alimentaire à un autre entraînant des perturbations importantes dans les équilibres biologiques (**Nair et al., 2008**). Même pour les composés polyphénoliques réputés posséder des propriétés biologiques intéressantes comme antioxydants, ils peuvent également être pro-oxydants ou inhibiteurs d'enzymes hydrolytiques (**Escher, 1995**). C'est le cas par exemple des tanins non hydrolysables (proanthocyanidines), qui sont des substances biologiquement actives mais inhibiteurs des hydrolases et réduisent la digestibilité des protéines. En solution les phénols sont le siège d'oxydations secondaires. Ces réactions aboutissent à des composés qui peuvent se lier aux protéines pour former des complexes indigestibles. Ainsi ils sont considérés comme pouvant être des facteurs antinutritionnels pour les ruminants et les monogastriques (**Arunachalam et al., 2003**). Ils peuvent inhiber la croissance de certains microorganismes ainsi que les enzymes impliquées dans la décomposition des polluants organiques (**Scalbert, 1991**).

De ce fait, le rejet de ces composés dans les rivières et les borbiers sans aucun traitement préalable pose de sérieux problèmes pour le système aquatique.

Plusieurs travaux relatifs aux traitements des rejets liquides contenant des composés phénoliques ont été publiés. Les procédés employés pour leur élimination font généralement appel aux techniques électrochimiques, à l'irradiation, à l'osmose inverse, à l'adsorption au charbon actif et aux oxydations bactériennes et chimiques. Cependant ces méthodes courantes de dépollution souffrent de quelques

inconvenients que sont le coût élevé, la faible efficacité, l'applicabilité limitée, la consommation de haute énergie et habituellement ces traitements peuvent avoir comme conséquence la production de sous-produits toxiques. etc. (**Liu et al., 2002; Bratkovskaja et al., 2004, Regalado et al., 2004** ). Par conséquent, de nombreuses études sont menées en vue de trouver une alternative à moindre coût adaptée aux pays en développement, permettant l'élimination de ces composés toxiques. La présente étude s'inscrit dans le même cadre. Récemment, **Ikehata et al., 2004** ont essayé une approche originale pour résoudre ce problème, en proposant l'utilisation des enzymes oxydatives car elles présentent une grande efficacité, une grande sélectivité et leurs réactions sont sans dangers pour l'environnement. Les peroxydases représentent la famille enzymatique la plus intéressante dans ce genre d'étude, à cause de leur capacité à oxyder une large gamme de substrats phénoliques (**Regalado et al., 2004**). Les peroxydases transforment plus de deux cents substrats y compris les pesticides et les produits dérivés des animaux (poils, protéines animales, os, etc.) (**Silaghi-Dumitrescu, 2003**). Cette dégradation commence par une oxydation catalytique des composés phénoliques par les peroxydases en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour former des radicaux libres. Les radicaux libres subissent des réactions de polymérisation non enzymatiques pour donner des polymères insolubles dans l'eau (**Dunford, 1999 ; Tonegawa et al, 2003**) qui seront ensuite éliminés par des techniques physiques telles que la filtration, la sédimentation ou la centrifugation.

Cependant, durant la catalyse, ces enzymes peuvent s'inactiver. Cette inactivation pourrait être due à la formation de radicaux libres présents lors de la réaction enzymatique. Ces radicaux adsorbés sur le site actif des enzymes peuvent bloquer ainsi l'oxydation des substrats (**Bratkovskaja et al., 2004**). L'inactivation des enzymes peut être évitée en utilisant des additifs tels que le borate, le polyéthylène glycol (PEG), la gélatine, etc (**Wagner and Nicell, 2002 ; Akhtar and Husain, 2006 ; Ashraf and Husain, 2009**). Au Burkina Faso, des travaux réalisés sur dix espèces de plantes, ont montré que *Raphanus sativus*, *Ipomoea batatas*, *Sorghum bicolor* et *Allium sativum* contiennent des quantités abondantes de peroxydases.

L'objectif majeur de cette étude est d'analyser les capacités des peroxydases isolées de ces plantes locales dans la biodégradation des composés phénoliques contenus

dans les effluents de tannerie. Les techniques d'amélioration des processus enzymatiques sont également discutées dans ce travail

Les objectifs spécifiques consistent à :

- Identifier des espèces végétales qui peuvent servir de sources moins chères de peroxydases,
- Evaluer la biodégradation des composés phénoliques par les extraits peroxydasiques bruts.
- Caractériser ces peroxydases pour mieux appréhender leurs propriétés catalytiques et leurs conditions optimales de transformations de substrats.

# **CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE**

## I. DESCRIPTION DU MATERIEL VEGETAL

### I-1 *Allium sativum* L. (*Liliaceae*)

Nom courant : Français : l'ail ; Anglais : garlic ; Mooré : leye ; Dioula : layi ; Fulfuldé : laye.

#### I-1-1 Description botanique

Plante herbacée vivace par son bulbe. Le bulbe est formé de caïeux ou gousses entourées par une pellicule écailleuse blanchâtre ou rougeâtre. Les feuilles sont allongées et plates avec des nervures principales. La plante entière dégage une odeur forte piquante (**Nacoulma, 1996**).



**Figure 1:**Gousse de *Allium sativum* (Photo Diao, 2009)

#### I-1-2 Composition biochimique

L'ail renferme des vitamines A, B1, B2, B3, C et E, divers antibiotiques naturels, des agents anticoagulants ainsi que des anticholestérolémiants, des huiles essentielles, du sélénium, etc. Le bulbe frais renferme des matières minérales (Zn, Mn, I, S, Si) (**Stajner et Varga, 2003**), particulièrement certaines enzymes telles que les superoxyde-dismutases, les catalases, les peroxydases, les glutathione-reductases, les glutathione S-transferases (**Csiszár et al., 2007**), les alliline-lyases (alliinase) (**Shimon et al., 2002**), etc.

### I-1-3 Utilisation courante

Les gousses de l'ail sont utilisées comme ingrédient de plusieurs plats cuisinés. Les extraits d'ail sont utilisés contre divers maux liés aux activités anti-carcinogéniques, anti-arthérosclérotiques, anti-thrombotiques, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antioxydantes (**Nencini *et al.*, 2007**).

### I-2 *Ipomoea batatas* (L.) Lam (Convolvulaceae)

Nom courant : Français : patate douce ; Anglais : sweet potatoe ; Moore : nayur noodo ; Dioula : wosso ; Fulfulde : koudakou

#### I-2 -1 Description botanique

Plante peu volubile aux longues tiges annuelles grasses, flexibles, courant sur le sol par croissance à partir d'un tubercule. Les tubercules sont ronds ou allongés, piriformes, blancs, jaunes, rouges ou violets à l'extérieur. La pulpe ou chaire est blanche, orange, etc., de saveur sucrée, onctueuse ou farineuse. Originaire d'Amérique tropicale (sud et centre), elle est cultivée dans la plupart des pays chauds et humides (**Nacoulma, 1996**).



**Figure 2:** Tubercules d'*Ipomoea batatas* (Photo Diao, 2009)

## **I-2-2 Composition biochimique**

Le tubercule d'*Ipomoea batatas* ou patate douce est composé en majorité d'eau, de glucides, des vitamines B1, B2, B3, C et des oligo-éléments (Nacoulma, 1996). Il est riche en enzymes d'intérêt industriel tels que les peroxydases (Castillo *et al.*, 2002), chitinase (Chun-Yi et Chung-Sheng, 2008) et les amylases ( Rajapakse *et al.*, 2004).

## **I-2-3 Utilisation courante**

Les tubercules et les feuilles sont utilisés comme aliment. Cependant, ces tubercules contiennent également des activités antiseptique, anti-inflammatoire, antibiotique, antiphlogistique, etc. (Nacoulma, 1996).

## **I-3 *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae)**

Nom courant : Français : Radis; Anglais : Radish

### **I-3-1 Description botanique**

*Raphanus sativus* appelé en français le radis rouge est une plante potagère bisannuelle à racine comestible appartenant à la famille des *Brassicacées*. Ces tubercules sont ronds ou allongés. Ils peuvent être parfaitement bicolores (rouge et blanc) ou avec une toute petite portion en blanc. La chaire blanche, crème ou parfois rouge est juteuse et croquante.





**Figure 3: Les tubercules de *Raphanus sativus*** (Photo Diao, 2009)

Il existe d'autres variétés de radis comme le radis blanc et le radis noir. Les radis noirs (*Raphanus sativus* var. Niger), en anglais « horseradish » sont des radis longs et trapus. Parfois appelés raifort bien qu'ils ne soient pas du même genre, ils sont beaucoup plus grands et plus épicés. Ce sont des radis à la peau noire dure. Les radis blancs ou orientaux ou radis japonais (*Raphanus sativus* var. longipinnatus), en anglais daikon radish, ont de longues racines blanches et coniques. Ils sont originaires d'Asie et sont vendus sous le nom de Navet. Parfois appelés « daikon », ils ont une saveur douce.

### **I-3-2 Composition biochimique**

Les radis sont riches en fibres, en minéraux (potassium, calcium, fer ...) et en vitamines : B et C (de l'ordre de 30 % du besoin quotidien), ce qui les classe comme des « alicaments » antiscorbutiques de premières classes. Ils constituent les principales sources de peroxydases commerciales (**Agostini et al., 2002**). Ils renferment également d'autres enzymes commerciales telles que les protéases et les amylases.

### **I-3-3 Utilisation courante**

Les radis sont utilisés dans l'alimentation humaine et animale. Le radis noir est traditionnellement utilisé en phytothérapie.

#### ***I-4 Sorghum bicolor (L.) Moench (Poaceae)***

Nom courant : Français : sorgho grain, gros mil, millet indien, blé égyptien. Anglais : sorghum ; Moré : baninga (variété aux grains blancs) ou kaziiega (variété aux grains rouges) ; Dioula : Bimbri ; Foulfouldé : M'bayéri

Il existe cinq races de sorgho : *Sorghum bicolor* ; *Sorghum vulgare* ; *Sorghum caudatum* ; *Sorghum kafir* ; *Sorghum guinea* ; et *Sorghum durra*.

##### **I-4-1 Description botanique**

C'est une graminée pouvant atteindre 5 m de haut, à la tige renflée aux nœuds d'où partent les feuilles. La tige se prolonge par une grappe de fleurs se transformant en grappes de grains. Une enveloppe (jaune, brune, rouge ou noire selon la variété) entoure en partie le grain et y adhère. La plante serait originaire d'Afrique plus précisément d'Ethiopie. Le sorgho est cultivé actuellement dans les régions subtropicales.



**Figure 4: Les grains non germés et des grains germés de *Sorghum bicolor sariasso 11* ( Photo Diao, 2009)**

##### **I-4-2 composition biochimique**

Les grains entiers contiennent 65-80 % de glucides, 7-15 % de protéines, 1,5-6 % de lipides, du phosphore, du Fer, des vitamines B3, A, des stérols et des lectines. Les grains germés contiennent en plus des vitamines B1, B2, E, des enzymes (amylases, peroxydases) et des minéraux (Ca, P, Mg) (**Dicko, 2005**).

### I-4-3 utilisation courante

Les grains sont utilisés dans l'alimentation humaine et animale. Les grains (séchés, germés ou non) ont des applications thérapeutiques.

## II. LES PEROXYDASES

### II. 1 Définition

Les peroxydases sont des protéines à hème, capables de catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats phénoliques, en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou l'hydroperoxyde organique comme accepteur d'électron (**Delannoy et al., 2004**)

### II.2 Historique

En **1810**, **Planche** décrit l'apparition d'une couleur bleue, sur des morceaux de racines de raifort, incubés dans de la teinture gaïac. En **1818**, **Thénard** fut le premier à décrire les propriétés de l'eau oxygénée et **Schönbein**, en **1855**, décrit l'oxydation de certains composés organiques catalysée par les extraits issus de plantes ou d'animaux, en présence de solution diluée de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le nom de peroxydase fut donné en **1898** par **Linossier** à un extrait de pus humain présentant les mêmes activités (**Saunders et al., 1964**). Les peroxydases de raifort furent l'outil de base des premiers travaux sur les peroxydases végétales (**Theorell, 1942**) et c'est en 1976 grâce aux travaux de Braithwaite, d'une part et de Welinder, d'autre part, qu'on a pu avoir une première image cristalline d'une de ces enzymes ainsi que la première séquence protéique. Le phénomène d'oxydation des composés phénoliques par les peroxydases est bien reconnu depuis le début des années 1960 (**Brown, 1967**), mais son application au traitement des eaux usées est survenue quelques 15 années plus tard (**Klibanov et Morris, 1981**). Avec les travaux pionniers de **Klibanov et al. (1980)**, plusieurs études ont montré que les peroxydases purifiées, ou des matières végétales présentant de fortes activités peroxydasiques

sont capables de dégrader plusieurs composés phénoliques. Parmi ces composés l'on pourrait citer les plus récalcitrants tels que le naphthol (**Ashraf et Husain, 2010**) ; crésol, le 2,4-dichlorophénol et le 4,4'-isopropylidènediphénol communément appelé bisphénol A (**Caza et al., 1999**), le pentachlorophénol (**Zhang et Nicell, 2000** ; **Santos de Araujo et al., 2006**) et les amines aromatiques (**Nicell et al., 1993**).

### **II. 3 Origine des peroxydases chez les eucaryotes**

D'un point de vue évolutif, l'apparition et le développement des cellules eucaryotes se font grâce à la phagocytose puis l'endosymbiose avec certains procaryotes. D'après **De Duve, 1996**, les premières cellules eucaryotes étaient des phagocytes hétérotrophes qui vivaient au dépend des cellules procaryotes. Il y a deux milliards d'années, l'apparition des cyanobactéries capables d'utiliser l'énergie photonique pour fabriquer des carbohydrates, à partir du CO<sub>2</sub> et de l'eau a conduit à une production importante d'oxygène dans l'atmosphère. Même si la concentration d'oxygène était très faible dans l'atmosphère, elle était suffisante pour être nocive aux individus anaérobies. Il semblerait que durant cette époque, des cellules eucaryotes aient été phagocytées par les précurseurs de peroxyosomes, les procaryotes qui possédaient la machinerie nécessaire pour lutter contre les attaques de l'oxygène (superoxyde dismutase, catalases et peroxydases). Les cellules eucaryotes purent ainsi continuées à se développer dans un environnement qui devenait hostile pour leurs ancêtres nourriciers. Cette nouvelle association aurait permis à ces cellules de produire de nouvelles molécules qui leur conféraient des avantages évolutifs. Cette association devenait indispensable au fil de l'évolution, les cellules eucaryotes ont intégré petit à petit le génome de leur invité. La concentration de l'oxygène devenait de plus en plus importante dans l'atmosphère, le peroxyosome n'est plus suffisant pour être efficace, l'endosymbiose avec l'ancêtre de mitochondrie produit un avantage évolutif tel qu'il semblerait que toutes les mitochondries des eucaryotes aient le même ancêtre commun. Il faut noter que dans le cas des mitochondries, l'utilisation d'oxygène produit de l'énergie grâce à la chaîne respiratoire terminale. Avec cette nouvelle association, le rôle des peroxyosomes devient encore plus spécifique, ce serait peut être pour cela qu'il aurait perdu la

totalité de leur génome, pour n'être plus qu'un cristal de protéine. Ainsi les eucaryotes purent continuer à se développer librement et d'autres phénomènes d'endosymbiose avec les cyanobactéries permirent l'apparition des premières cellules eucaryotes entièrement autotrophes.

## II. 4 L'oxygène dans la cellule

L'oxygène atmosphérique, assez peu réactif, est le dernier accepteur d'électron de la chaîne respiratoire cellulaire, les fuites d'électron dans la chaîne respiratoire produisent l'oxygène radicalaire ( $O_2^-$ ) générant ensuite la formation de radical hydroxyl ( $OH^-$ ). Cette molécule de superoxyde doit donc être très rapidement éliminée car elle peut être à l'origine de dégâts irréparables dans la cellule, au niveau des protéines et le matériel génétique. C'est le rôle de la superoxyde dismutase qui conduit à la formation de  $H_2O_2$ , un composé un peu moins réactif, mais toujours nocif. A cet instant, deux familles d'enzymes peuvent intervenir, la catalase qui à partir de deux molécules de  $H_2O_2$ , produit deux molécules de  $H_2O$  et une molécule de  $O_2$  atmosphérique et les peroxydases qui peuvent utiliser le  $H_2O_2$  pour des fins métaboliques. Ainsi, les peroxydases peuvent utiliser la réactivité du  $H_2O_2$  pour oxyder des métabolites donc intervenir dans le catabolisme ou l'anabolisme de certaines molécules. Elles peuvent ainsi permettre la polymérisation de certains substrats ainsi que la destruction d'autres polymères. De plus dans d'autres conditions, il semblerait que les peroxydases soient capables elles aussi de produire des molécules de  $H_2O_2$  (**Penel, 2000**). Ainsi de par leur action possible dans de nombreux mécanismes biochimiques impliquant le processus d'oxydoréduction, ces enzymes se retrouvent impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Elles interviennent dans la polymérisation de la lignine, donc leur activité agit sur l'expansion cellulaire. Elles permettent le catabolisme de certaines molécules, comme l'auxine, la biosynthèse d'autres molécules, certains alcaloïdes ou encore les polyamines. Enfin, de part leur possibilité de produire du  $H_2O_2$ , elles peuvent intervenir dans les réactions de défenses, lors d'attaques par des pathogènes, ainsi que dans les processus de mort cellulaire (apoptose, nécrose).

## II.5 Classification

Les peroxydases (numéro EC 1.11.1.X) regroupent une grande famille d'enzymes. Elles appartiennent à la famille des oxydoréductases, en accord avec la nomenclature officielle. Ce sont des enzymes ubiquitaires retrouvées dans les plantes, les animaux et les microorganismes (**Colonna et al., 1999**). Les peroxydases de plantes ont été regroupées avec les peroxydases des bactéries et des champignons en une seule superfamille (**Welinder, 1992**). Dans cette superfamille, toutes les peroxydases sont composées de protéines qui présentent toutes une structure tridimensionnelle similaire (**Smulevich et al., 2006**). Elles réduisent toutes l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) en  $H_2O$ , mais oxydent des substrats très différents. La superfamille est subdivisée en trois classes distinctes, qui diffèrent principalement par leur séquence peptidique primaire, le nombre d'ions calcium et de leurs origines (**Welinder, 1992**) :

La classe I comprend trois types de peroxydases. Elles sont intracellulaires et comprennent :

- Les ascorbates peroxydases (APX) se trouvent dans les cellules chloroplastiques de plantes, et utilisent principalement l'ascorbate pour éliminer l'excès de  $H_2O_2$  produit lors de la photosynthèse (**Asada, 1992**).
- Les cytochromes c peroxydases (CCP) sont liées aux mitochondries et servent aussi à réduire l'eau oxygénée (produite par la respiration) en oxydant le cytochrome c (**Erman et Vitello, 2002**),
- Les catalases peroxydases (CP), elles ont principalement le rôle de catalases (**Obinger et al., 1999**) et se retrouvent chez de nombreuses bactéries et quelques champignons.

Les peroxydases de classe II jouent un rôle essentiel dans la dégradation des déchets organiques du sol. Elles sont capables d'oxyder des substrats à très haut potentiel redox, en particulier la lignine (**Gold et Alic, 1993**). On trouve dans cette classe les lignines peroxydases, les manganèses peroxydases et les versatiles peroxydases. Les lignines peroxydases oxydent directement leurs substrats (**Poulos et al., 1993**) alors que les manganèses peroxydases relâchent des ions  $Mn^{3+}$  (sous forme de chélates organiques) qui, à leur tour, oxydent des molécules à hauts

potentiels redox (**Gold et Alic, 1993**). Enfin, les peroxydases dites « versatiles » (VP) peuvent effectuer les deux types de mécanismes (**Ruiz-Dueñas et al., 2001**).

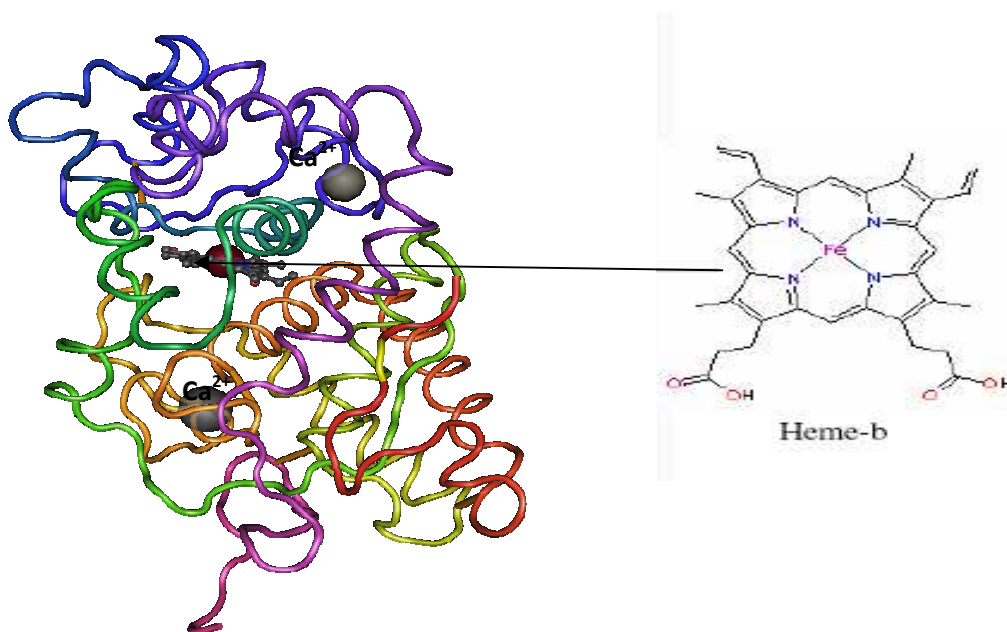
Les peroxydases de classe III sont typiques des plantes vertes. Elles sont encore appelées peroxydases sécrétées (**Penel et al., 2004**). Contrairement aux peroxydases des deux classes précédentes, les peroxydases de classe III forment des familles multigéniques de plusieurs dizaines de gènes. Une des conséquences majeures du nombre important d'isoformes est la difficulté de pouvoir déterminer un rôle précis pour chacune de ces peroxydases dans les plantes. En plus du nombre élevé d'isoformes, les peroxydases de classe III ne présentent pas d'affinité particulière pour une molécule *in vitro*. De ce fait, elles peuvent oxyder efficacement un nombre incalculable de substrats aromatiques. Malgré cette diversité dans la transformation des substrats, on sait maintenant que les peroxydases ont de très nombreuses fonctions *in vivo*, telles que la construction de la paroi cellulaire, la synthèse de la lignine, l'hydroxylation des dérivés aromatiques, la croissance par élongation, la défense contre les pathogènes ou la sénescence (**Hiraga et al., 2001**), etc.

Les peroxydases des mammifères forment quant à elles seules une superfamille qui regroupe : la myeloperoxydase, la éosinophile peroxydase, la lactoperoxydase, la thyroïde peroxydase, la prostaglandine H synthase, la peroxydasine, etc (**Welinder, 1992**).

Il existe une autre superfamille qui est celle des catalases (EC : 1.11.1.X). Ces enzymes décomposent l'eau oxygénée en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>.

## II.6 Structure des peroxydases

Les peroxydases sont des hémoglycoprotéines. Elles sont caractérisées par la présence d'un hème central de type-b, pris en sandwich entre le domaine distal (extrémité N- terminal) et le domaine proximal (Extrémité C-terminal) de la protéine. De ce fait, l'hème constitue le groupement prosthétique de l'enzyme et la chaîne polypeptidique est l'apoenzyme (**Henriksen *et al.*, 1998**). Il y a trois genres d'hème biologiquement importants (a, b et c) mais le plus commun dans les peroxydases est l'hème b. La liaison entre la protéine et l'hème n'est pas covalente et l'état d'oxydation du fer est III ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (**Dunford, 1999**). Les peroxydases ont aussi deux sites de liaison pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Le calcium est supposé stabiliser la protéine et n'intervient pas au niveau du site catalytique, même si sa présence influence fortement l'activité de l'enzyme. On sait depuis longtemps que la plupart des peroxydases sont fortement glycosylées, les résidus glucidiques peuvent représenter jusqu'à 10 % du poids de l'enzyme.

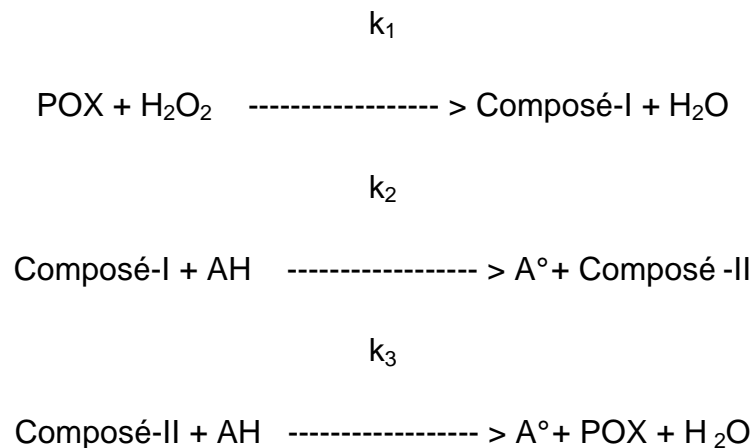


**Figure 5: Structure tridimensionnelle de la peroxydase de l'orge** (« barley peroxidase BP1»). L'hème et les ions calcium structuraux sont indiqués



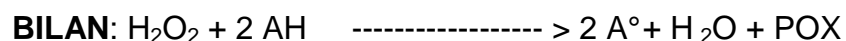
## II.7 Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique

Les peroxydases [donor : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxydoréductase, EC. 1.11.1.7] sont des enzymes non michaéliennes (**Dunford, 1999**). L'action de ces enzymes nécessite la présence à la fois d'un composé phénolique et de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Cependant cette dernière peut être générée par les peroxydases par oxydation des acides carboxyliques. La catalyse déclenchée par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permet la formation d'enzymes transitoires (composés I, II). En réagissant avec un donneur d'hydrogène (AH), les composés I et II donnent naissance à des radicaux libres (A°) qui peuvent former des polymères en réagissant entre eux.

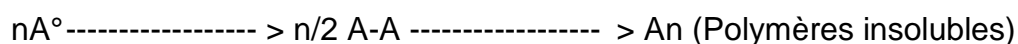



---

POX

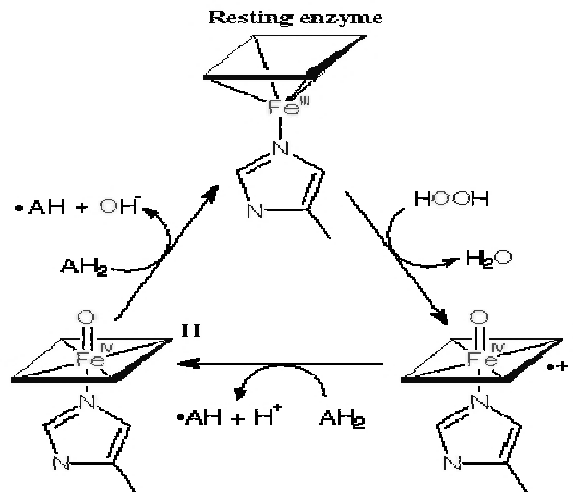


Ces radicaux A° subissent des réactions de polymérisation non enzymatiques pour donner des polymères insolubles dans l'eau.



**Figure 6: Mécanisme de catalyse des peroxydases (Dunford, 1999).**  
AH, donneur d'hydrogène.

Les constantes k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>, k<sub>3</sub> sont respectivement des constantes cinétiques de la formation des composés-I, composés-II, et de la régénération de l'enzyme. AH est un composé phénolique et A° son radical correspondant. POX= peroxydase native.



**Figure 7: Mécanisme réactionnel développé (Castagnetto, 1999).**  
 AH : donneur d'hydrogène.

Tout d'abord, un équivalent de peroxyde d'hydrogène réagit avec l'enzyme pour donner le composé I, c'est à dire un cation radical porphyrine, l'enzyme réagit avec un atome de fer tétravalent. Cela constitue une réaction d'oxydo-réduction où le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est réduit en  $\text{H}_2\text{O}$  et l'enzyme est oxydée. Un équivalent oxydant réside sur le fer, générant l'oxyferryl ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) comme intermédiaire. Le composé I oxyde le substrat pour donner le radical (AH). Il subit une seconde oxydation générant le composé II qui contient un centre oxyferryl coordonné à un ligand porphyrinique normal (dianionique). Finalement, le composé II est réduit à l'état ferrique natif. La charge nette du composé I est +1 alors que celle du composé II est neutre.

## II.8 Rôles physiologiques des peroxydases

Les peroxydases interviennent dans le processus de croissance. Ce rôle intervient à partir de la régulation du taux circulant de l'acide indole-3-acétique (AIA) ou auxine par le biais de son catabolisme oxydatif. Les peroxydases interviennent aussi dans la perte de la plasticité des parois cellulaires en formant des ponts phénoliques entre les polymères de paroi (**Biggs et Fry, 1987**). Ce dernier processus conduit à une rigidification irréversible de la paroi qui empêche une expansion cellulaire par l'augmentation de la pression de turgescence. Les études mettant en relation le taux endogène de l'activité des peroxydases avec la croissance cellulaire ont montré que le nanisme végétal est généralement associé à une augmentation de l'activité

peroxydasique dans la fraction pariétale (**Evans, 1990**). Les effets de la lumière sur la croissance peuvent être expliqués sur la base d'un contrôle du taux de régulation des différentes peroxydases extracellulaires. Il a été montré que des augmentations de l'activité peroxydasique sont concomitantes avec un arrêt de la croissance (**Bredemeijer et Burg, 1988**).

Les peroxydases sont également impliquées dans le catabolisme de l'auxine. Elles peuvent utiliser l'auxine comme substrat *in vitro* conduisant à une oxydation decarboxylative de plusieurs manières (**Gaspar et al, 1982**). La voie non decarboxylative, pour l'oxydation de l'auxine a été observée chez plusieurs plantes et n'est pas catalysée par les peroxydases (**Reinecke et Bandurski, 1988**).

Les peroxydases interviennent dans la biosynthèse de l'éthylène en oxydant l'acide 1-amino-cyclopropane-1-décarboxylique (ACC). Cette hormone est impliquée dans la réponse des tissus au stress.

Les peroxydases interviennent dans le processus de développement de la plante. Plusieurs études ont investigué l'activité peroxydasique et le profil des isoperoxydases en relation avec les différents processus de développement végétal : l'abscission (**Gaspar et al., 1978**), la maturation des fruits (**Rothan et Nicola, 1989**), la germination des grains (**Lewak, 1986**), la sénescence (**Abeles et al., 1988**), la pollinisation (**Bredemeijer et Blaas, 1983**), la différenciation sexuelle (**Ghosh et Basu, 1984**), l'induction florale ou lors de l'organogénèse de bourgeons végétatifs et floraux (**Kay et Basile, 1987**). Les changements dans les activités et/ou les profils des peroxydases sont corrélés avec la plupart des événements physiologiques.

Chez la plante, les peroxydases peuvent prévenir efficacement les effets néfastes des agents oxydants en réduisant le taux des hydroperoxydes.

## II.9 Applications biotechnologiques des peroxydases

La peroxydase de raifort (« horseradish peroxidase », HRP) est l'enzyme la plus couramment utilisée pour les applications analytiques. Toutefois, les peroxydases provenant d'autres sources semblent être une bonne alternative en tant que substituts pour HRP.

- **Peroxydase dans le génie de l'environnement**

Les peroxydases sont employées comme catalyseurs dans la bioremédiation des composés phénoliques à savoir le traitement des eaux usées contenant des composés phénoliques et des amines aromatiques (**Wagner et Nicell, 2001a ; Alemzadeh et Nejati, 2009; Ashraf et Husain, 2010**). Les composés aromatiques tels que les phénols et ses dérivés sont une classe importante de polluants dans les eaux usées (**Nicell et al., 1993**). Ces composés sont connus pour leur toxicité et leur cancérogénicité et peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire. En raison de leur toxicité, les composés phénoliques sont fortement réglementés dans de nombreux pays, et doivent être retirés des eaux usées avant leur rejet dans l'environnement (**Karam et Nicell, 1997**). Les composés phénoliques peuvent être polymérisés par les peroxydases en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les polymères insolubles ainsi formés peuvent alors être éliminés en utilisant une simple sédimentation ou une filtration (**Klibanov et al., 1983**). La majorité des travaux sur la désintoxication des eaux usées contaminées par des phénols, des crésols, et les phénols chlorés, ont été fait avec HRP (**Wagner et Nicell, 2002 ; Stanisavljević et Nedić, 2004 ; Xialing et Lin, 2009**). Récemment, la peroxydase provenant d'autre sources telles que le soja (**Kinsley et Nicell, 2000; Kennedy et al, 2002 ; Kim et al., 2003**), *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare* (**Santos de Arujo et al, 2004 et 2006**) et *Raphanus sativus* (**Duarte-Vázquez et al, 2003 ; Ashraf et Husain, 2009 et 2010**) ont été proposées comme alternatives au navet.

- **Peroxydase dans la biochimie médicale**

En raison de la capacité des peroxydases à donner des produits chromogènes et de leur bonne stabilité, elles sont bien adaptées pour la préparation d'enzyme conjuguée à l'anticorps et à l'application dans les kits de diagnostic. **Agostini et al. (2002)** ont développé un kit de diagnostic pour l'identification de l'acide urique. Chez les humains, une augmentation ainsi qu'une diminution du niveaux de cholestérol sérique, est associée à certaines maladies (**Hirany et al., 1997**) et donc, il y a un besoin pour sa quantification. Une méthode enzymatique colorimétrique a été développée pour la détermination du cholestérol total, montrant l'exactitude, la précision, la sélectivité et la rapidité de l'essai (**Ragland et al., 2000**). Cette méthode emploie la cholestérol-oxydase, la cholestérol-estérase et la peroxydase, mais la stabilité des enzymes et leurs coûts élevés limitent l'application. La peroxydase du radis (HRP) a également été utilisée dans plusieurs applications de diagnostics en médecine telles que la détection de la 8-hydroxy-déoxyguanosine et ses analogues dans l'urine pour identifier les risques de cancer de la prostate (**Chiou et al, 2003**). Elles sont également utilisées comme biodétecteurs dans des kits d'identification et de diagnostic pour la quantification des sucres dans le sang et dans les urines et également pour la quantification d'autres composés tels que l'alcool, la choline, etc. (**Regalado, 2004**). D'autre test ELISA utilisant la peroxydase pour le marquage d'anticorps dirigés contre les mycotoxines ont été développés (**Kawamura et al., 1989**). Les mycotoxines sont hépatotoxiques, néphrotoxiques, tératogènes et mutagènes sur une grande variété de mammifères (**Clarke et al., 1993**). Elles sont fréquemment trouvés dans les céréales, et leur détection est indispensable pour éviter les risques d'intoxication (**Ramakrishna et al., 1990**).

- **Peroxydase dans l'industrie alimentaire**

Le lactose contenu dans le lait et dans les produits laitiers peut être déterminé par différentes méthodes analytiques nécessitant des personnes formées et d'instruments sophistiqués comme les spectrophotomètres, les biocapteurs, etc. **Sharma et al. (2002)** ont développé une technologie simple et économique pour l'estimation du lactose en immobilisant la  $\beta$ -galactosidase, la galactose-oxydase et HRP sur un support polymérique. Les peroxydases peuvent être employées dans la

détermination de la peroxydation des lipides dans la membrane cellulaire et dans les produits alimentaires comme la viande (**Kanner, 1994**). Les peroxydases principalement celles des plantes sont utilisées pour produire des colorants à partir de phénols naturels. Ces colorants produits sont utilisés pour renforcer la couleur des jus, des vins et des thés mais aussi des arômes (**Egorov, 1995**). Elles sont également utilisées comme indicateurs dans le blanchiment des légumes (**Regalado, 2004**). Les peroxydases sont utilisées dans l'industrie alimentaire et de la boulangerie de pain et d'autres. Il peut être utilisé comme inhibiteur de production de gaz dans l'industrie du fromage.

- **Peroxydase dans l'industrie du textile**

Elles sont utilisées pour contrôler la coloration des vêtements (**Egorov, 1995**). Elles peuvent également être utilisées dans l'élimination des peroxydes après le blanchiment du coton.

- **Peroxydase en biologie moléculaire**

Les peroxydases trouvent leur application dans la fabrication des sondes d'ADN et d'ARN. De plus, l'activité des peroxydases peut être utilisée comme marqueur de croissance et de différenciation des tissus. De même, elles peuvent servir de marqueurs dans divers stress biotiques et abiotiques car la plupart des gènes sont exprimés soit de façon constitutive soit de façon inductive (**Dicko, 2005**).

- **Peroxydase dans la production de polymères**

Ces dernières années, il y a un intérêt immense pour la production de polymères conducteurs. La polyaniline est un polymère qui peut être synthétisée par la peroxydase en présence du peroxyde d'hydrogène et de polystyrène sulfonates et d'acide polyvinyl-phosphonique comme matrice (**Egorov, 1995**). Elle est l'un des polymères conducteurs le plus utilisé en raison de sa stabilité environnementale élevée et ses prometteuses propriétés électroniques. Cependant elle est synthétisée par oxydation d'aniline dans des conditions fortement acides et à basse température en utilisant le persulfate d'ammonium en tant qu'initiateur de polymérisation radicalaire (**Rannou et al., 1998**). Cette méthode chimique de synthèse de

polyaniline a des inconvénients. D'abord la réaction est une polymérisation radicalaire, et par conséquent, n'est pas cinétiquement contrôlée et deuxièmement, la réaction n'est pas favorable à l'environnement car elle est réalisée à pH très bas. Pour ces raisons, la polymérisation enzymatique de l'aniline est une alternative intéressante de la synthèse de la polyaniline.

La lignine est le deuxième biopolymère le plus abondant sur terre après la cellulose. En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la peroxydase catalyse l'oxydation de phénols pour donner des polymères de poids moléculaires élevés (**Nicell et Wright, 1997**). Cette caractéristique peut être utilisée comme alternative attrayante à la méthode conventionnelle utilisant le formaldéhyde pour la production de résines phénoliques tel que la lignine. **Liu et al. (1999)**, ont obtenu de la lignine par polymérisation du crésol catalysée par la peroxydase.

- **Peroxydase dans l'industrie du papier**

Les peroxydases sont employées pour le blanchiment de la pulpe à papier et la biodégradation de la lignine (**Wagner et Nicell, 2001b ; Regalado et al., 2004**). Cette grande diversité d'application des peroxydases est liée d'une part à leur acceptabilité pour un grand nombre de substrats et d'autre part à leur stabilité thermique et chimique (**Wright et Nicell, 1999**).

### **III. GENERALITE SUR LES EAUX USEES**

#### **III.1. Origine des eaux usées**

Les eaux usées sont des eaux altérées par les activités humaines à la suite d'un usage domestique, industriel, artisanal, agricole ou autre. Elles sont regroupées en trois grandes catégories: les eaux domestiques, les eaux industrielles, les eaux pluviales.

Les eaux usées domestiques proviennent des différents usages domestiques de l'eau. Elles sont essentiellement porteuses de polluants organiques. Elles se répartissent en eaux ménagères, qui ont pour origine les salles de bains et les cuisines et sont généralement chargées de détergents, de graisses, de solvants, de débris organiques, etc. On a aussi les eaux "vannes" ; il s'agit des rejets des toilettes, chargés de diverses matières organiques azotées et de germes fécaux.

Les eaux pluviales peuvent aussi constituer la cause de pollutions importantes des cours d'eau, notamment pendant les périodes orageuses. L'eau de pluie se charge d'impuretés au contact de l'air (fumées industrielles), puis, en ruisselant, des résidus déposés sur les toits et les chaussées des villes (huiles de vidange, carburants, résidus de pneus et métaux lourds...).

Les eaux usées industrielles sont très différentes des eaux usées domestiques. Leurs caractéristiques varient d'une industrie à l'autre. En plus de matières organiques, azotées ou phosphorées, elles peuvent également contenir des produits toxiques, des solvants, des métaux lourds, des micropolluants organiques, des composés phénoliques, des hydrocarbures etc. Certaines d'entre elles doivent faire l'objet d'un prétraitement de la part des industriels avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte. Elles ne sont mêlées aux eaux domestiques que lorsqu'elles ne présentent plus de danger pour les réseaux de collecte et ne perturbent pas le fonctionnement des usines de dépollution.



### III.2. Réutilisation des eaux usées

L'utilisation des eaux usées résiduelles constitue à priori une démarche séduisante à plusieurs titres. Elle permet en effet, de valoriser l'eau et les matières fertilisantes qu'elle contient au lieu de les rejeter. Elle permet également, dans certains cas, d'éviter la création d'une station de traitement. Elle contribue aussi, à sauvegarder la ressource en eau, lorsque celle-ci est limitée. Comme elle peut aussi entraîner certains risques notamment les dangers pour la santé publique, la percolation des nitrates vers les nappes souterraines et l'entraînement des charges polluantes, voire toxiques, par ruissellement (**Ripert et al. 1990**).

#### Réutilisation pour l'irrigation

Dans le cas spécifique de l'irrigation, les bénéfices ne résident pas seulement dans la préservation du milieu et de la ressource, mais aussi dans la nature des eaux usées. En effet, elles contiennent des éléments fertilisants (azote, phosphore et potassium) ainsi que des oligoéléments (fer, cuivre, manganèse, zinc, etc.) qui sont bénéfiques pour les cultures, et qui peuvent augmenter significativement le rendement. Les matières en suspensions contribuent également à la fertilisation des sols car elles sont riches en matière organique. L'utilisation d'eaux usées à la place d'engrais de synthèse coûteux est économiquement intéressante pour les agriculteurs. De plus, l'arrosage avec des eaux usées constitue une sorte de **fertigation**, c'est-à-dire l'application combinée d'eau et de fertilisants via le système d'irrigation. La fertigation permet un apport fractionné et à faible dose des engrais ; en cela elle est bénéfique pour l'environnement car elle évite la pollution des sols et les dépendances aux fertilisants, qui sont des phénomènes qui apparaissent avec une fertilisation classique (**Asano, 1998**).

#### Réutilisation industrielle

Parmi les activités industrielles, la production d'énergie est de très loin le secteur qui prélève le plus d'eau dans le milieu. La réutilisation industrielle peut donc être intéressante dans le secteur de l'énergie, dans les circuits de refroidissement fermés ou ouverts. Les autres applications possibles concernent les laveries industrielles, les

stations de lavage de voiture, l'industrie du papier, la production d'acier, de textiles, les industries d'électroniques et de semi-conducteurs, etc. (**Asano, 1998**). La qualité requise est spécifique à chaque industrie parce que sa composition chimique peut avoir des répercussions sur les processus industriels. Les préoccupations concernent principalement les phénomènes d'entartrage, de corrosion, de développement de bactéries, d'encrassement, de formation de mousse, et d'inhalation d'aérosols par les travailleurs.

### **Réutilisation en zone urbaine**

Les utilisations possibles d'eaux épurées en zone urbaine sont extrêmement nombreuses, et il en existe de multiples exemples à travers le monde. Ces projets concernent :

- l'arrosage de parcs, de terrains de sport, de terrains de golf, d'aires de jeux;
- les bassins d'agrément, piscines, bassins pour la pêche et la navigation de plaisance ;
- les eaux des sanitaires d'un immeuble ou d'un groupe d'immeubles ;
- le lavage de voirie,
- les réservoirs anti-incendies,
- l'arrosage de parcs, golfs, cimetières etc.

La réutilisation en zone urbaine nécessite un réseau double qui permet de distribuer séparément les eaux épurées et l'eau potable. Il peut y avoir un réseau double à l'échelle de la ville entière ou à l'échelle de l'habitation.

### **La production d'eau potable**

Les eaux épurées sont acheminées de la station d'épuration à l'usine de traitement pour l'eau potable. Un exemple dans le monde de réutilisation directe se trouve en Afrique, à Windhoek, en Namibie (**Asano, 1998**).

La production d'eau potable est l'aboutissement le plus extrême de la réutilisation des eaux usées épurées. Elle a lieu essentiellement dans les zones arides ou semi-arides. Le cas de Windhoek correspond à une situation unique en termes de ressources en eau et la réutilisation directe était la seule solution envisageable.

## **La recharge de nappe**

La principale motivation concernant la recharge de nappe est la dégradation de sa qualité environnementale et/ou la diminution de sa réserve en eau. Ce mode de réutilisation a lieu essentiellement dans des zones arides qui doivent faire face à des problèmes d'assèchement de nappes ou dans des zones côtières où les nappes sont envahies par l'eau de mer.

### **III.3. Risques liés à la réutilisation des eaux usées**

La présence de nombreuses substances chimiques dans l'environnement conduit à des nuisances qui deviennent de plus en plus préoccupantes (**Plagellat, 2004**). Les insuffisances existantes dans la protection des eaux face aux nombreuses pollutions peuvent contribuer à la dégradation de la qualité de ces eaux et à l'augmentation de certains micropolluants minéraux et surtout organiques indésirables dans les eaux (**Afoufou et Achour, 2002**). Dans les eaux de surface, la matrice organique comprend des substances à structures très complexes de masse moléculaire élevée mais aussi des composés organiques simples (composés phénoliques, acides aminés, sucres, corps gras...) (**Lefebvre, 1990**).

Le risque posé par les effets à long terme des micropolluants organiques est encore très peu étudié ainsi que celui d'apparition de nouvelles substances toxiques (**Garban et al., 2003**). L'existence de tels risques potentiels ne conduit, cependant, pas à une interdiction de l'utilisation d'eaux usées épurées pour l'irrigation (**Jiries et al., 2002**). La plupart des éléments de traces sont peu solubles, et le traitement des eaux usées par décantation les élimine efficacement. On les retrouve plutôt dans les boues que dans les eaux usées épurées (**Cauchi, 1996**). Les concentrations infimes dans les effluents d'origine urbaine et leur absorption limitée par les végétaux réduisent le risque sanitaire dans le cas d'une réutilisation agricole (**Cauchi, 1996 ; Faby, 1997**). Le problème des pesticides et des métaux lourds est plus préoccupant dans le cas de recyclage des boues (**Miquel, 2003**).

La plus grande préoccupation associée à la réutilisation des eaux usées, même traitées, est la transmission potentielle de maladies infectieuses. Plusieurs pathogènes potentiellement présents dans les eaux usées brutes sont rapportés et décrits dans la littérature (**Blumenthal et al., 2000; Carr et al., 2004**).

Les rejets directs d'eaux épurées posent des problèmes d'eutrophisation des cours d'eau, de qualité de l'eau destinée à la production d'eau potable et de contamination microbiologique des zones de conchyliculture. C'est pourquoi une réutilisation des eaux usées épurées est quasiment toujours préférable à un rejet direct dans le milieu naturel.

Les nappes libres sont les plus exposées à la contamination, non seulement parce qu'elles ne bénéficient pas d'une protection naturelle vers la surface, mais encore parce qu'elles sont en général peu profondes. Les nappes captives sont plus protégées mais peuvent être éventuellement contaminées par des forages ou un autre aquifère pollué. La réutilisation des eaux usées épurées peut donc être remise en cause dans des zones qui cumulent ces facteurs de risque.

#### **IV. PROBLEMATIQUES ENVIRONNEMENTALE GENEREE PAR LES POLLUANTS PHENOLIQUES**

##### **IV.1 Origine des polluants phénoliques toxiques**

Les composés phénoliques sont des substances organiques présentant un intérêt environnemental majeur. Ils sont très répandus dans notre environnement et présentent une toxicité élevée pour de nombreuses espèces. Le phénol et ses dérivés se trouvent sur de nombreuses listes prioritaires de polluants (**Mackay, 1991**). Les principales sources d'émission de ces composés dans la troposphère sont les rejets automobiles, la combustion de bois (produits de la combustion de la lignine) et les rejets industriels. Mais ils sont aussi rejetés dans l'atmosphère de manière plus discrète par la fabrication et l'utilisation de produits chimiques comme les résines, les désinfectants, les insecticides ou fongicides. Les composés phénoliques sont aussi formés dans l'atmosphère par des réactions photochimiques d'alkyl-benzènes en phase gazeuse (**Berndt et Böge, 2001; Volkammer et al., 2002**).

Certains pesticides comme le dinoseb, 4,6-Dinitro-O-Crésol (DNOC) I bromofenoxin, le bromoxynil, le dichlorophen, le dinoterb, le 8-hydroxyquinoline sulfate, l'ioxynil, le niclosamide, le pentachlorophenol et le 2-phenylphenol contiennent une fonction phénol. Par ailleurs, la dégradation d'autres pesticides peut conduire à des phénols.

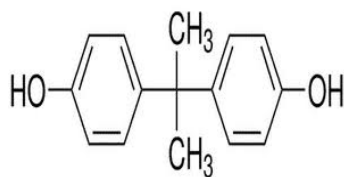
Ainsi, les parathions (ethyl et methyl) et le fenitrothion sont des insecticides organophosphorés largement utilisés dont les produits de décomposition sont respectivement le 4-nitrophénol et le 3-methyl-4-nitrophénol (**Galeano-Diaz et al., 2000**).

## **IV.2 Toxicité des polluants phénoliques**

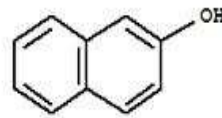
Les polluants phénoliques sont des substances organiques présentant un danger environnemental majeur. Ils sont très répandus dans notre environnement et présentent une toxicité élevée pour de nombreuses espèces.

Ces composés sont considérés comme toxiques pour divers organismes, y compris l'homme (**Singleton et Khan, 2003**). La toxicité et l'impact sur l'environnement de ces composés phénoliques varient selon le nombre, les types et les positions des groupes substitués sur le noyau aromatique. En plus de la toxicité aiguë, certains polluants phénoliques tels que le bisphénol A et les alkylphénols possèdent des activités endocriniennes potentielles de perturbation, même à très faibles concentrations (**Singleton et Khan, 2003**). Les phénols simples, les dihydroxyphénols (résorcinol, catéchol, hydroquinone, etc.), les composés phénoliques halogénés ont des effets antithyroïdiens et goitrigènes démontrés chez l'animal et chez l'homme (**Leclère et al., 2001**). Certains phénols substitués, tels que les chlorophénols et les alkylphénols sont également très bio-réfractaires, de sorte que les processus biologiques conventionnels ne peuvent pas les éliminer efficacement (**Bennie, 1999**). Ils sont difficilement biodégradables et sont des inhibiteurs d'activité biologique (**Belaid et al., 2002**). Ces produits, toxiques vis à vis des êtres vivants, s'accumulent dans les graisses animales, généralement peu solubles dans l'eau et se concentrent dans les huiles telles que les hydrocarbures et sédiments (**Nath et al., 1997**). Les dérivés polyphénoliques comme les tanins sont considérés comme des facteurs antinutritionnels. Les empoisonnements aigus aux composés phénoliques chez les humains peuvent entraîner la mort, peu importe la voie d'exposition (**Bonnard et al., 2008**). Suite à l'exposition aiguë chez les humains, on rapporte des effets tels les collapsus, l'œdème respiratoire, les arrêts respiratoires, et les dommages aux reins, au foie, au pancréas et à la rate. Les

symptômes de l'exposition chronique et sub-chronique au phénol incluent les lésions buccales, la perte de poids, le vertige, la salivation, la diarrhée et l'urine foncée (**Merliss, 1972**). La présence des composés phénoliques dans les eaux usées entraîne une diminution de la concentration en oxygène dissous. Ces composés s'oxydent facilement grâce à la présence d'oxygène du milieu en subissant une quinonisation, ce qui rend l'environnement irrespirable avec une asphyxie de toute vie aquatique (**Levis-Menzi et al., 1992**). Ce phénomène entraîne donc une dégradation de la qualité des eaux de surface en inhibant le développement des microorganismes spécialement les bactéries (**Capasso, 1997**). Ceci entraîne le déséquilibre aquatique (**Morisot et Tournier, 1986**). Ils agissent sur les microorganismes en dénaturant leurs protéines cellulaires, abimant leurs membranes et affaiblissant leur tension superficielle (**Ranalli, 1991a ; 1991b**). Ils inhibent les microorganismes ainsi que les enzymes impliquées dans la décomposition des polluants organiques (**Scalbert, 1991**).

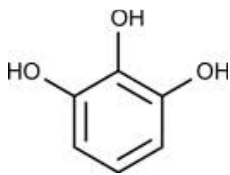


Bisphénol A

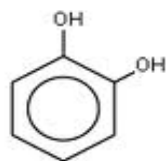


Naphtol

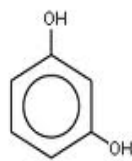
**Figure 8:Exemples de composés phénoliques à plusieurs noyaux benzéniques**



Pyrogallol



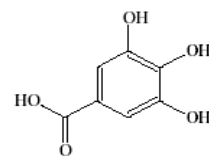
Catéchol



Résorcinol

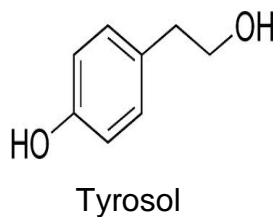
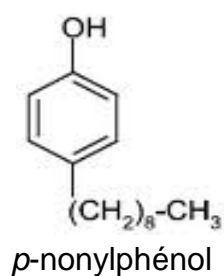


Hydroquinone

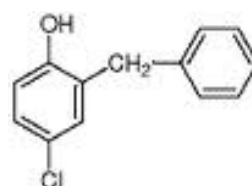
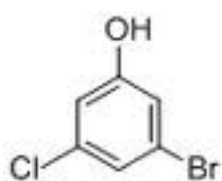


acide gallique

**Figure 9:Exemples de Dihydroxyphénols et trihydroxyphénols**



**Figure 10:Exemples d'alkyl phénols**



**Figure 11:Exemples de phénols substitués**

## V.BIODÉGRADATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES PAR LES PEROXYDASES

Il est bien connu que certains composés phénoliques sont toxiques et difficilement biodégradables. Cependant depuis les travaux pionniers de **Klibanov *et al.* (1980)**, plusieurs études ont montré que les peroxydases pures ou brutes de sources végétales sont capables de dégrader plusieurs composés phénoliques les plus récalcitrants tels que le naphthol (**Ashraf et Husain, 2010**); le crésol, le 2,4-dichlorophénol et le 4,4'-isopropylidènediphénol communément appelé bisphénol A (Caza et al., 1999), le pentachlorophénol (**Zhang et Nicell, 2000**) et les amines aromatiques (**Nicell *et al.*,1993**). La majorité de ces composés ont été dégradés avec la peroxydase de raifort (HRP). Récemment, les peroxydases provenant d'autres sources telles que le soja (**Kinsley et Nicell, 2000; Kennedy *et al.*, 2002**), la carotte, la patate douce, la pomme de terre, et le radis (**Santos de Arujo *et al.*, 2004 ; 2006**) et *Raphanus sativus* (**Duarte-Vázquez *et al.*, 2003 ; Ashraf et Husain, 2009 ; 2010 ; Diao *et al.*, 2011**) ont été proposées comme alternatives au raifort.

Cette dégradation commence par une oxydation catalytique des composés phénoliques par ces enzymes en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour former des radicaux libres. Les radicaux libres subissent des réactions de polymérisation non enzymatiques pour donner des polymères insolubles dans l'eau (**Dunford, 1999 ; Tonegawa et al., 2003**) qui seront ensuite éliminés par des techniques physiques telles que la filtration, la sédimentation ou la centrifugation. La polymérisation des radicaux libres est fonction de la nature chimique du radical, de son environnement et de l'iso-enzyme de la peroxydase utilisée (**Henriksen et al., 1999**). Le temps nécessaire pour une élimination quasi-totale du phénol dépend lui aussi de la concentration initiale en phénol (**Oueslati et al., 1998**). Cependant, durant la catalyse, ces enzymes peuvent s'inactiver. Cette inactivation pourrait être due à la formation de radicaux libres présents lors de la réaction enzymatique. Ces radicaux adsorbés sur le site actif des enzymes peuvent bloquer ainsi l'oxydation des substrats (**Bratkovskaja et al., 2004**). Cependant, l'inactivation des enzymes peut être évitée en utilisant des additifs tels que le borate, le polyéthylène glycol (PEG), la gélatine, etc (**Akhtar et Husain, 2006 ; Quintanilla-Guerrero et al., 2008**). Ces enzymes ont montré leur efficacité sur le plan de la préservation de l'environnement car elles ont permis d'épurer les effluents non pas seulement des industries agroalimentaires mais aussi et surtout les industries du textile et du papier (**Peralta-Zamora et al., 1998**).

## **VI. PRESENTATION DE L'INDUSTRIE DE TANNERIE « TAN ALIZ » DONT LES EFFLUENTS ONT ETE UTILISES**

L'industrie de tannerie de référence qui est l'objet de cette étude est la société TAN ALIZ, de Ouagadougou, au Burkina Faso. C'est une société Anonyme qui a pour activités la collecte, la transformation et la commercialisation des cuirs et peaux du Burkina Faso. Elle se situe à Ouagadougou, capitale politique du Burkina Faso, dans un quartier dit « zone industrielle de Kossodo ». Le système de tannage utilisé à TAN ALIZ, est celui du chrome.

Le système adopté pour le traitement des eaux usées de la tannerie est de technologie italienne et a été proposée par la firme Flamar Italia.



Les effluents venant de l'usine sont canalisés vers un petit bassin de 12 m<sup>3</sup> appelé puits de soulèvement avant d'être envoyés dans un autre plus volumineux de 700 m<sup>3</sup> environ au moyen des pompes de relevage. Dans ce bassin d'égalisation-homogénéisation ou encore bassin d'oxydation, le mélange est effectué à l'aide d'éjecteurs d'air ou souffleurs immergés qui vont achever l'oxydation des sulfures. Une fois ces effluents bien homogénéisés, ils sont soulevés par une pompe submersible vers le réservoir de floculation de 11 m<sup>3</sup> environ dans lequel sont constamment additionnés du sulfate d'alumine et un agent flocculant qu'est le fennopole (poly-électrolyte anionique). Le dosage permettra la floculation des matières en suspension. Ces agents chimiques de dosage sont préparés dans des réservoirs plastiques de 2 000 litres et munis chacun d'un mixeur et d'une pompe de dosage. Les effluents floculés se déversent dans un bassin rectangulaire de sédimentation de 216 m<sup>3</sup>. Au fur et à mesure que ce bassin se remplit, la boue qui se dépose au fond est ramenée dans un puits au moyen d'un pont équipé d'une lame racloir. L'eau claire basique de pH 7 à 8,5 s'écoule dans la nature.

Ces eaux résistent au traitement biologique conventionnel à cause de leurs complexités. Les promoteurs de cette usine se prêtent à un traitement physico-chimique, rejetant une eau à pH basique posent un sérieux problème lors de leur évacuation vers des milieux naturels.

# **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

## I. MATERIEL

### I.1 Produits chimiques et réactifs

Les substrats phénoliques proviennent de Sigma-Aldrich. Les gels de chromatographie: DEAE-Sepharose CL-6B, Phényl-Sepharose CL-6B et Sephacryl S-100 HR sont de Pharmacia-LKB Biotech (Uppsala, Sweden). Les produits d'électrophorèse: acrylamide, N, N'-méthylène-bis acrylamide, Tris, dodécyl sulfate de sodium, N,N,N',N'tétraméthyléthylènediamine (TEMED),  $\beta$ -mercaptoéthanol, bromophénol, glycine, nitrate d'argent, persulfate d'ammonium et les protéines pour le standard sont de Bio-Rad (Milan, Italy). L'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vient de Merck. L'acétate de sodium a été acheté à Rouses Anachemia. Le sérum albumine bovin (BSA), la catalase (EC 1.11.1.6, 12 400 unités par mg de protéine), le polyéthylène glycol (masse moléculaire moyenne de 3350 Da), et réactif de Folin Ciocalteu sont de Sigma Chemical Co. Tous les autres produits chimiques sont de qualité analytique.

### I.2 Matériel biologique

#### a) Echantillonnage et conservation

Les enzymes ont été extraites des gousses d'*Allium sativum*, des tubercules entiers d'*Ipomoea batatas*, des bulbes entiers de *Raphanus sativus* et des grains germés de *Sorghum bicolor*. Ces plantes ont été choisies sur la base des travaux antérieurs réalisés dans le cadre du DEA de Dembélé sur les activités peroxydasiques de dix (10) plantes supérieures. Toutes les quatre espèces ont été cultivées à Ouagadougou au cours de l'année 2007-2008. Après prélèvement, pour empêcher l'attaque des insectes et des moisissures, les grains de *sorghum bicolor sariasso 11* ont été conservés avec la permithrine depuis leur récolte. Les trois autres échantillons ont été congelés à -20°C pour le stockage. Ce traitement permet une meilleure conservation des échantillons.

## **b) Préparation des échantillons**

Les grains de sorgho (*Sorghum bicolor*) ont été d'abord lavés avec l'eau distillée, puis mis à germination pendant 72 heures à la température ambiante (25-30 °C) en les arrosant et les remuant régulièrement. La germination a été faite à l'obscurité pour minimiser la photosynthèse. Après décongélation, les gousses d'ails ont été débarrassées de leurs enveloppes.

Les différents échantillons sont ensuite broyés séparément, à sec, à l'aide d'un Moulinex de type Waring blender afin d'obtenir des broyats homogènes. Les farines de sorgho et les pâtes des trois autres échantillons ont servi enfin pour l'extraction des enzymes.

### **I.3 Les eaux usées**

Cette étude a porté sur les eaux usées de la société industrielle de cuir TAN ALIZ localisée au Nord-est de la ville de Ouagadougou, (Burkina Faso). Cet effluent a été choisi parce qu'il constitue l'une des principales sources de fortes concentrations de composés phénoliques à Ouagadougou (Burkina Faso). En effet, dans leur processus de tannage, une fois le cuir tanné, celui-ci peut être teint. Les décoctions utilisées pour le retannage du cuir contiennent généralement des tanins, des composés polyphénoliques (fixateur de couleur), ce qui permet au cuir de s'imprégner facilement des teintures. En outre, le cuir est riche en mélanoïdes, dérivés polymériques de la L-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA). Les échantillons prélevés ont été mis dans des flacons de 2,5 litres pour les dosages physico-chimiques et pour les tests de biodégradation. Les échantillons sont conservés à – 20°C pour une utilisation ultérieure.

## II. METHODES

### II.1. Comparaison des activités des peroxydases et leurs activités de biodégradation

#### II. 1.1 Extraction des enzymes

Les peroxydases ont été extraites selon le protocole décrit par **Dicko *et al.* (2002)**. La méthode est basée sur le fait que les protéines sont solubles dans les solutions tampons de faible force ionique comme le tampon Tris-HCl (50 mM). Le  $\text{Ca}^{2+}$  est utilisé comme cofacteur des peroxydases et le  $\beta$ -mercapto-éthanol comme stabilisant.

Les enzymes ont été extraites à 4 °C en mélangeant 250 mg d'échantillon préalablement broyé à 1,2 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,3 contenant 0,5 M de chlorure de calcium et 5 mM du  $\beta$ -mercapto-ethanol. Le mélange est agité à 4 °C pendant 1 h. L'homogénat est ensuite centrifugé (14 000 g, 4 °C, 45 min) dans une centrifugeuse réfrigérée (TOMY MR-150) et les surnageants ont été utilisés comme extraits bruts de POXs qui serviront pour les essais de biodégradation des composés phénoliques.

#### II.1.2 Comparaison des peroxydases des quatre plantes

L'activité des POXs a été mesurée par spectrophotométrie (DUNEX, MRX REVELATION) en suivant l'oxydation du gaïacol  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dépendante, à 25° C. Le mélange réactionnel est composé de 10  $\mu\text{L}$  d'extrait brut dilué 200 fois, 20  $\mu\text{L}$  de 100 mM gaïacol, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM et 160  $\mu\text{L}$  de tampon d'acétate de sodium, 50 mM pH 5,0. Des analyses de contrôle dans lequel l'extrait enzymatique ou les substrats ont été remplacés par le tampon ont été réalisées. La réaction a été initiée par addition de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , et suivie à 470 nm, pendant 30 min. Une unité d'activité POX (U) est définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 mmol de radicaux gaïacol/min dans les conditions du test. Les protéines totales de chaque extrait brut ont été quantifiées par la méthode linéarisée de Bradford (**Zor et Selinder, 1996**) utilisant le

rapport des absorbances  $A_{620}/A_{450}$  qui est proportionnelle à la concentration de protéines. Le BSA a été utilisé comme standard.

Les pH optimum des peroxydases des différentes plantes ont été déterminés avec du gaïacol à 100 mM, dans 50 mM du tampon citrate-phosphate de McIlvaine au pH variant de 3 à 8. Les essais ont été effectués en triplicata à 25 °C ; à chaque pH, les densités optiques sont lues à une minute d'intervalle pendant 10 min à 470 nm.

Les températures optimales des peroxydases ont été étudiées à des températures variant de 0 à 80 °C et au pH optimum des peroxydases de chaque plante.

La stabilité thermique des peroxydases des différentes plantes a été déterminée dans les conditions standards après 10 min de pré-incubation à des températures variant entre 30 °C et 90 °C avec 10 °C d'intervalle suivie d'un refroidissement à la température ambiante pendant 10 min. L'activité est déterminée dans les conditions standards.

### **II.1.3 Tests de biodégradation des composés phénoliques purs**

Des solutions de composés phénoliques de 10 mM d'acide gallique, d'acide férulique, d'acide 4-hydroxybenzoïque, de pyrogallol et de 1,4-tyrosol ont été préparées dans de l'éthanol 2 % (v / v). Ces composés ont été sélectionnés sur la base de fait que l'acide 4-hydroxybenzoïque, le tyrosol, l'acide férulique et l'acide gallique sont parmi les composés phénoliques les plus importants dans la plupart des eaux usées industrielles (**Takemura et al., 2010**). Le réacteur discontinu pour l'élimination des composés phénoliques est constitué de 0,9 mL de la solution stock de composé phénolique, 10 mM ; 0,1 ml d'extrait enzymatique de plante, 1 ml de tampon d'acétate de sodium 50 mM, pH 5 et 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mM. La réaction a été initiée par l'ajout de 0,1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le mélange réactionnel. Après incubation pendant 5min à 25 °C, des aliquotes du mélange réactionnel ont été retirées à 5 min d'intervalle pendant 30 min, et la réaction enzymatique est arrêtée par addition de 0,05 mL de la solution stock de catalase (0,5 mg mL<sup>-1</sup>). La

concentration résiduelle en phénol a été déterminée par la méthode de Folin Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**).

## **II.1.4 Tests de biodégradation des composés phénoliques des eaux usées**

### **a) Détermination des paramètres physico-chimiques des eaux usées**

- **Détermination des pH des eaux usées**

Le pH des eaux usées est déterminé à l'aide d'un pH mètre à électrode.

- **Détermination de la quantité de phénols totaux**

Cette méthode est basée sur la capacité des composés phénoliques à réduire le FCR (réactif de Folin-Ciocalteu). Ce dernier est constitué essentiellement par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite possède une absorption maximale au environ de 750 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés.

Les échantillons d'eau usée ont été centrifugés à 3500 g pendant 30 min pour éliminer les matières en suspension. Le surnageant a servi pour déterminer la concentration initiale de composés phénoliques par la méthode de Folin Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**) et les tests de biodégradation.

Pour la détermination de la quantité des phénols totaux, 10 µl des eaux usées sont additionnés à 150 µl d'eau distillée et 25 µl de FCR (réactif de Folin-ciocalteu). Après 5 min d'incubation, 25 µl de carbonate de sodium (20 %) sont ajoutés au mélange. Un blanc est préparé en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée. La lecture de l'absorbance est effectuée à 750 nm au spectrophotomètre (DUNEX, MRX REVELATION) après 30 min d'incubation à l'obscurité. Le standard utilisé est l'acide

gallique et une gamme de concentrations allant de 1 à 1000  $\mu\text{g/ml}$  a été réalisée pour l'établissement d'une courbe étalon (**Singleton et al., 1999**)

- **Détermination de la DCO des eaux usées**

La Demande Chimique en Oxygène (DCO) représente la quantité d'oxygène utilisée pour l'oxydation totale des substances organiques et minérales par les oxydants chimiques forts. Elle permet d'évaluer la charge polluante des eaux usées. Elle est déterminée en mélangeant 2,5 ml d'eau usée, 1,5 ml de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (bichromate de potassium) ; 3,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et une pincé de  $\text{HgSO}_4$ . L'ensemble dans un tube est placé dans un digesteur pendant 2 h à  $150^\circ\text{C}$ . Après refroidissement, les DCO sont lues au spectrophotomètre DR/2400 (Hach).

**b) Suivie de la biodégradation en fonction de la quantité d'extrait enzymatique**

Le surnageant a ensuite été utilisé pour étudier la dégradation des composés phénoliques des eaux usées par les POXs des plantes. Le réacteur discontinu contient 1 ml de surnageant, 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100mM, 1 ml de tampon acétate de sodium 50 mM pH 5,0 et des quantités croissantes allant de 0-100  $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique. Le mélange réactionnel a été incubé sous agitation pendant 3 heures. Une solution stock de catalase ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) est ajoutée dans le but d'arrêter la réaction en cas de besoin. Le mélange est ensuite centrifugé à 3500 g pendant 30 min. Le surnageant a été analysée pour déterminer la concentration résiduelle de composés phénoliques. Des réactions de contrôle ont été utilisées simultanément pour chaque essai pour confirmer que l'élimination des composés phénoliques est causée uniquement par l'activité des POX. L'effet du polyéthylène glycol sur l'activité catalytique de la peroxydase a été étudié en ajoutant 100 ml de 100 mM de polyéthylène glycol (PEG) dans le mélange réactionnel.



## **II.2. Purification et caractérisation des peroxydases efficaces dans la biodégradation**

### **II.2.1. Préparation des extraits bruts**

Après décongélation et épluchage, 300g de échantillons de patate douce sont broyés en présence de 450 ml de solution de chlorure de sodium 0,9 % (p/v) ( 20g de échantillon de radis dans 10ml de solution de NaCl 0,9 %) dans un mixer. Le broyat obtenu est centrifugé à 6000 tours/min pendant 30 min à 4°C dans une centrifugeuse réfrigérée (UNICEN ALRESA). Le surnageant obtenu constitue l'extrait brut enzymatique de patate douce ou de radis.

### **II.2.2. Techniques de purification des peroxydases**

Le protocole de purification des peroxydases de radis et de patate douce a nécessité de façon générale l'utilisation des techniques brutes de précipitations des protéines au sulfate d'ammonium suivie de techniques chromatographiques de filtration sur gel, d'échange d'ions ou d'interactions hydrophobiques. Les conditions opératoires utilisées pour chacune de techniques sont reportées ci-dessous.

#### **a)Purification de la peroxydase de patate douce**

- **Précipitation dans du sulfate d'ammonium**

L'extrait brut de patate douce est saturé à 80 % (p/v) dans du sulfate d'ammonium pendant 12 heures pour précipiter les protéines. Le culot obtenu après centrifugation à 6000 trs/min pendant 30 minutes à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée (UNICENC ALRESA) est repris dans 1 ml du même tampon pour être ensuite fractionné sur une chromatographie d'exclusion moléculaire.

- **Chromatographie de filtration sur gel ou d'exclusion moléculaire**  
**Sephacryl S-200 HR**

La chromatographie d'exclusion moléculaire permet de séparer les molécules en fonction de leur comportement hydrodynamique et de leur poids moléculaire. Les gels Sephacryl S-200 HR sont des gels composites formés d'allyles de dextrans liés avec le N, N'-méthylène bis-acrylamide. Le gel Sephacryl S-200 HR permet de fractionner les protéines globulaires ayant un poids moléculaire compris entre 10 000 et 250 000 Da. Cet gel a été utilisé pour la seconde étape de purification de la peroxydase de patate douce après la précipitation au sulfate d'ammonium. Le gel prêt à l'emploi est coulé dans une colonne (1,6 x 65 cm) et équilibré avec du tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0). Après le dépôt de l'extrait précipité, les protéines sont éluées avec le même tampon citrate-phosphate à un débit de 0,25 ml/min et des fractions de 2 ml sont recueillies avec un collecteur (GILSON TDC 80) relié à une pompe péristaltique (GILSON) qui est connectée à la colonne. Les fractions actives sont rassemblées pour être fractionnées sur une chromatographie d'échange d'ions.

- **Chromatographie échangeuse d'anions sur gel DEAE-Sepharose CL-6B**

Ce gel a été utilisé pour la troisième étape de purification de la peroxydase de patate douce après la chromatographie d'exclusion moléculaire.

Pour cette étape de purification de la peroxydase de patate douce, le gel diéthylaminoéthyl (DEAE) Sepharose CL-6B (PHARMACIA Biotech.) est coulé dans une colonne (2,6 x 6,0 cm) et équilibré avec du tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0). Le débit est fixé à 2,5 ml/min et des fractions de 1 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur (GILSON TDC 80) relié à une pompe péristaltique (GILSON) qui est connectée à la colonne. Après le dépôt sur la colonne de 20 ml de l'extrait semi-purifié de patate douce provenant de la chromatographie d'exclusion moléculaire, la colonne est lavée avec 60 ml de tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0) pour éluer les protéines non fixées. Les protéines retenues par le gel sont éluées par une augmentation progressive de la force ionique à pH constant, par l'application d'un gradient en escalier de 0 ; 0,3 ; 0,5 et 1 M de chlorure de sodium dans 60 ml de tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6). Les fractions les plus actives sont

rassemblées et dialysées contre un tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0). Elles constituent la solution d'enzyme purifiée de patate douce.

## **b) Purification des peroxydases de radis**

- **Chromatographie échangeuse de cations sur gel CM-Sepharose CL-6B**

Le gel carboxyméthyl (CM) Sepharose CL-6B (PHARMACIA Biotech.) est coulé dans une colonne (2,6 x 4,0 cm) et équilibré avec du tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0). Le débit est fixé à 1 ml/min et des fractions de 1 ml sont recueillies grâce à un collecteur (GILSON TDC 80) relié à une pompe péristaltique (GILSON) qui est connectée à la colonne. Après le dépôt sur la colonne de l'extrait brut de radis, la colonne est lavée avec 40 ml de tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0) pour élué les protéines non fixées. Les protéines retenues par le gel sont éluées par une augmentation progressive de la force ionique à pH constant, c'est-à-dire par l'application d'un gradient en escalier de 0 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 et 1 M de chlorure de sodium dans 40 ml de tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0). Deux fractions actives (POXr1 et POXr2) ont été rassemblées pour les autres étapes.

- **Chromatographie échangeuse d'anions sur gel DEAE-Sepharose CL-6B**

Après le dépôt sur la colonne de l'extrait POXr1, la colonne est lavée avec 60 ml de tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0) pour élué les protéines non fixées. Des fractions de 3 ml sont recueillies et les fractions les plus actives sont rassemblées et dialysées contre un tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0). Elles constituent la solution d'enzyme purifiée n°2 de radis.

- **Chromatographie d'interaction hydrophobique sur gel Phényl-Sepharose CL4B**

La chromatographie d'interaction hydrophobique permet de séparer les molécules en fonction de leur hydrophobie et de leur caractère amphiphile. L'hydrophobie se définit comme étant la répulsion s'établissant entre un composé non polaire et un environnement polaire tel que l'eau. La fixation des protéines sur la colonne est influencée par le type de ligand, la force ionique du milieu et la température. Dans la chromatographie par interaction hydrophobique sur gel Phényl-Sepharose, la matrice est hydrophobe et porte de courtes chaînes phényles. La phase mobile est généralement une solution aqueuse saline. Les constituants fixés à la matrice en conditions de force ionique élevée, sont élués en diminuant la salinité du milieu. Le gel Phényl-Sepharose HP (PHARMACIA Biotech.) est coulé dans une colonne (1,4 x 4,6 cm). Le débit d'élution est de 0,33 ml/min et des fractions de 1 ml chacune sont recueillies dans les mêmes conditions décrites précédemment. Avant le dépôt des fractions actives de l'extrait de radis issues de la chromatographie échangeuse d'anion, celles-ci sont saturées par 1,7 M de sulfate d'ammonium et le gel est équilibré dans du tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0) contenant 1,7 M de thiosulfate de sodium. Les protéines sont éluées par application d'un gradient en escalier décroissant de 1,7 ; 1 ; 0,7 ; 0,5 ; 0,3 et 0 M de thiosulfate de sodium dans 20 ml de ce même tampon. Les fractions les plus actives sont rassemblées et dialysées contre un tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0). Elles constituent la solution d'enzyme purifiée n°2 de radis.

### **c) Dosage des protéines et des activités des peroxydases**

La teneur en protéines des différents échantillons enzymatiques des fractions chromatographiques a été déterminée par la méthode de **Lowry et al. (1951)**.

Les réactifs utilisés pour le dosage sont les suivants :

- Solution A : réactif de Folin-ciocalteus dilué de moitié dans la soude 0,1N ;
- Solution B : carbonate de sodium à 2 % (p/v) dans la soude 0,1N ;

- Solution C<sub>1</sub> : sulfate de cuivre à 0,5 % (p/v) dans de l'eau distillée ;
- Solution C<sub>2</sub> : tartrate double de sodium et de potassium à 1 % (p/v) dans de l'eau distillée ;
- Solution D : préparée extemporanément à partir de 100 µl de la solution C<sub>1</sub>, 100 µl de la solution C<sub>2</sub> et 10 ml de la solution B.

Le dosage s'est effectué sur 200 µl de la préparation protéique en présence de 2 ml de la solution D. Le mélange est agité et incubé pendant 10 minutes à la température ambiante. Ensuite 200 µl de la solution A sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité et laissé reposer pendant 30 minutes à l'obscurité pour permettre le développement de la coloration. La densité optique de l'essai est mesurée à 660 nm au spectrophotomètre (SPECTRONIC<sup>R</sup> GENESYS<sup>TM</sup> 5) contre un témoin ne contenant pas d'extrait protéique. Cette densité optique est ensuite convertie en mg de protéines grâce à une droite d'étalonnage obtenue à l'aide d'une solution de sérum albumine bovine (BSA) 0,2 mg/ml.

Les activités des peroxydases des différentes fractions chromatographiques ont été lues au spectrophotomètre (SPECTRONIC<sup>R</sup> GENESYS<sup>TM</sup> 5) à 470 nm en suivant l'oxydation du gaïacol en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le milieu réactionnel est composé de 1,6 ml de tampon citrate phosphate 100 mM pH 6,0 ; 100µl de la préparation enzymatique, 200 µl de gaïacol 100 mM et 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM. La lecture de l'absorbance a été faite au spectrophotomètre UV-visible à 470 nm contre un témoin ne contenant pas d'extrait brut enzymatique. La cinétique est suivie au spectrophotomètre toutes les 15 secondes pendant 3 min.

## II.2. 3 détermination des propriétés moléculaires des peroxydases purifiées

- **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide**

Le gel de polyacrylamide résulte de la polymérisation de l'acrylamide ( $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$ ) en présence d'une faible quantité d'agent de réticulation : le N, N'-méthylène bisacrylamide ( $(\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2)_2 - \text{CH}_2$ ). Cette polymérisation est amorcée par les radicaux libres résultant de la composition chimique du persulfate d'ammonium et accélérée par l'addition de TEMED (N, N, N', N' tétraméthyléthylènediamine). La réticulation dépend des quantités d'acrylamide et de bisacrylamide ainsi que de leur rapport. Dans ce type de gel, les protéines migrent en fonction de leur charge et de leur taille.

- **Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant, en présence de dodécyle sulfate de sodium (SDS) et  $\beta$ -mercaptoéthanol est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970). Le dodécyle sulfate de sodium de formule brute :  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}_3^- \text{Na}^+$ , est un détergent anionique puissant qui rompt les interactions non covalentes entre les sous-unités d'une protéine. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol ( $\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), également utilisé dans cette technique, rompt à chaud les ponts disulfures.

Les échantillons protéiques sont dénaturés par un traitement thermique de 5 minutes à 100 °C dans du tampon Tris/HCl (pH 6,8) contenant du SDS 4 % (p/v), du  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 % (v/v), du glycérol 20 % (p/v) et du bleu de bromophénol 0,025 % (p/v). Dans ces conditions, les protéines se dissocient en leurs sous-unités protéiques qui fixent de grandes quantités de détergent ; ce qui masque complètement la charge naturelle de la sous-unité protéique et lui confère une charge nette négative constante par unité de masse. Plus les molécules sont volumineuses, plus la quantité de SDS (charge négative) est importante. Toutefois, dans un gel, les forces de frictions prédominent et les grosses molécules malgré leur importante charge ont une faible mobilité. L'électrophorèse est menée à terme sur

des plaques de 1,5 mm d'épaisseur de gel (7 x 8 cm) contenant 12 % d'acrylamide à l'aide d'un dispositif Hoeffer Scientific Instrument (Mighty Small II Unit, 20 mA).

Les protéines sont colorées au bleu de Coomassie brillant R-250, 0,25 % (p/v) ; solution contenant du méthanol 40 % (v/v) et de l'acide acétique 10 % (v/v). La décoloration est réalisée par lavages successifs dans le mélange méthanol/ acide acétique/ eau distillée (40 :10 :50, v/v/v).

- **Electrophorèse en conditions natives**

Dans ce type d'électrophorèse, les protéines migrent à la fois selon leur charge et leur poids moléculaire. Cette technique est utilisée comme critère de pureté. Elle est réalisée en utilisant la même méthode décrite en conditions dénaturantes, mais sans incorporation de SDS et de  $\beta$ -mercaptoéthanol dans les différents tampons et milieux de préparation.

- **Détermination des poids moléculaires par électrophorèse**

Les poids moléculaires des différentes peroxydases de radis et de patate douce sont estimés en comparant leur poids moléculaires à celles de protéines de référence de poids moléculaires connus. Les protéines de référence utilisées sont la beta-myosine (250 kDa), la beta-galactosidase (150 kDa), la phosphorylase B (100 kDa), l'ovalbumine (75 kDa), anhydrase carbonique (50 kDa), inhibiteur de la trypsine de soja (37 kDa), lysozyme (25 kDa) et aprotinine (15kDa) (BIO RAD).

- **Révélation au nitrate d'argent**

La révélation au nitrate d'argent des bandes protéiques des protéines est réalisée selon la méthode de **Blum et al. (1987)**. Cette coloration est basée sur la réduction spécifique de l'ion argent ( $\text{Ag}^{2+}$ ). Elle est capable de colorer des protéines de l'ordre du nanogramme.

## **II.2.4 détermination des caractéristiques physico-chimiques des peroxydases purifiées**

### **a) Effet du pH**

La relation entre le pH et l'activité d'une enzyme dépend des groupements ionisables du site actif de l'enzyme qui participent soit à la fixation du substrat et du co-substrat, soit à l'acte catalytique, ou au maintien de la conformation native de la protéine enzymatique.

- **Détermination du pH optimum d'activité**

L'influence du pH sur l'activité des peroxydases est étudiée en mesurant les activités à 470 nm au spectrophotomètre (SPECTRONIC<sup>R</sup> GENESYS<sup>TM</sup> 5) après 5 min d'incubation de l'enzyme avec ses substrats gaïacol et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans 100 mM de tampons couvrant une gamme de pH allant de 2,6 à 10. Le citrate-phosphate 100 mM (pH 2,6-7), le tampon acétate de sodium 100 mM (pH 3,6 à 5,6), le tampon sodium-phosphate 100 mM (pH 5,6 à 8,0), le tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7 à 9,0) et le tampon glycine-NaOH (pH 8-10).

- **Effet de la nature du tampon**

L'influence de la nature du tampon sur l'activité des peroxydases a été étudiée en mesurant leur activité résiduelle après 2 heures de pré-incubation à 25 °C à différents pH (2,6 à 9,0). Les tampons utilisés sont le citrate-phosphate 100 mM (pH 2,6-7), le tampon acétate de sodium 100 mM (pH 3,6 à 5,6), le tampon sodium-phosphate 100 mM (pH 5,6 à 8,0), le tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7 à 9,0) et le tampon glycine-NaOH (pH 8-10).



## **b) Détermination de l'effet de la température**

La plupart des protéines ne conservent leur activité biologique ou leur capacité fonctionnelle que dans un domaine limité de température.

- ***Température optimale d'activité***

L'activité catalytique des enzymes dépend de l'intégrité de leur structure en tant que protéine. Une exposition à des températures inappropriées provoque une dénaturation qui entraîne une perte de leur activité catalytique. Il est donc nécessaire de connaître la température optimale à laquelle chaque enzyme présente un maximum d'activité. La température optimale d'activité des peroxydases a été étudiée dans du tampon citrate-phosphate 100 mM, pH 6, à des températures variant de 0 à 80 °C.

- **Dénaturation thermique**

Cette étude est suivie en mesurant dans les conditions standard de dosage, les activités résiduelles des peroxydases après 10 minutes de préincubation des enzymes à différentes températures comprises entre 0 et 80 °C suivie d'un refroidissement à la température ambiante. Les activités résiduelles sont déterminées dans les conditions standards.

### **II.2.5 Détermination de l'effet des agents chimiques**

Parmi les agents chimiques, il existe des effecteurs positifs ou négatifs qui affectent considérablement l'activité d'une enzyme. Ce sont des composés autres que le substrat. Ils jouent un rôle important dans les phénomènes de régulation et sont également forts utiles dans l'étude des mécanismes d'action des enzymes. On peut les classer en deux catégories:

- les activateurs qui augmentent la vitesse de la réaction enzymatique;
- les inhibiteurs qui la réduisent ou l'annulent.

Pour étudier l'action des effecteurs sur l'activité des peroxydases, le milieu réactionnel composé de 1500 µl de tampon citrate-phosphate 100 mM pH (6,0), 100 µl d'effecteur et 100 µl de solution enzymatique purifiée a été réalisé. Ce milieu réactionnel est préincubé pendant 30 minutes à 25 °C. Ensuite 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 200 µl de gaïacol y sont ajoutés suivie d'une incubation à 25 °C pendant 5 minutes. Des solutions témoins sans effecteurs sont préparées dans les mêmes conditions. La mesure de l'absorbance se fait à 470 nm au spectrophotomètre (SPECTRONIC<sup>R</sup> GENESYS<sup>TM</sup> 5). L'activité enzymatique résiduelle est exprimée en pourcentage d'activité de celle mesurée en l'absence d'effecteur.

### **II.2.6 Détermination de la spécificité pour les substrats phénoliques**

Une enzyme catalyse un type de réaction donnée ou plusieurs types de réaction. La réaction peut porter sur un type précis de molécule, un substrat particulier ou plusieurs substrats.

Pour l'étude de la spécificité de substrat, plusieurs substrats phénoliques sont soumis aux enzymes purifiées. Le milieu réactionnel est préparé dans les conditions standards pour chaque substrat et incubé à 25 °C pendant 30 minutes. Tous les substrats sont préparés à la concentration de 100 mM. La lecture de l'absorbance se fait au spectrophotomètre (SPECTRONIC<sup>R</sup> GENESYS<sup>TM</sup> 5) avec l' ABTS ( $A_{405}$ ;  $\epsilon=36.8 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), le Pyrogallol ( $A_{420}$ ;  $\epsilon=2640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), le Catechol ( $A_{295}$   $\epsilon=1700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), l'acide férulique ( $A_{318}$ ;  $\epsilon=6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) et les autres composés ( $A_{420}$ ). L'activité est exprimée en pourcentage d'activité de celle qui est maximale.

# **CHAPITRE III : RESULTATS-DISCUSSION**

## I. SCREENING DES ACTIVITES DES PEROXYDASES ET LEURS ACTIVITES DE BIODEGRADATION

### I.1. Comparaison des activités peroxydasiques des quatre plantes

Les résultats des activités spécifiques de POX des bulbes d'*Allium sativum*, des tubercules d'*Ipomoea batatas*, des racines de *Raphanus sativus* et des grains germés de *Sorghum bicolor* sont résumées dans le Tableau I. Ces quatre plantes présentent des activités peroxydasiques différentes. Les activités spécifiques varient de 22,1 à 294,6 U/ mg. Parmi ces plantes, la plus haute activité spécifique a été détectée chez *R. sativus*. Cependant, ces activités ( $294,6 \pm 13$  U / mg) sont inférieures à celle ( $413,5$  U / mg) rapportée par **Wang et al. (2004)** sur les variétés noires de la même plante. Les peroxydases de cette dernière ont fait l'objet de plusieurs travaux (**Veitch, 2004; Wang et al., 2004**). Elle est la principale peroxydase commerciale (**Agostini et al., 2002**). Cependant elle n'est pas la meilleure source de peroxydase car des activités supérieures ont été rapportées chez d'autres espèces de plantes à savoir *Metroxylon sagu* et *Hordeum vulgare* dont les activités spécifiques sont supérieures à 800 U/mg (**Rasmussen et al., 1997**). *Allium sativum* montre une activité nettement plus faible que les trois autres espèces. Les peroxydases des tubercules entiers d'*Ipomoea batatas* ont présenté une activité peroxydasique de  $31,3 \pm 2$  U/mg. Cette valeur est inférieure à celle obtenue ( $15$  U/mg) par **Santos et al. (2004)** sur la chaire et supérieure à celle rapportée ( $42$ U/mg) par **Castillo et al. (2002)** sur la peau des tubercules de la même plante. Ces derniers ont montré que la majeure partie des peroxydases des tubercules est localisée dans la peau et non dans la chaire. Ils ont également montré que l'activité des peroxydases dépend non seulement du substrat utilisé comme donneur d'électron mais aussi de la concentration de la solution tampon utilisée. Ceux-ci pourraient entre autre expliquer les différences observées en plus des variations due aux variétés et au climat (**Dicko et al., 2002**). Quand à l'activité des peroxydases de grains germés de *Sorghum bicolor var sariasso 11*, elle est de  $68,6 \pm 6$  U/mg. Des activités inférieures ont été obtenues avec *Sorghum bicolor var sariasso 10* (**Dicko et al., 2002**). Ces auteurs ont montré que l'activité des peroxydases des grains dépend non seulement de la variété utilisée, de la germination mais aussi des facteurs environnementaux. Ceux-ci pourraient expliquer les différences observées.

**Tableau I: comparaison des activités des peroxydases de quatre (04) plantes**

extrait	Protéine totale	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)
<i>A. sativum</i>	24,3 ± 7	537,03 ± 14	22,1 ± 2
<i>I. batatas</i>	36,9 ± 3	1154,97 ± 6	31,3 ± 2
<i>R. sativus</i>	14,7 ± 4	4348,3 ± 52	294,6 ± 13
<i>S. bicolor</i>	28,4 ± 9	1948,24 ± 54	68,6 ± 6

L'activité des peroxydases a été déterminée avec le gaïacol et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrats.

## I.2. Comparaison des pHs et des températures optima

Les pHs optima d'activité des peroxydases varient entre 4 et 6,5 (Tableau II). Le plus faible pH est obtenu avec la peroxydase de *Sorghum bicolor* et le plus élevé avec celle de *Allium sativum*. Selon **Santos de Araujo et al., 2004**, l'activité des peroxydases dépend de la nature du donneur d'hydrogène retenue comme substrat. En effet, avec le gaïacol comme substrat, des pHs optima acides ont été rapportés pour les peroxydases de nombreuses plantes (**Mika et Lüthje, 2003** ; **Majourhat et Baaziz, 2004** ; **Baaziz et al., 2006**). POXs de *A. sativum* et *S. bicolor* ont des larges gammes de pH. D'autres auteurs (**Bhunja et al, 2002**; **Dicko et al., 2006**) ont montré que les activités des POXs augmentent généralement avec la diminution du pH. **Sakharov et al. (2003)**, en utilisant les POXs anioniques purifiées de palmier à huile comme biocatalyseurs, ont montré que la polymérisation de l'aniline est optimale à pH 3,5. La polyaniline est l'un des polymères le plus largement étudié en raison de sa stabilité élevée et ses prometteuses propriétés électroniques. POX de *S. bicolor* qui présente des gammes de pH similaires peut être efficace pour les mêmes applications.

Les températures optimales d'activité des peroxydases sont de 30 °C pour *Ipomoea batatas* et *Raphanus sativus* et 40 °C pour *Allium sativum* et *Sorghum bicolor*. **El Ichi et al. (2008)** ont rapporté une température optimale de 30 °C avec une peroxydase isolée des bulbes d'*Allium sativum* de Tunisie. Cette valeur est inférieure à celles d'*Allium sativum* cultivée au Burkina Faso et de *Sorghum bicolor* de cette étude. Cependant elle est similaire à celles d'*Ipomoea batatas* et *Raphanus sativus*.

**Tableau II: Comparaison des pH et des températures optimum d'activité des peroxydases de quatre (04) plantes supérieures.**

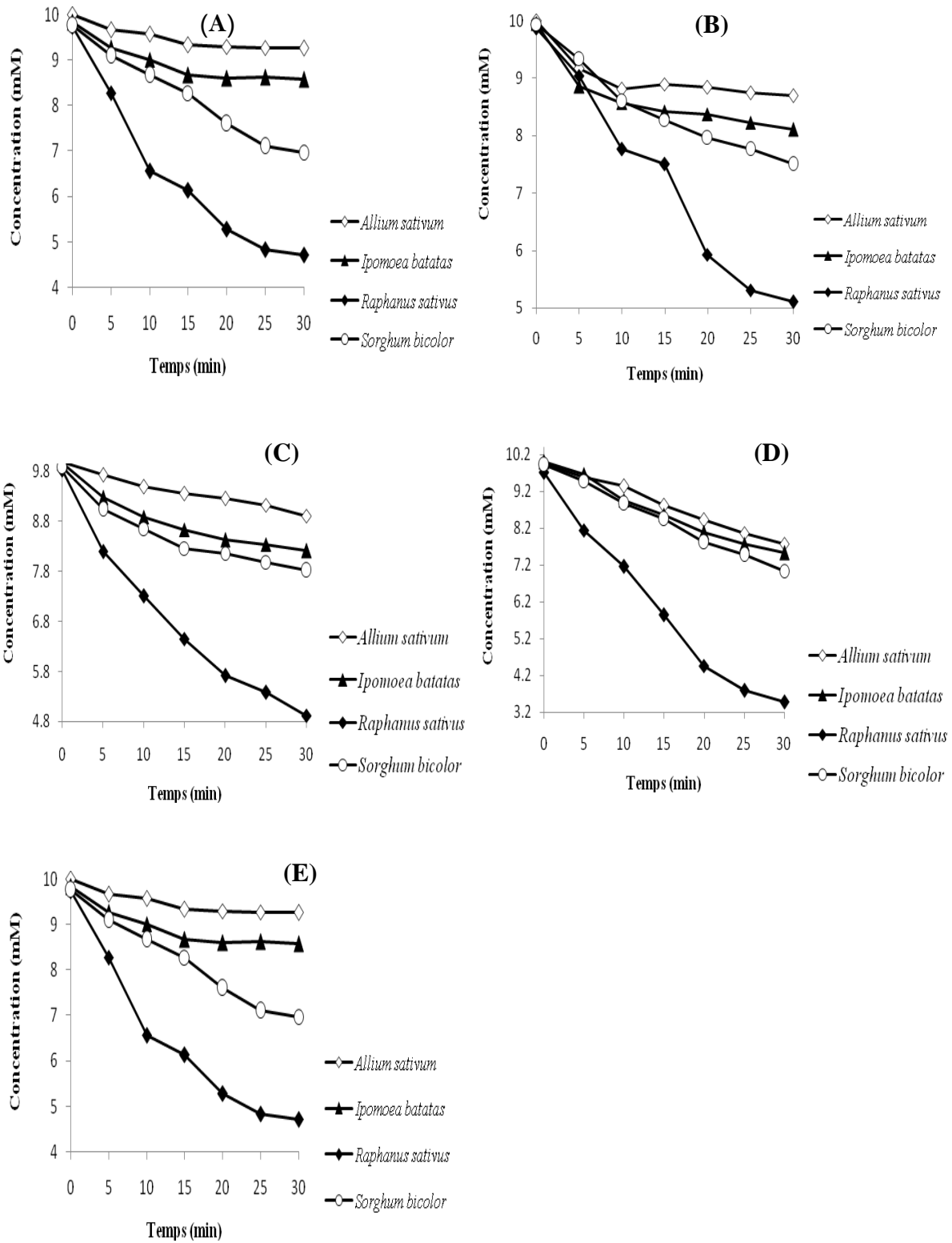
Plante	pH optimum	Température optimum
<i>A. sativum</i>	5,5-6,5	40
<i>I. batatas</i>	6	30
<i>R. sativus</i>	5	30
<i>S. bicolor</i>	4-4,5	40

### I. 3. Etude de la biodégradation des eaux phénoliques

Afin d'harmoniser la méthode utilisée pour le suivi de la biodégradation des composés phénoliques des eaux phénoliques synthétisées et des composés phénoliques contenus dans les eaux usées, la méthode de Folin Ciocalteu a été préféré à d'autres méthodes spectrophotométriques.

Afin de comparer l'action des peroxydases sur les composés phénoliques, cinq eaux phénoliques ont été traitées avec l'extrait brut d'*Allium sativum*, d'*Ipomoea batatas*, de *Raphanus sativus* et de *Sorghum bicolor*. L'activité spécifique des peroxydases de ces plantes varient de  $22,1 \pm 2$  à  $294,6 \pm 13$  U/mg. Les cinétiques de dégradation de l'acide gallique, l'acide férulique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, le pyrogallol et 1,4-tyrosol, catalysée par les peroxydases de ces quatre plantes sont illustrées dans la

figure 12. Le phénomène d'oxydation des composés phénoliques par les peroxydases est bien reconnu depuis le début des années 1960 (**Brown, 1967**), mais son application au traitement des eaux usées est survenue quelques 15 années plus tard (**Klibanov et Morris, 1981**). Les expériences dans cette étude ont été effectuées à la fois avec des substrats de composés phénoliques et eaux usées d'une industrie de tannerie. La réaction de contrôle, c'est-à-dire en l'absence de  $H_2O_2$  dans le milieu réactionnel ne montre aucun changement significatif dans la cinétique de dégradation. Cependant en présence de  $H_2O_2$ , la concentration en composés phénoliques diminue rapidement (**Fig. 12**). Ceci signifie que l'oxydation des composés phénoliques utilisés dans la présente étude est principalement due à l'activité des peroxydases plutôt que d'autres enzymes oxydatives telles que polyphénols oxydases (EC : 1.14.18.1, EC : 1.10.3.1) et les laccases (EC : 1.10.3.2). Les travaux antérieurs ont également montré que dans les variétés de sorgho, les POXs sont les principales enzymes endogènes oxydatives des composés phénoliques (**Dicko et al., 2002**). Pour tous les cinq types de composés phénoliques c'est à dire l'acide gallique, l'acide férulique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, le pyrogallol et 1,4-tyrosol utilisés comme modèles d'eau phénolique, les POXs ont montré leur forte aptitude à leur dégradation (**Fig. 12**). Toutefois, les taux de dégradation diffèrent non seulement de la nature du composé phénolique mais aussi de la source de la POX (**Fig. 12**). Cela confirme que l'efficacité des POXs sur la catalyse est fortement dépendante de la nature chimique des substrats (spécificité de substrat) et de la source botanique de POXs. **Sakurai et al. (2001)** ont également constaté une différence sur la dégradation du phénol et de bisphénol A. Sur tous les cinq composés phénoliques, les peroxydases de radis ont été les plus efficaces. Les peroxydases de patate douce et de sorgho sont aussi performantes pour la biodégradation. Plusieurs travaux ont montré l'aptitude des peroxydases à dégrader les composés organiques récalcitrants comme les phénols et des phénols substitués (**Bratkovskaja et al., 2004; Akhtar et Husain, 2006 ; Dalal et Gupta, 2006 ; Ashraf et Husain, 2010**). Certaines peroxydases transforment pratiquement tous les composés aromatiques (phénols et amines) et même les chaînes carbonées linéaires (**Dunford, 1999**).



**Figure 12: Dégradation des composés phénoliques en fonction du temps de réaction avec l'enzyme.**  
 (A) Acide gallique, (B) Acide ferulique, (C) Acide 4-hydroxybenzoïque, (D) 4-Tyrosol, (E) Pyrogallol.



## **I.4. Etude de la biodégradation des composés phénoliques des eaux usées**

### **I.4.1. Etude des caractéristiques physico-chimiques des eaux usées de l'industrie de tannerie**

Les caractérisations physico-chimiques sont basées sur l'étude des paramètres suivants : pH, demande chimique en oxygène (DCO), composés phénoliques totaux. Les eaux usées de TAN Aliz présentent un rejet fortement pollué sous forme de liquide résiduel. Elles se caractérisent aussi par une odeur nauséabonde qui s'accroît au fur et à mesure de leur stockage.

- **pH**

La mesure du pH effectuée en trois (03) manipulations donne une valeur de l'ordre de 8,32. Cette valeur est inférieure à celle rapportée par **Zongo et al. (2011)** sur le même effluent. Ces eaux sont donc des effluents basiques. Cette basicité pourrait être due à l'utilisation de sulfate de chrome basique lors du tannage.

- **Demande chimique en oxygène (DCO)**

La teneur moyenne en matières organiques exprimée en DCO est de l'ordre de 10,25 g d'O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>. Ceci montre la forte demande en oxygène pour l'oxydation complète de la matière organique contenue dans cet effluent. Cette teneur en DCO est très élevée par rapport à celle enregistrée dans d'autres types de rejets. En effet, la DCO ne dépasse pas 4,02 g d'O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> dans les effluents d'abattoir qui sont considérés comme les principaux rejets à caractère organique dominant (**Aissam et al., 2002**).

- **Composés phénoliques**

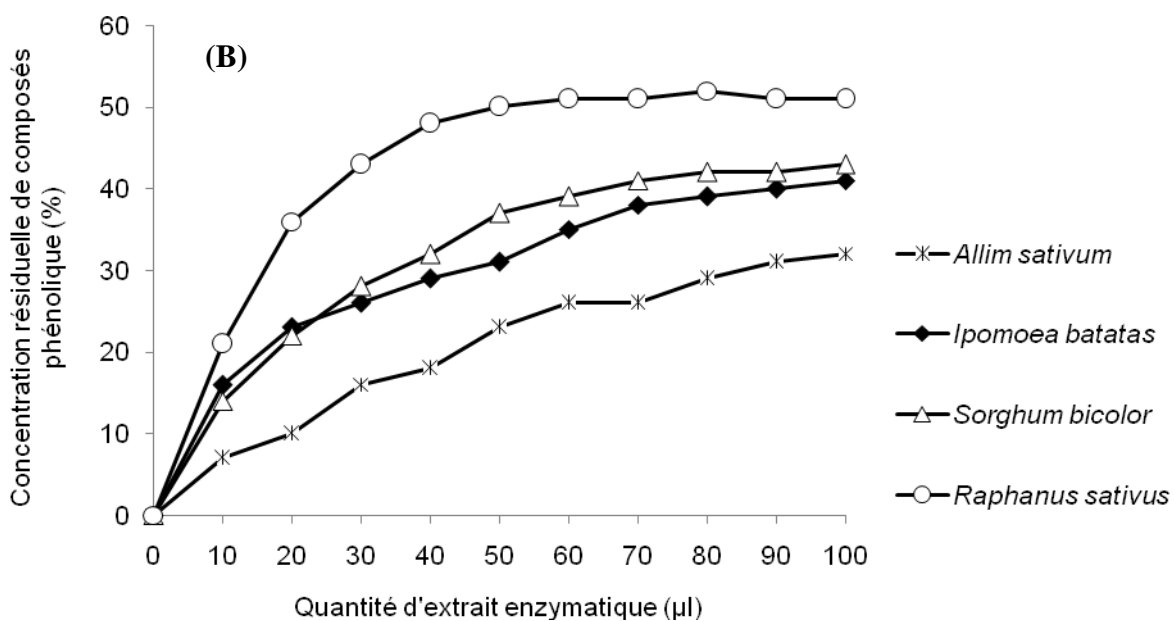
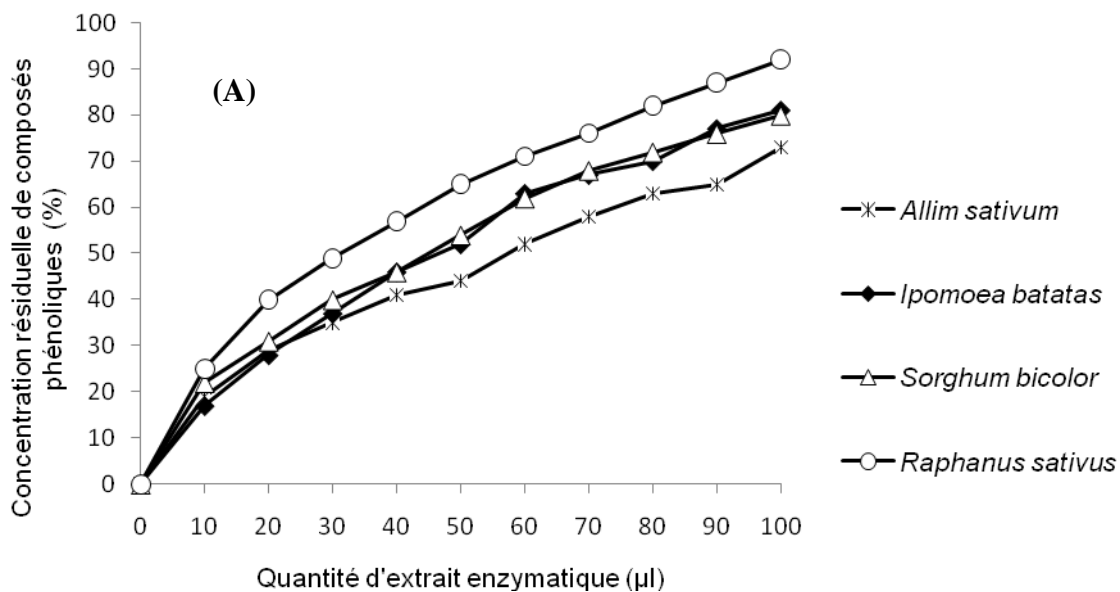
La concentration en phénols totaux des eaux usées est de 0,89 g/L. Le processus de tannage dans cette industrie utilise des fongicides et des teintures pour le retannage des cuirs tannés au sulfate de chrome basique. Cette étape pourrait être la source principale des composés phénoliques retrouvés dans ces eaux. Le rapport [phénols totaux]/[DCO] est égal à 0,087. Ceci montre que la concentration en composés phénoliques représente seulement une petite fraction de la matière organique

contenue dans les eaux usées. **Wagner et Nicell (2001a)** ont montré que cette faible concentration représente cependant la plus grande toxicité dans ces effluents. Ces produits, toxiques vis-à-vis des être vivants, s'accumulent dans les graisses animales, généralement peu solubles dans l'eau et se concentrent dans les huiles telles que les hydrocarbures et sédiments (**Nath et al., 1997**). Ils confèrent un pouvoir anti-microbien (**Ranalli, 1991a ; Capasso, 1997**) aux eaux usées qui les contiennent. Ce qui pourrait limiter toute biodégradation naturelle, et par conséquent pourrait entraîner une perturbation plus ou moins profonde de tout l'écosystème.

#### **I.4.2. Effet de la quantité de l'extrait enzymatique sur la biodégradation des eaux usées.**

Des concentrations croissantes d'extraits bruts d'*Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* et *Sorghum bicolor* ont été utilisées pour tester l'efficacité des peroxydases à dégrader les composés phénoliques contenus dans les eaux usées. Comme obtenu avec les eaux phénoliques (**Fig. 12**), durant le traitement, aucun changement significatif dans les concentrations de phénol des eaux usées n'a été observé dans le témoin sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainsi, la dégradation des composés phénoliques des eaux usées est essentiellement due aux POXs. En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les milieux réactionnels ont tendance à devenir incolore, avec l'apparition de précipités, ce qui indique que la dégradation des composés phénoliques est effectivement causée par des activités des POXs. Des quantités résiduelles de composés phénoliques ont été déterminées après traitement avec différentes quantités d'extraits enzymatiques et après centrifugation (**Fig. 13B**). Des études ont montré la capacité du polyéthylène glycol (PEG) à renforcer l'action des peroxydases sur les composés phénoliques (**Dalal et Gupta, 2006**). Son effet a également été testé dans la présente étude (**Fig. 13A**). Il est clairement apparu que l'addition de PEG dans le milieu réactionnel améliore considérablement la dégradation des composés phénoliques (**Fig. 13A et Fig.13B**). Sans PEG, la transformation maximale de phénol par les POXs des quatre plantes variait entre 32 % à 55 %. L'autre avantage de l'utilisation du PEG est qu'il est non toxique (**Cheng et al., 2006; Gonzalez et al., 2008**). En outre, il est un composé biodégradable et donc peu d'impact sur l'environnement. Les meilleurs rendements de dégradation ont été obtenus avec

l'extrait de *Raphanus sativus* et les plus faibles, avec l'extrait d'*Allium sativum*. Avec l'ajout du PEG dans le milieu réactionnel, le rendement de la dégradation augmente rapidement en fonction de la quantité d'enzyme (**Fig. 13A**). Le rendement le plus élevé est également obtenu avec les POXs de *Raphanus sativus* et le plus bas avec les POXs d'*Allium sativum* et variait de 72 % à 93 %. Les comparaisons entre la dégradation des phénols par les POXs avec et sans PEG ont montré une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les deux méthodes. En présence de PEG, la quantité d'extrait de plantes nécessaire pour la dégradation des composés phénoliques est inférieure à la quantité nécessaire pour le même niveau de dégradation en l'absence de PEG (**Fig. 13A et 13B**). La comparaison des profils de la cinétique de dégradation (**Fig. 13A et 13B**) montre que les POXs peuvent être totalement inactivées avant une dégradation complète de tous les composés phénoliques. L'inactivation apparente des peroxydases durant la réaction de polymérisation du phénol est principalement causée par l'adsorption des molécules de peroxydase aux produits de réaction. PEG améliore le rendement de la dégradation sans doute en réduisant au minimum l'interaction entre les POXs et les radicaux libres produits au cours de la catalyse de dégradation. Des résultats semblables ont été obtenus sur la biodégradation du pentachlorophénol par la peroxydase d'*Armoracia cochlearia* (**Zhang et Nicell, 2000**). D'autres études sur la peroxydase de raifort ont montré que le PEG améliore la biodégradation des composés phénoliques en formant une couche protectrice sur le site actif de l'enzyme qui empêche l'attaque des radicaux libres formés lors de la catalyse (**Cheng et al., 2006**). Bon nombre de radicaux libres interagissent avec le PEG en raison de leur plus grande affinité avec le PEG que l'enzyme, empêchant ainsi l'adsorption du produit de réaction sur les sites actifs des molécules d'enzyme (**Tonegawa et al., 2003; Gonzalez et al., 2008**). La réaction enzymatique dans cette méthode peut être considérée comme un type de cinétique modifiée, différente de la cinétique ping-pong décrite par **Dunford (1991)** pour les peroxydases.

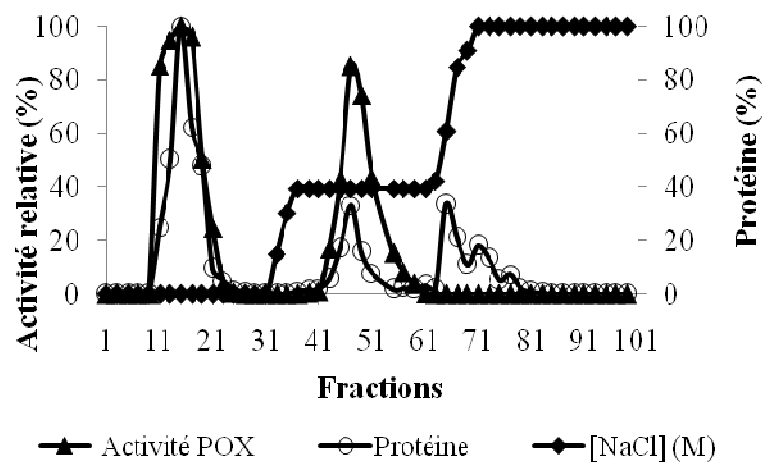


**Figure 13: Dégradation des composés phénoliques des eaux usées en fonction de la quantité d'extrait enzymatique de *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* ou *Sorghum bicolor* utilisée. (A) en présence de PEG; (B) en absence de PEG.**

## II. PURIFICATION ET CARACTERISATION DES PEROXYDASES DE RADIS ET DE PATATE DOUCE

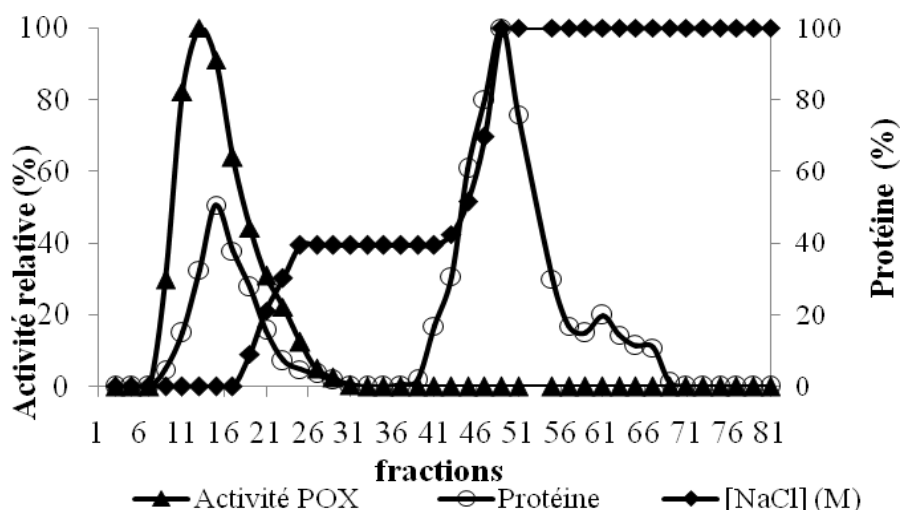
### II.1. Etapes de purification

Les peroxydases de radis et de patate douce ont été purifiées par des protocoles différents. Deux POX (POXr1 et POXr2) ont été purifiées à partir de l'extrait enzymatique brut de radis. Le procédé de purification comprend deux étapes chromatographiques pour chacune des peroxydases. La chromatographie d'échange de cations a permis de mettre en évidence deux pics d'activités peroxydasiques. Ces pics obtenus, sont élués de la 11<sup>ème</sup> à la 20<sup>ème</sup> fraction pour l'un et pour l'autre de la 42<sup>ème</sup> à la 59<sup>ème</sup> fraction. Ces pics sont désignés respectivement POXr1 et POXr2 (**Fig. 14**). Cette étape permet aussi d'éliminer une grande partie des pigments et des protéines de l'extrait brut enzymatique. L'activité peroxydasique POXr1 obtenue dans le lavage est séparée sur le gel DEAE-Sepharose CL-6B. La protéine enzymatique responsable de cette activité est éluée par la suite avec un gradient de NaCl allant de 0 à 1 M contenus dans le tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0) (**Fig. 15**). La protéine enzymatique POXr2 obtenue est purifiée sur le gel d'interaction hydrophobique phényl-Sepharose HP (**Fig. 16**). Elle est éluée à 0,3 M de sulfate d'ammonium.



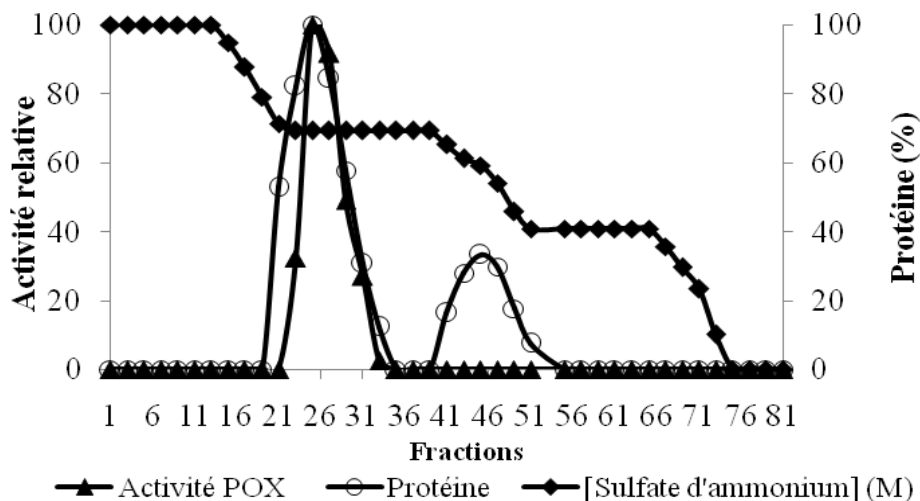
**Figure 14: Profil chromatographique des peroxydases de l'extrait brut de radis sur le gel CM-Sepharose CL-6B.**

La colonne (2,6 x 6,0 cm) est équilibrée dans le tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 5,0); le débit est de 2.5 ml/min; le volume des fractions est de 3 ml; un gradient en escalier croissant de NaCl, (0; 0,3 et 1M) est appliqué.



**Figure 15: Profil chromatographique de la peroxydase POXr1 de radis sur gel DEAE-Sepharose CL-6B.**

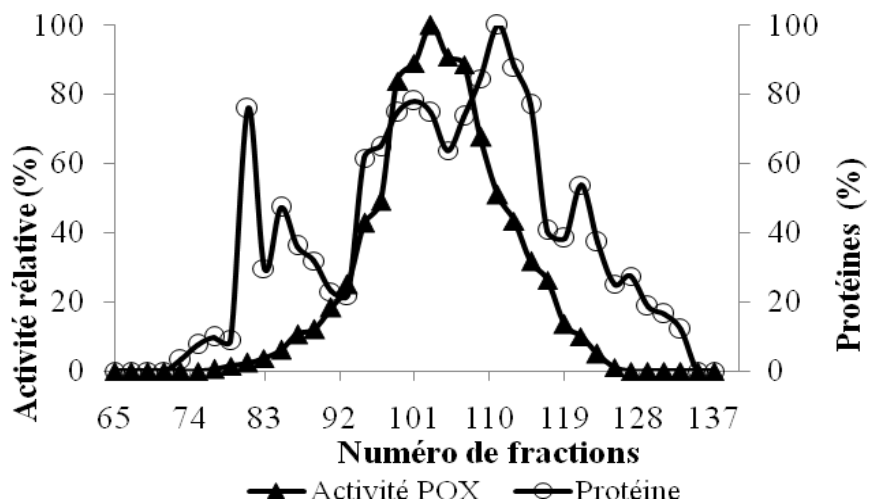
La colonne (2,6 x 4,0 cm) est équilibrée dans le tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0); le débit est de 1 ml/min; le volume des fractions est de 1 ml; un gradient en escalier croissant de NaCl, (0; 0,3 et 0,5 M) est appliqué.



**Figure 16: Profil chromatographique de la peroxydase POXr2 de radis sur gel Phényl-Sepharose CL-4B.**

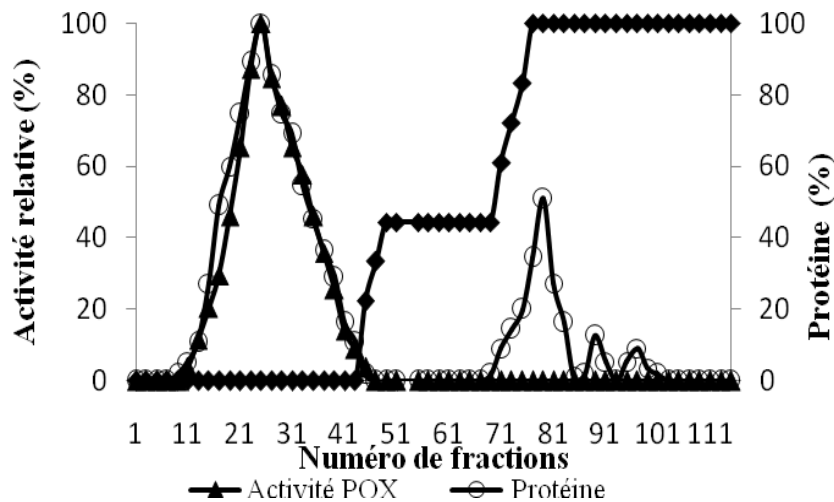
La colonne (1,4 x 4,6 cm) est équilibrée dans le tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 5,0) contenant 1,7 M du sulfate d'ammonium; le débit est de 0,33 ml/min; le volume des fractions est de 1ml; un gradient en escalier décroissant de thiosulfate de sodium (1,7 ; 1 ; 0,5 ; 0,3 et 0 M) est appliqué.

Quant à la purification de la peroxydase de patate douce, l'extrait brut a été d'abord précipité dans du sulfate d'ammonium avant d'être séparé sur le gel d'exclusion moléculaire (**Fig. 17**). Cette étape chromatographique a permis de séparer un seul pic d'activité peroxydasique désigné POXp. Cette fraction a subi une seconde étape chromatographique sur le gel échangeuse d'anion. La POXp a été purifiée à homogénéité après cette étape (**Fig. 18**).



**Figure 17: Profil chromatographique de la peroxydase de patate douce POXp sur gel Sephacryl S-200 HR.**

La colonne (1,6 x 65 cm) est équilibrée dans le tampon citrate-Phosphate 20 mM (pH 6,0); le débit est de 0,25 ml/min; le volume des fractions est de 2ml.



**Figure 18: Profil chromatographique des peroxydases de patate douce sur le gel DEAE-Sepharose CL-6B.**

La colonne (2,6 x 6,0 cm) est équilibrée dans le tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 6,0); le débit est de 2,5 ml/min; le volume des fractions est de 1 ml; un gradient en escalier croissant de NaCl, (0; 0,3 et 1M) est appliqué.

## II.2. Bilan de la purification

Les tableaux III et IV résument les données obtenues au cours du processus de purification des POXs de l'extrait brut enzymatique de radis et de patate douce, respectivement. Les résultats montrent que les peroxydases POXr1, POXr2 sont purifiées respectivement 18,5 et 27,18 fois à partir de 176,06 mg de protéines contenus dans 20 ml d'extrait brut enzymatique de radis. POXp a été purifiée 20,57 fois à partir de 1019,97 mg de protéines contenus dans 20 ml de patate douce. Les rendements obtenus sont de 18,25 % pour la POXp. Ceux de POXr1 et POXr2 sont respectivement de 22,11 % et 15,49 %. Ces rendements sont significativement meilleurs que ceux obtenus par **Hermelinda et al. (2007)** sur la purification d'une peroxydase à partir des feuilles de *Copaifera lansdorffii*. Mais ils sont plus faibles que ceux obtenus par **Zia et al (2011)** sur la purification de la peroxydase de la pomme de terre (39,99 %) et celle des graines d'orange (33,70%). De même, ils sont plus faibles que ceux obtenus (28 %) par **Dicko et al. (2006)** sur la purification de la POX cationique du sorgho.



**Tableau III: Bilan global de la purification de la peroxydase de *Raphanus sativus***

Etapes de purification	Protéine totale (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de Purification	Rendement
Radis extrait brut	176,06	38530,16	226,32	1	100
CM- Sépharose CL-6B	15,36	29074,85	1892,03	8,36	75,46
DEAE-Sépharose CL-6B (POXr1)	2,03	8518,93	4186,92	18,5	22,11
Phenyl Sépharose CL-4B (POXr2)	0,97	5969,06	6151,37	27,18	15,49

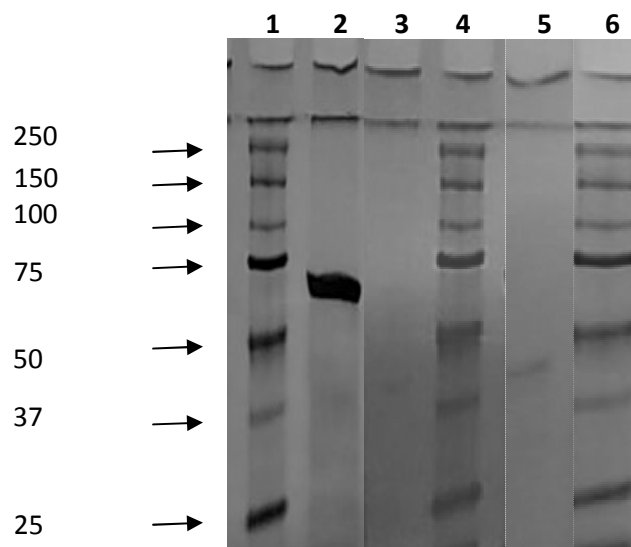
**Tableau IV: Bilan de purification de la peroxydase du tubercule de *Ipomoea batatas***

Etape de purification	Protéine totale (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U /mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut enzymatique	1019,97	41100,23	40,29	1	100
Sulfate d'ammonium	443,78	34330,18	77,36	1,92	83,53
Séphacryl-S100 HR	99,22	2225,17	157,1	3,90	37,93
DEAE-Sépharose CL-6B	9,05	7500,34	828,77	20,57	18,25

### II.3. Détermination des propriétés moléculaires des peroxydases purifiées

L'électrophorèse réalisée en conditions dénaturantes en présence de SDS et de  $\beta$ -mercaptoéthanol sur un gel de polyacrylamide à 10 % est représentée par la **Figure 19**. Les masses moléculaires des trois peroxydases ont été estimées en comparant leur poids moléculaire à celle des marqueurs protéiques de masses moléculaires connues (**Fig. 19**). Les résultats montrent que POXp migre sous forme

d'une seule bande et son poids moléculaire est estimé à 43 kDa (**Fig. 19**). Dans les mêmes conditions, les POXr1 et POXr2 apparaissent aussi chacune sous forme d'une seule bande protéique avec des poids moléculaires apparents respectivement de 70 et 40 kDa. Des poids moléculaires plus faibles ont été rapportés pour la POX de *Raphanus sativus* japonais (28KDa) (**Ohya et al., 1997**), *Sorghum bicolor* (38 kDa) (**Dicko et al 2006**), *Coprinus cinereus* (36 kDa) (**Ikehata et al., 2005**). Les poids moléculaires de POXs provenant de diverses plantes sont généralement compris entre 30 et 60 kDa (**Thongsook et Barrett, 2005**) . La masse moléculaire élevée observée sur POXr1 peut être attribuée non seulement à des modifications post-traductionnelles de la chaîne polypeptidique, mais aussi à sa composition en chaînes de glycanes communément présents dans les POXs des plantes (**Sakharov et al., 2000 ; Dicko et al., 2006 ;**). Une peroxydase de poids moléculaire très élevée (98 KDa) a été rapporté par **Scialabba et al (2002)**. Les POXs de notre étude sont toutes des protéines monomériques comme celles des POXs sécrétoire des plantes (**Johri et al., 2005 ; Vitali et al., 1998 ; Kim et Lee, 2005 ; Hermelinda et al., 2007**).



**Figure 19:Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % (p/v) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des peroxydases POXr1 et POXr2 de radis et POXp de patate douce.**

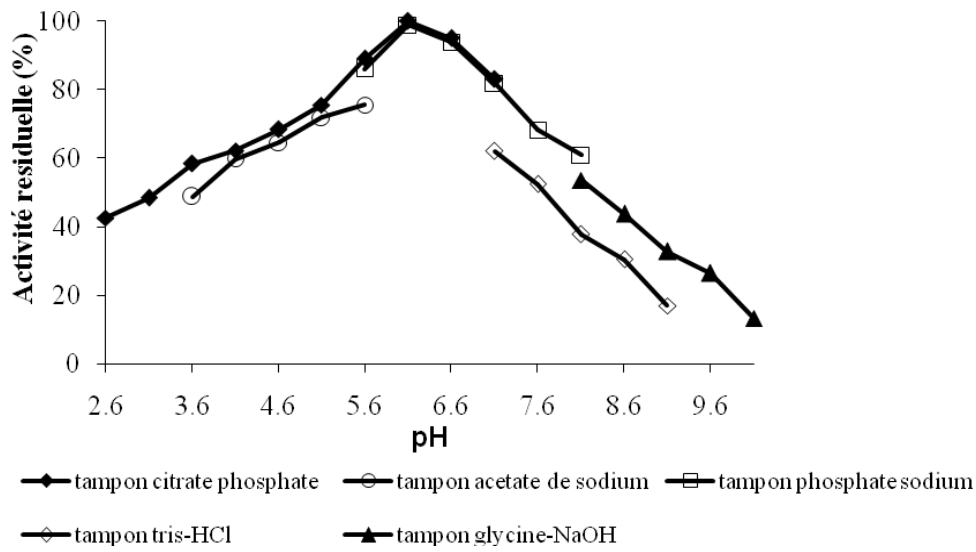
1, 4 et 6 : marqueurs de poids moléculaire ; 2 : peroxydases POXr1 purifiée ; 3 : Peroxydase POXr2 purifiée ; 5 : Peroxydase POXp purifiée.

## II.4. Propriétés physico-chimiques des peroxydases de radis et de patate douce

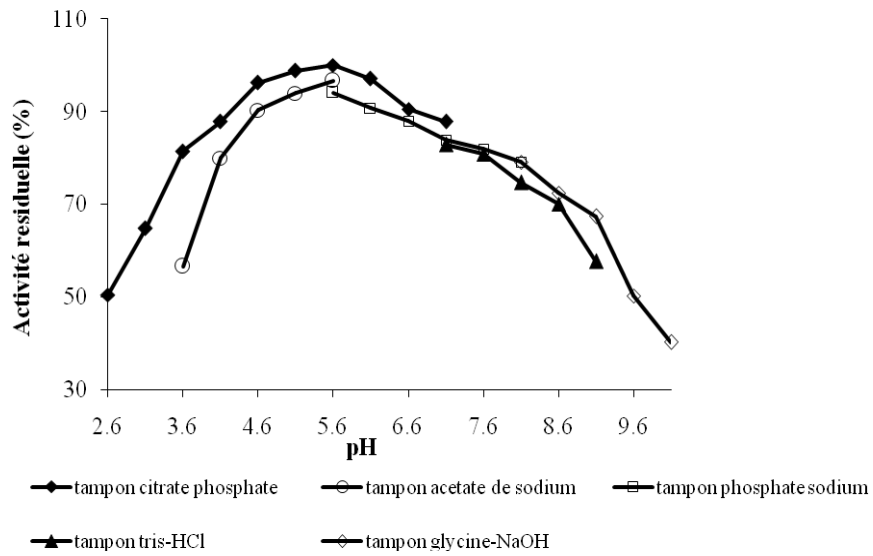
### II.4.1 Influence du pH sur l'activité des enzymes

- **Détermination des pH optimums d'activité des peroxydases**

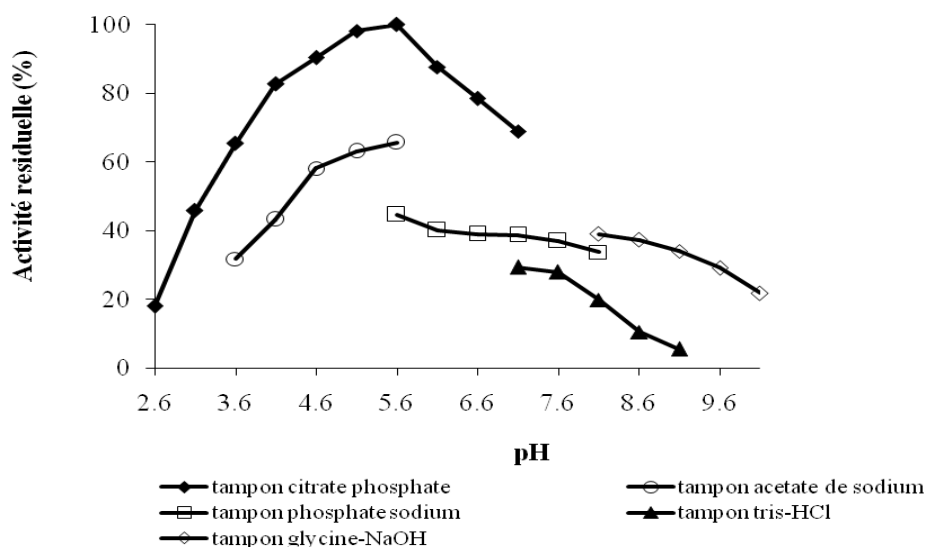
L'étude de l'influence du pH associé à celui de la nature du tampon sur l'activité des peroxydases a été réalisée dans le but d'apprécier le comportement de ces enzymes dans différents milieux d'incubation d'une part et d'autre part de définir les meilleures conditions d'oxydation en milieu tamponné. Les pH optimums d'oxydation des trois peroxydases ont été déterminés dans les tampons citrate-phosphate 100 mM pH (2,6-7), acétate de sodium 100 mM pH (3,6 à 5,6), phosphate de sodium 100 mM pH (5,6 à 8,0), Tris-HCl 100 mM pH (7-9) et le tampon glycine-NaOH 100 mM pH (8-10). La **Fig. 20** indique que l'activité de la peroxydase POXp est maximale à pH 6. En revanche, les peroxydases POXr1 et POXr2 possèdent la même valeur de pH optimum. Elle est de 5,6 (**Fig. 21** et **Fig. 22**). Comme la plus part des peroxydases des plantes, les trois peroxydases possèdent des pH optimum en zone de pH acide. POXp a un pH optimum d'activité similaire à celui de *Solanum melongena* (**Vernwal et al., 2006**) et ceux de POXr1 et POXr2 sont similaires à celui obtenu par pour la peroxydase de soja (**Wright et Nicell, 1999**). Par contre ces trois peroxydases possèdent des pHs inférieurs à celui rapporté par **Hermelinda et al (2007)** sur les peroxydases des feuilles de *Copaifera langsdorffii*.



**Figure 20:pH optimum de la peroxydase de patate douce POXp.**  
 Le substrat utilisé est le gaïacol, l'activité a été déterminée dans différents tampons de pH compris entre 2,6 et 10.



**Figure 21:pH optimum de la peroxydase POXr1 de radis.**  
 Le substrat utilisé est le gaïacol, l'activité a été déterminée dans différents tampons de pH compris entre 2,6 et 10.



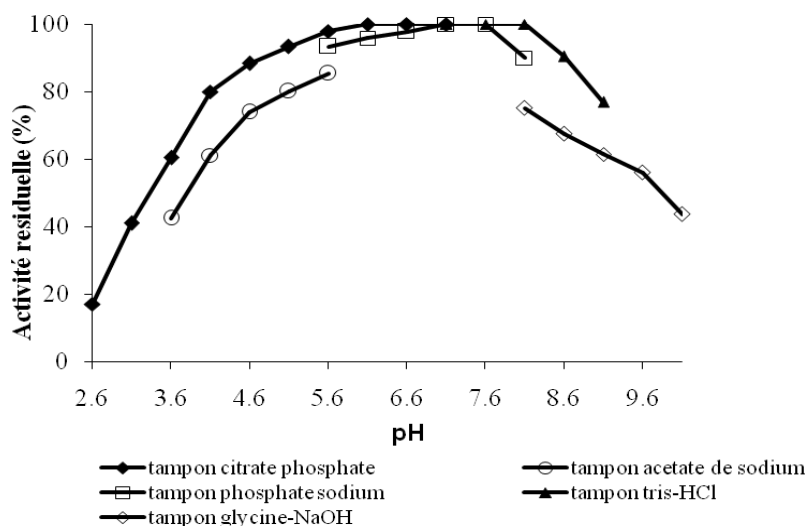
**Figure 22: pH optimum de la peroxydase POXr2 de radis.**

Le substrat utilisé est le gaïacol, l'activité a été déterminée dans différents tampons de pH compris entre 2,6 et 10.

- **Influence de la nature du tampon sur l'activité des peroxydases**

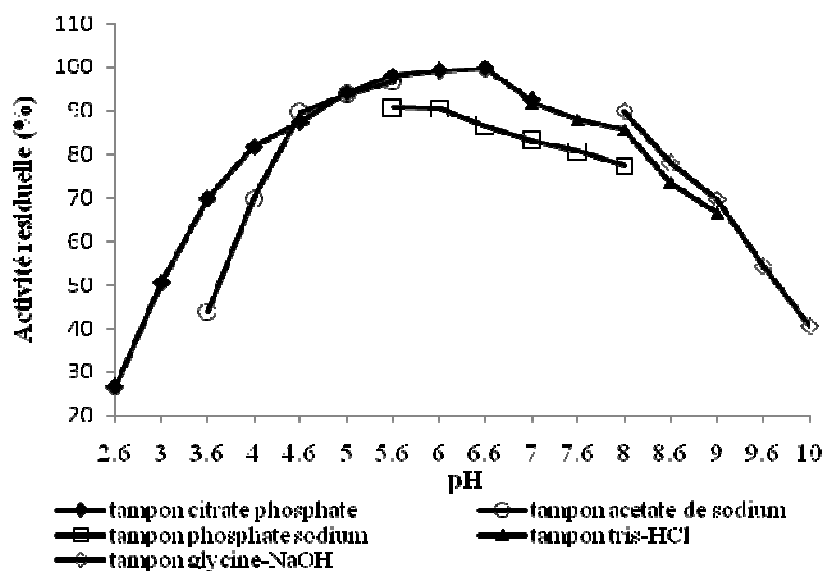
L'étude de la stabilité en fonction du pH des trois peroxydases est réalisée dans des tampons différents au pH variant entre 2,6-10. Les **figures 23, 24 et 25** montrent que ces trois peroxydases observent relativement des comportements différents après deux heures de préincubation. L'activité des POXr1 et POXr2 est nettement plus élevée dans le tampon acétate de sodium et citrate-phosphate qu'elle ne l'est dans les autres. Outre ces deux tampons, le tampon phosphate de sodium constitue un bon milieu pour la POXr2. POXp est plus active dans les tampons citrate-phosphate, phosphate de sodium et tris-HCl. En effet, la zone de stabilité des peroxydases POXr1 et POXr2 se situe entre pH 4,6 et 6,6 tandis que celle de la peroxydase POXp est comprise entre pH 4,6 et 8,6. A ces zones de pH, les enzymes retiennent plus de 90% de leurs activités. La diminution de l'activité à faible pH pourrait être attribuée au détachement de l'hème de la chaîne polypeptidique, ce qui entraîne la perte de l'activité enzymatique (**Deepa et al., 2002**). La diminution de l'activité à pH élevé pourrait être attribuée à la formation de phénol-conjugués basiques. Par conséquent, les pHs basiques ne permettraient pas les composés phénoliques à agir en tant que donneurs d'hydrogène. Ces composés auront plutôt tendance à former des ions

phénolates (pKa phénol  $\approx$  10,3). Ainsi, les meilleurs résultats pour l'activité des POXs sont obtenus à pH 4,6 -8,0. Donc l'utilisation de pH proche de la neutralité pourrait être recommandée pour les applications biotechnologiques.



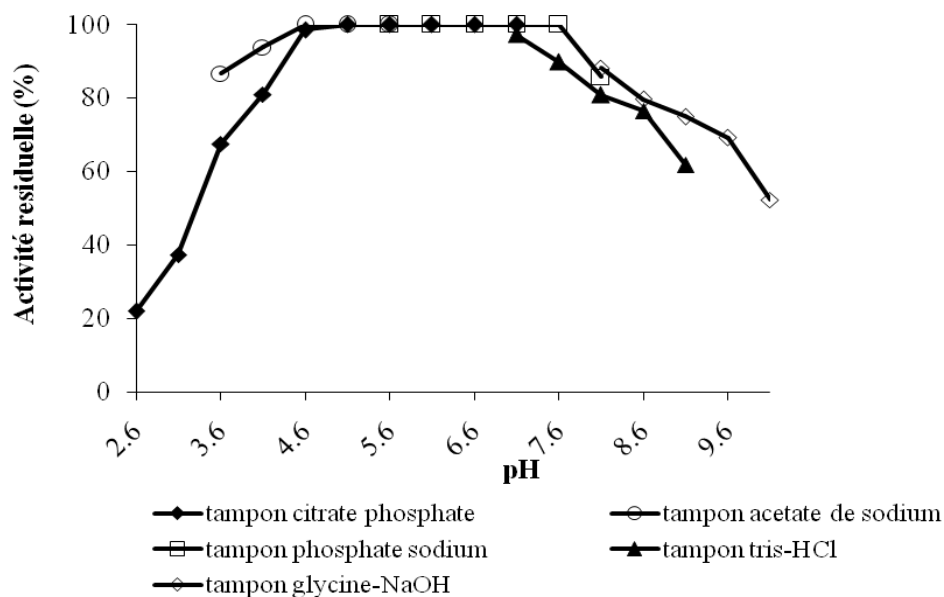
**Figure 23: Influence du pH et de la nature du tampon sur l'activité de la peroxydase de patate douce POXp.**

Le substrat utilisé est le gaïacol, l'activité a été déterminée dans différents tampons de pH compris entre 2,6 et 10.



**Figure 24: Influence du pH et de la nature du tampon sur l'activité de la peroxydase POXR1 de radis.**

Le substrat utilisé est le gaïacol, l'activité a été déterminée dans différents tampons de pH compris entre 2,6 et 10.

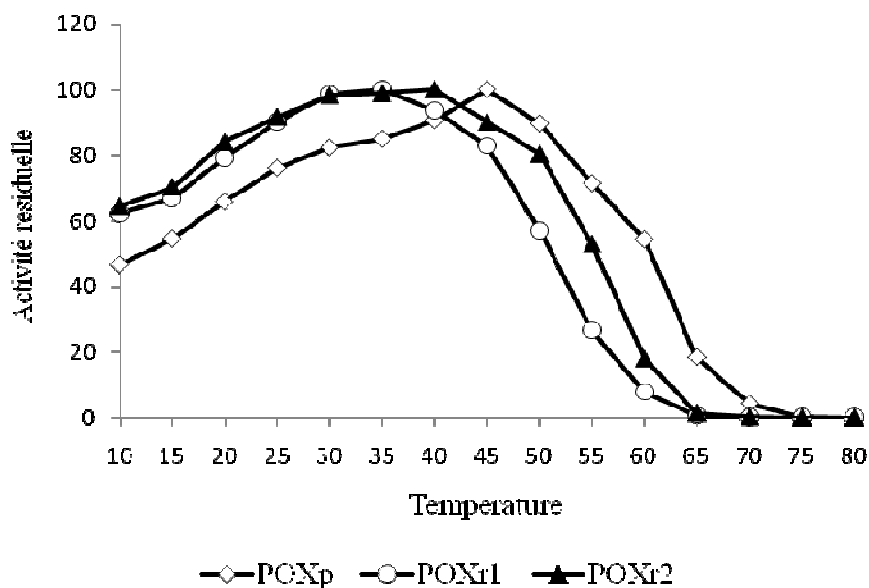


**Figure 25: Influence du pH et de la nature du tampon sur l'activité de la peroxydase POXr2 de radis.**

Le substrat utilisé est le gaïacol, l'activité a été déterminée dans différents tampons de pH compris entre 2,6 et 10

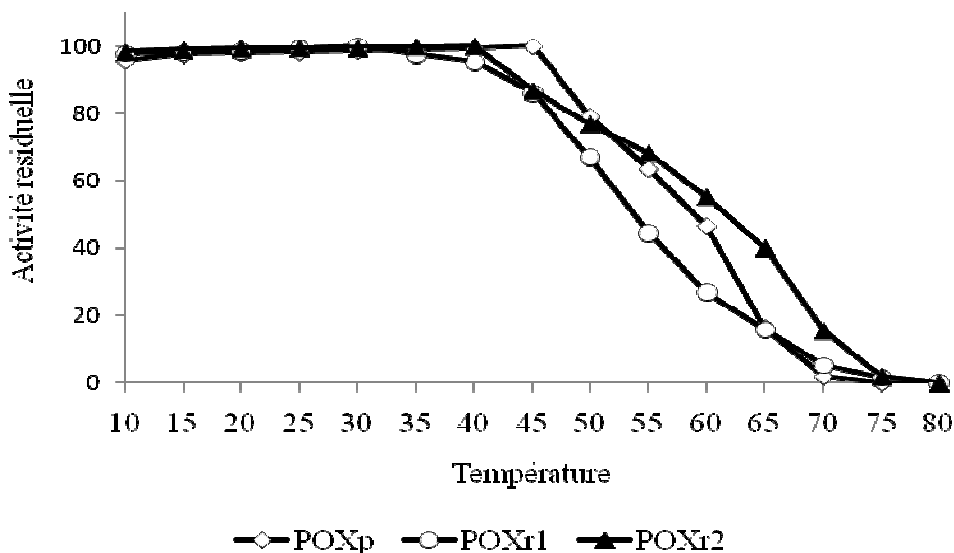
#### II.4.2. Détermination des températures optimales et l'étude de la dénaturation thermique.

L'influence de la température sur les activités catalytiques des trois peroxydases est montrée par les **figures 26** et **27**. Les températures optimales d'oxydation sont de 35 et 40 °C respectivement pour POXr1 et POXr2, et de 45 °C pour POXp. Ces données sont largement inférieures à celle obtenue pour la thermostable peroxydase de *solanum melongena* (84 °C) (**Vernwal et al., 2006**). Toutefois, POXr2 a cependant une température optimale égale à celle de la peroxydase anionique du tournesol (**Hager et al., 2008**).



**Figure 26: Température optimale des peroxydases POXp, POXr1 et POXr2.**

L'étude de la dénaturation thermique révèle que les enzymes sont chacune stables aux températures inférieures à leur température optimale d'activité où elles conservent toutes leurs activités dans les conditions expérimentales. Au-delà de leur température optimale respective, on observe une baisse notable de l'activité catalytique des enzymes, traduisant leur dénaturation par la chaleur (**Fig. 27**).



**Figure 27: Dénaturation thermique des peroxydases POXp, POXr1 et POXr2**



## II.5. Etude de l'effet des agents chimiques sur l'activité des peroxydases

### II.5.1. Effet des ions et de l'EDTA

L'influence de différents ions métalliques et des agents chélateurs sur les enzymes purifiées sont présentés dans le tableau V. L'étude montre que ces agents réagissent différemment sur les trois peroxydases. Les trois peroxydases sont activées par l'ion  $\text{Cu}^{2+}$ , ce qui indique leur rôle potentiel comme effecteur positif. **Zaalishvili et al. (1990)** ont observé qu'à faible concentration de  $\text{Cu}^{2+}$ , l'activité des peroxydases augmente tandis qu'à forte concentration, il y'a une inhibition de l'activité peroxydasique. Les ions  $\text{Zn}^{2+}$  n'ont pas d'effet sur la POXp, par contre, ils inhibent POXr1 et POXr2. En effet, **Singh et al. (2010)** a rapporté que  $\text{Zn}^{2+}$  crée une inhibition sur les peroxydases des variétés Chocklaty, Kinnaur et Maharaji de *Mallus pumilus*. En outre, **Şat (2008)** a montré que  $\text{Zn}^{2+}$  exerce un effet inhibiteur sur la peroxydase de *Helianthus tuberosus*. Contrairement à ces auteurs, **Wang et al. (2008)**, ont montré que  $\text{Zn}^{2+}$  stimule les peroxydases des variétés de haricot. Quand aux ions  $\text{Mg}^{2+}$ , ils activent les trois peroxydases. Cependant, **Dubey et al. (2007)** ont observé pour la peroxydase de pomme une inhibition avec cet ion. Les ions  $\text{Ba}^{2+}$  n'ont pratiquement pas d'effet sur la POXr1 mais se montrent activateurs des POXr2 et POXp. Les trois peroxydases sont également activées par le  $\text{Ca}^{2+}$ . L'effet activateur du calcium témoigne qu'il maintient les liens peptidiques autour du site actif de la peroxydase (**Bakardjieva et al., 1996**). Il est important de souligner que POXp est inhibée par les ions  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , et l'EDTA.

**Tableau V: Effet des ions cationiques sur l'activité des peroxydases de radis et de patate**

Agents chimiques	Activité Relative (%) (5 mM)		
	POXr1	POXr2	POXp
Ba <sup>2+</sup>	100	156,21	146,69
Zn <sup>2+</sup>	30,74	30,56	102,49
Ca <sup>2+</sup>	115,2	108,1	140,49
Mg <sup>2+</sup>	124,23	111,36	105,78
Cu <sup>2+</sup>	161,38	165,45	147,52
K <sup>+</sup>	59,32	53,46	25,20
Na <sup>2+</sup>	73,42	64,02	64,46
Mn <sup>2+</sup>	91,23	88,18	27,27
EDTA	52,45	60,31	15,70

Les enzymes sont préincubées pendant 1h à la température ambiante en présence de différents ions cationiques. L'activité résiduelle est mesurée dans les conditions standard. Elle est exprimée en % d'activité par rapport à celui d'un essai témoin sans ion cationique.

### **II.5.2. Comportement des peroxydases vis à vis de détergents et d'agents réducteurs et de solvants organiques**

Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le fonctionnement des trois peroxydases, l'effet des détergents et agents dénaturants sur l'activité de ces enzymes a été étudié pour deux raisons. La première concerne une meilleure solubilisation du substrat en présence de ces agents chimiques. La seconde raison est liée à l'oxydation du substrat qui peut être facilitée après traitement de ce dernier en présence de ces composés. Les résultats montrent que tous les agents réducteurs exercent une inhibition sur les trois enzymes. L'azide de sodium, l'acide ascorbique et le thiosulfate inhibent complètement la POXp. Cet effet inhibiteur de l'azide de sodium a été également rencontré chez la peroxydase de *Withania*

*somnifera* (Johri *et al.*, 2005). L'effet inhibiteur de PCMB montre que ces enzymes pourraient contenir des groupements thiols nécessaires à leur catalyse. Le polyéthylène glycol (PEG) augmente les activités des trois POXs. Ce polymère non ionique a été utilisé dans les travaux de biodégradation et a montré une amélioration de la catalyse de POX notamment lors de la dégradation des composés phénoliques (Quintanilla-Guerrero *et al.*, 2008 ; Diao *et al.*, 2011). Il protège l'enzyme contre les effets des produits de réaction (Kinsley et Nicell, 2000).

**Tableau VI: Effet des détergents et des agents réducteurs sur l'activité des peroxydases de radis et de patate douce**

Agents réducteurs	Activité relative (%) (5mM)		
	POXr1	POXr2	POXp
Bisulfite de sodium	1,97	2,55	7,43
Vitamine C	0,67	0,53	00
Thiosulfate de sodium	1,88	0,22	00
PCMB	36,01	30,38	59,29
Azide de Sodium	1,34	00	00
Acide citrique	26,04	32,12	00
SDS	93,22	90,89	33,05
Polyéthylène glycol	256,23	261,16	556,61

Les enzymes sont préincubées pendant 1h à la température ambiante en présence de différents ions agents. L'activité résiduelle est mesurée dans les conditions standard. Elle est exprimée en % d'activité par rapport à celui d'un essai témoin sans ion cationique.

## II.6. Test de spécificité de substrat

Une gamme de composés phénoliques a été testée enfin de déterminer le meilleur substrat de chacun d'eux. Il ressort que ces trois peroxydases oxydent une large gamme de composés phénoliques comme les monophénols, les di et polyphénols. Ceci est d'une grande importance, car de nombreux effluents industriels contiennent une diversité de contaminants phénoliques; dont certains se prêtent mieux à un traitement enzymatique que d'autres techniques. Cependant, l'efficacité de la catalyse des POXs dépend de la nature chimique des substrats de réduction et de l'enzyme. Les résultats du tableau v montrent que le gaïacol est le meilleur substrat pour POXp et POXr2 et le meilleur substrat pour POXr1 est l'ABTS. L'activité relative obtenue avec la dopamine est de plus de 80 % pour les peroxydases de radis. Par contre, elle est de 35 % pour celle de patate douce. L'activité relative obtenue avec le pyrogallol est de 82 % pour POXr1. Par contre, elle est de l'ordre de 60 % pour POXr2 et POXp. Les POXr1 et POXr2 gardent plus de 50 % de leurs activités avec l'acide 4-méthoxyphénolique comme substrat. Les activités des trois peroxydases sont faibles avec l'acide férulique, l'acide para-coumarique, l'acide syringique, le 1-Naphtol, l'acide cafféique, l'acide 4-hydroxyphenylacétique et l'acide tannique. Ils sont oxydés par les peroxydases mais avec de faible degré par rapport à l'ABTS et le guaicol. Le résultat de ces études pourrait aider à utiliser ces POXs pour détoxifier les eaux usées contenant des composés phénoliques et pourrait donc avoir des implications importantes en matière de phytoremédiation. Plusieurs auteurs ont montré l'aptitude des peroxydases à dégrader les composés organiques récalcitrants comme les phénols et des phénols substitués (**Dalal et Gupta, 2006 ; Alemzadeh and Nejati, 2009; Ashraf and Husain, 2010 ; Diao et al., 2011**). D'aucuns pensent que les peroxydases par exemple transforment virtuellement tous les composés aromatiques (phénols et amines) et même les chaînes carbonées linéaires (**Dunford, 1999**). Ces enzymes ont montré leur efficacité sur le plan de la préservation de l'environnement car elle a permis d'épurer les effluents non pas seulement des industries agroalimentaires mais aussi et surtout les industries du textile et du papier (**Peralta-Zamora et al., 1998**).

**Tableau VII: Test de spécificité des substrats**

Composés phénoliques	Activité relative (%)		
	POXr1	POXr2	POXp
<b>ABTS</b>	100	91,23	73,28
<b>Gaiacol</b>	86,19	100	100
<b>Acide 4-hydroxybenzoïque</b>	28,56	30,65	22 ,19
<b>Acide ferulique</b>	17,5	40,22	10,99
<b>Acide gallique</b>	53,34	34,52	28,79
<b>Acide para-coumarique</b>	2,5	15,61	2,93
<b>Acide 4-methoxyphénolique</b>	61,66	55,43	32,56
<b>Acide syringique</b>	31,74	29,82	6,23
<b>1-Naphtol</b>	27,08	9,22	27,10
<b>Phloroglucinol</b>	21,52	31,13	3,29
<b>1,4-Tyrosol</b>	9,21	1,23	3,66
<b>caféine</b>	0,65	9,78	2,19
<b>vanilline</b>	50,94	14,74	5,13
<b>Acide 4-hydroxyphénylacétique</b>	0,91	0,69	2,19
<b>pyrogallol</b>	82,82	66,08	62,34
<b>catéchol</b>	41,52	33,04	57,69
<b>dopamine</b>	86,91	91,30	35,49
<b>Acide tannique</b>	3,69	3,34	0,00

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les études préliminaires sur la comparaison des peroxydases des quatre plantes sélectionnées ont montré l'activité peroxydasique varie d'une plante à l'autre et celle des tubercules de *Raphanus sativus* présentent la plus grande activité spécifique.

L'étude de la capacité des peroxydases des quatre plantes à dégrader les composés phénoliques a montré qu'elles dégradent toutes, les cinq composés phénoliques et que parmi elles, *Raphanus sativus* est la plus efficace.

L'étude de la biodégradation des eaux usées industrielles et la mise en évidence de l'influence du polyéthylène glycol sur la biodégradation des composés phénoliques de ces eaux par les peroxydases des quatre plantes a montré que ces enzymes dépolluent les eaux usées et que le polyéthylène glycol diminue considérablement le besoin en enzyme et augmente le rendement de la dégradation. Avec 100 µL d'extrait brut de *R. sativus*, on arrive à éliminer 93 % des composés phénoliques des eaux usées. Cela montre que la conception d'un procédé biotechnologique basé sur l'utilisation d'enzymes de plantes est possible pour l'élimination des composés phénoliques des eaux usées.

L'étude sur la purification et la caractérisation de ces enzymes ont montrée que l'extrait brut enzymatique de *Ipomoea batatas* contient une seule peroxydase (POX<sub>p</sub>) et celui de *Raphanus sativus* contient deux peroxydases purifiable par chromatographie phase liquide-basse pression. Ces trois peroxydases ont des poids moléculaires compris entre 40 et 70 kDa. Elles sont activées dans le tampon citrate-phosphate au pH variant de 5,6 à 6,0. Leurs températures optima d'activité sont comprises entre 35 à 45 °C. Les trois peroxydases réagissent différemment vis-à-vis des agents chimiques. Elles sont activées par les ions Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup> et inhibées par K et l'EDTA. L'azide de sodium, l'acide ascorbique, et le thiosulfate inhibent complètement la peroxydase de *I. batatas*. Ces trois peroxydases oxydent une large gamme de composés phénoliques comme les monophénols, di et polyphénols mais l'efficacité de la catalyse dépend de la nature chimique des substrats de réduction et de la source botanique de l'enzyme.

Cette étude pilote sur l'élimination de composés par les peroxydases et la caractérisation de ces enzymes peut servir de base pour une application expérimentale dans les effluents industriels. En perspectives on pourra envisager :

- Une analyse chromatographique (HPLC, CPG) des produits de la biodégradation.
- Un traitement à grande échelle des eaux usées industrielles à forte teneur en composés phénoliques par des extraits des peroxydases de radis local.
- Une étude de la cinétique de la peroxydase modifiée par le polyéthylène glycol

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeles F.B., Dunn L.J., Morgens P., Gallahan A., Dinderman R.E. and Schmidt J. (1988). Induction of 33-KDa and 60-KDa peroxidase during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiology* 87: 609-615.
- Afoufou F., Achour S. (2002). Effet de la préoxydation au permanganate de potassium sur l'élimination des substances humiques par floculation. *Courrier du savoir scientifique et technique*, n°2, 2002, 41- 46
- Agostini E., Hernández-Ruiz J., Arnao M.B., Milrad S.R., Tigier H.A. and Acosta M. (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip(*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnol. Applied Biochemistry* 35: 1-7.
- Aissam H., Errachidi F., Merzouki M., Benlemlih M. (2002). Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase. *Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé* 7 : 23-30.
- Akhtar S. and Husain Q. (2006) Potential applications of immobilized bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. *Chemosphere* 65: 1228-1235.
- Alemzadeh I. and Nejati S. (2009). Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials* 166: 1082–1086.
- Asada K. (1992). Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiology Plant* 85: 235-241.
- Asano T. (1998) Irrigation with reclaimed municipal wastewater: California experiences. CIHEAM, Options Méditerranéennes, Bari (Italy). pp. 119-132
- Ashraf H. and Husain Q. (2009). Removal of  $\alpha$ -naphthol and Other Phenolic Compounds from Polluted Water by White Radish (*Raphanus sativus*) Peroxidase in the Presence of an Additive, Polyethylene Glycol. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14: 536-542
- Ashraf H. and Husain Q (2010). Use of DEAE cellulose adsorbed and crosslinked white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase for the removal of alpha-naphthol in batch and continuous process. *International biodeterioration and biodegradation* 64:27-31



- Arunachalam M., Raj M.M., Mohan N. and Mahadevan A. (2003). Biodegradation of catechin. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 4 : 353-370.
- Belaid C., Kallel M. and Elleuch B. (2002). Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive. *Déchets sciences and techniques* 27: 30-34.
- Bennie D.T. (1999). Review of the environmental occurrence of alkylphenols and Alkylphenol ethoxylates, *Water Quality Research Journal of Canada* 34:79–122
- Berndt T. and Böge O. (2001). Gas-phase reaction of OH radicals with benzene: products and mechanism. *Physical chemistry chemical physics*. 3, 4946-4959.
- Bhunia A., Durani S. and Wangikar P.P. (2002). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering*. 72: 562–567.
- Biggs K.J. and Fry S.C. (1987). Phenolic cross-linking in the cell walls. In: physiology of cell expansion during plant growth. D.J. Gosgrove and D.P. Knievel, eds, American Society of Plant Physiologists, pp: 46-57.
- Blum H., Beier H. and Gross B. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bonnard N, Brondeau M.T., Jargot D., Lafon D., Miraval S., Schneider E (2008). Fiche ecotoxicologique. INRS. 8 Page
- Bratkovskaja I., Vidziunaite R., Kulys J. (2004). Oxidation of phenolic compounds by peroxidase in the presence of soluble polymers. *Biochemistry (Moscow)* 69:985–992.
- Bredemeijer G.M.M and Blaas, J. (1983). Peroxidase in the cell walls in intracellular substance and pollinated *Nicotiana glauca* stipe. *Acta Botanica Neerlandica* 32: 457-466
- Bredemeijer G.M.M. and Burg H.C.J. (1988). Peroxidase in variant cell of *Haplopappus gracilis*. *Acta Botanica Neerlandica* 34: 363-370
- Brown B.R. (1967). Biochemical aspects of oxidative coupling of phenols. In: Taylor WI, Battersby AR (eds) Oxidative coupling of phenols. *Marcel Dekker, New York*, pp 177–197

- Carr R.M., Blumenthal U.J. and Mara D.D. (2004) Health Guidelines for the Use of Wastewater in Agriculture: Developing Realistic Guidelines. In: Scott, C., N. Faruqi, and L.Raschid-Sally (ed.), *Wastewater Use in Irrigated Agriculture: Confronting the Livelihood and Environmental Realities*, CAB International, London.
- Castillo L. J., Alpeeva I. S., Chubar T. A., Galaev I. Y., Csoregi E. and Sakharov I. Y. (2002). Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science* 163: 1011-1019.
- Capasso R. (1997). The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Current Topics in Phytochemistry- Research Trends* 1: 145-156
- Cauchi H., Nakache S., Zagury B., Carre C.D., Dernat S. (1996). La réutilisation des eaux usées après épuration. *Techniques, Sciences et méthodes*, 2:81-118.
- Caza N., Bewtra J.K., Biswas N. and Taylor K.E. (1999). Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Research* 33: 3012-3018.
- Cheng J., Yu S.M. and Zuo P. (2006) Horseradish peroxidase immobilized on aluminum pillared inter-layered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Research* 40:283-290
- Chiou C.C., Chang P.Y., Chan E.C., Wu T.L., Tsao K.C. and Wu J.T. (2003). Urinary 8-hydroxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clinica Chimica Acta* 334: 87-94.
- Chun-Yi L. and Chung-Sheng L. (2008). Detection of Chitinolytic Enzymes in *Ipomoea batatas* Leaf Extract by Activity Staining after Gel Electrophoresis. *Journal of the Chinese Chemical Society* 55: 678-681
- Clarke J.R., Marquardt R.R., Oosterveld A., Frohlich A.A., Madrid F.J. and Dawod M. (1993). Development of a quantitative and sensitive enzyme linked immunosorbent assay for ochratoxin-A using antibodies from the yolk of the laying hen. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 41: 1784-1789.
- Colonna S., Gaggero N., Richelmi C. and Pasta P. (1999). Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *TIBTECH*. 17:163-168.
- Csiszár J., Lantos E., Tari I., Madoşá E., Wodala B., Vashegyi Á., Horváth F., Pécsváradi A., Szabó M., Bartha B., Gallé Á., Lazár A., Coradini G., Staicu M.,

- Postelnicu S., Mihacea S., Nedelea G. and Erdei L. (2007). Antioxidant enzyme activities in *Allium* species and their cultivars under water stress. *Plant, Soil and Environment* 53:517-523.
- Dalal S. and Gupta M.N. (2006). Treatment of phenol wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering. *Chemosphere* 67: 741-747.
- De Duve C. (1996). La naissance de cellules complexes. *Pour la Science* 224 : 92-102.
- Delannoy E., Marmey P., Pennel C. and Nicole M. (2004). Les peroxydases végétales de classe III. *Acta botanica gallica* 151: 353-380.
- Diao M., Ouédraogo N., Baba-Moussa L., Savadogo P.W., N'Guessan A.G., Bassolé I.H.N., Dicko M.H. (2011). Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. *Biodegradation* 22, 389–396.
- Dicko M.H., Hilhorst R., Gruppen H., Traore A. S., Laane C., Van Berkel W. J.H and Voragen A.G.J. (2002). Comparison of content in phenolic compounds, polyphenol oxidases and peroxidases in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50:3780-3788.
- Dicko M.H. (2005) Endogenous phenolics and starch modifying enzymes as determinants of sorghum for food use in Burkina Faso. Thèse de doctorat PhD, Université de Wageningen. Pays-Bas. 174 pages.
- Dicko M.H., Gruppen H., Hilhorst R., Voragen A.G.J, van Berkel W.J.H. (2006). Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase. *FEBS Journal* 273: 2293-2307
- Duarte-Vázquez M.A., Ortega-Tovar M.A., García-Almendárez B.E. and Regalado C. (2003). Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L. var. purple top white globe) peroxidase. *Journal Chemical Technology and Biotechnology* 78: 42–47.
- Dubey A., Diwakar S.K., Rawat S.K., Kumar P., Batra N., Joshi A., Singh J. (2007). Characterization of Ionically Bound Peroxidases from Apple (*Mallus pumilus*) Fruits. *Prep. Biochemistry and Biotechnology* 37: 1-12.

- Dunford H.B. (1991). Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. In: Everse J, Everse KE, Grisham MB (eds) Peroxidases in chemistry and biology, vol II. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1–25, 225–227.
- Dunford H.B. (1999). Heme peroxidases. *Wiley-VCH (H: Brian Dunford Ed.)*, New York. 507pages.
- El Ichi S., Abdelghani A., Hadji I., Helali S., Limam F. and Marzouki M.N. (2008). A new thermostable peroxidase from garlic (*Allium sativum*) bulb: its use in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensing. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 51: 33-41
- Escher, B. 1995. The Relationship between Membrane-Water Partitioning Uncoupling, and Inhibitory Activity of Substituted Phenols in Chromatophores of Rhodobacter Sphaeroides. Zürich.
- Egorov A.M. (1995). Peroxidase biotechnology and application. International Workshop peroxidase Biotechnology and Application. Oral abstracts: part i. Moscow, Russia 1995.
- Erman J.E. and Vitello L.B. (2002). Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochimica and Biophysica Acta* 1597: 193-220.
- Evans J.J. (1990). Cell wall bound and soluble peroxidases in normal and dwarf tomato. *Journal of Agricultural and Chemistry* 38: 948-951
- Faby J.A. et Brissaud F. (1997) L'utilisation des eaux usées épurées en irrigatin. *Office International de l'Eau*, 76 p.
- Gajanan S.G., Satish D.K., Jyoti P.J., Sanjay P.G. (2009). Purification and partial characterization of lignin peroxidase from *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890 and Its Application in Decolorization of Textile Dyes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 152:6-14.
- Gajhede M. (2001). Plant peroxidases: substrate complexes with mechanistic implications. *Biochemical Society Transactions* 29: 91–99.
- Galeano-Díaz T., Guiberteau-Cabanillas A., Mora-Díez N., Parrilla-Vázquez P. and Salinas López F. (2000). Rapid and sensitive determination of 4-nitrophenol, 3-methyl-4-nitrophenol, 4, 6-dinitro-o-cresol, parathion-methyl, fenitrothion, and parathion-ethyl by liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Chemistry* 48: 4508-4513.

- Garban B., Ollivon D., Teil M.J., Blanchard M., Blanchoud H., Motelay-Massei§ A., Chesterikoff C., Hanselin L., Rolet J., Le Genti J and Chevreuil M. (2003) Activités humaines et transferts de polluants organiques persistants (POP). Laboratoire Hydrologie et Environnement, Université Pierre et Marie Curie, Paris. 36 p.
- Gaspar T.H., Coren R., Huberman M. and Dubucq M. (1978). Citrus leaf abscission. Regulatory role of exogenous auxin and ethylene on peroxidase and endogenous growth substances. *Plant, Cell and Environment* 1:225-230
- Gaspar T.H., Penel C., Thorpe T. and Greppin H. (1982). Peroxidases 1970-1980. A survey of the Biochemical and physiological roles in Higher plant. Univ. Geneva, Switzerland. 324 P.
- Ghosh S. and Basu P.S. (1984). Hormonal regulation of sex expression and some physiological and biochemical change in *Luffa acutangula* RoxB. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 179: 277-287.
- Gold M.H. and Alic M. (1993). Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete. *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology Reviews* 57: 605-622.
- Gonzalez P.S., Agostini G., Milrad S.R. (2008). Comparison of the removal of 2,4 dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. *Chemosphere* 70:982–989.
- Hager J., Houda B., Michel R., Gisèle B., Elisabeth J. and Ezzeddine E.F. (2008) Partial purification and characterization of a copper-induced anionic peroxidase of sunflower roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 760-767.
- Handley L.W. and Locy R.D. (1984). Amylase secretion by sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam., cell cultures grown on various carbon sources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3: 237-245.
- Henriksen A., Smith A.T. and Gajhede M. (1999). The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *Journal of Biological Chemistry* 274:35005-35011.

- Henriksen A., Welinder K.G. and Gajhede M. (1998). Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9-Å resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH. *Journal of Biological Chemistry* 273: 2241-2248.
- Hermelinda P.F.M., Cibele M.C.P.G., Marcos T., Marcus S., Sergio M. and Gláucia M.P. (2007). Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *copaifera langsdorffii* leaves. *Quimica Nova* 30: 1067-1071.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y. and Matsui H. (2001). A large family of class III Plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42:462-468.
- Hirany S., Li D. and Jialal I. (1997) A more valid measurement of lowdensity lipoprotein cholesterol in diabetic patients. *American Journal of Medicine* 102: 48–53.
- Ikehata K., Buchanan I.D. and Smith D.W. (2003). Treatment of oil refinery wastewater using crude *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide. *Journal of Environmental Engineering and Science* 2:463–472
- Ikehata K., Buchanan I.D. and Smith D.W. (2004). Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science* 3:1-19.
- Ikehata K., Buchanan I.D., Pickard M.A., Smith D.W. (2005). Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenol treatment. *Bioresource Technology* 96:1758–1770
- INSD (2011). Indices du commerce extérieur du Burkina Faso. Deuxième trimestre 2011
- Johri, S., Jamwal, U., Rasool, S., Kumar, A., Verma, V., Qazi, G.N. (2005). Purification and characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability to oxidize IAA. *Plant Science* 169 : 1014–1021.
- Kibora L.O. (2011). L'exploitation de la filière cuir au Burkina et en Afrique de l'ouest. Article issu du site "Bouillon de Culture. <http://jeanpierrecailion.unblog.fr/2010/08/09/travail-du-cuir-2/>. Visité en décembre 2011.
- Kanner J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science* 36:169-189.
- Karam J. and Nicell J.A. (1997). Potential applications of enzymes in wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 69:141–153.

- Kay L.E. and Basile D.V. (1987). Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiology* 84: 99-105.
- Kawamura O., Sato S., Kajii H., Nagayama S., Ohtani K., Chiba J. and Ueno Y. (1989) A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin-A based on monoclonal antibodies. *Toxicon* 27: 887–897.
- Kennedy K., Alemany K. and Warith M. (2002) Optimisation of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorophenol. *Water SA* 28: 149–158.
- Kim Y.H, An E.S., Song B.K., Kim D.S and Chelikani R. (2003). Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potential application as anti-biofilm coating material. *Biotechnology Letters* 25: 1521–1524.
- Kim S.S. and Lee D.J. (2005). Purification and characterization of a cationic peroxidase Cs in *Raphanus sativus*. *Journal of Plant Physiology* 162: 609-617.
- Kinsley C. and Nicell J. A. (2000). Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Bioresource Technology* 73: 139–146.
- Klibanov A.M., Alberti B.N., Morris E.D. and Felshin L.M. (1980). Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters. *Journal of Applied Biochemistry* 2:414–421.
- Klibanov A.M. and Morris E.D. (1981). Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. *Enzyme and Microbial Technology* 3:119–122
- Klibanov A.M., Tu T.M. and Scott K.P. (1983). Peroxidase-catalyzed oxidation of phenols from coal-conversion. *Water Science* 221: 259–261.
- Köksal E. and Gülçin I. (2008). Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L.) buds. *Protein and Peptide Letters* 15: 320-326.
- Köksal K. (2011). Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*): Partial purification and some biochemical properties. *International Journal of Pharmacology* 7: 135-139.
- Leclère J., Orgiazzi J., Rousset B., Schlienger J. L et Wémeau J. L. (2001). La Thyroïde. *Seconde Edition. Scientifique et médicale Elsevier SAS*. 618 pages.

- Lefebvre E. (1990). Coagulation des substances humiques aquatiques par le fer ferrique en milieu aqueux. Effet de la préoxydation, Thèse de Doctorat, Université de Poitiers, France.
- Levis-Menzi R., Gaviozzi A., Riffaldi R., falzi L. (1992) L'épandage aux champs des margines: effet sur les propriétés du sol. *Olivae* 40: 20-25.
- Lewak S. (1986). Peroxidases and germination. In: Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. H. Greppin, C. Penel and TH Gappar eds, Univ. Geneva. Switsherland pp 367- 374.
- Linossier G. (1898) contribution à l'étude des ferment oxydant sur la peroxydase de pus. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie* 50: 373-375.
- Liu J.Z., Song H.Y., Weng L.P. and Ji L.N. (2002) Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 18:225–232.
- Liu J., Weiping Y. and Lo T. (1999). Copolymerization of lignin with cresol catalyzed by peroxidase in reversed micellar systems. *Electronic Journal of Biotechnology* 2: 82–87.
- LNAE(2008).Etat des investissements de TAN ALIZ pour bénéficier du concours de FODEPI. Rapport 2008
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farrra L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Mackay D. (1991). Multimedia Environmental Models. The Fugacity Approach. Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Mackay D., Shiu W.Y. and Sutherland R.P. (1979). Determination of Air-Water Henry's Law Constants for Hydrophobic Pollutants. *Environmental Science and Technology* 13 : 333-337.
- Majourhat K. and Baaziz M. (2004). Diversité et caractéristique des peroxydases foliaires du palmier dattier. Congrès international de biochimie. Marrakech, Maroc, 3-6 Mai 2004.
- Mika A. and Lüthje S. (2003). Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. *Plant Physiology* 132:1489–1498.



- Miquel G. (2003) La qualité de l'eau et de l'assainissement en France. Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Tome I, 198 p.
- Merliss R.R. (1972). Phenol marasmus. *Journal of Occupational Medicine* 14:55–56.
- Melhhorm H. Cottam DA., Lucas P.W. and Wellburn AR (1987). Induction of ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities by interaction of mixtures and air pollutants. *Free radical research communications* 3: 193-197
- Morisot A. and Tournier J.P. (1986). Répercussions agronomique de l'épandage d'effluents et déchets de moulins à huile d'olive. *Agronomie* 6 : 235-241.
- Nacoulma O. (1996). Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso. Cas du plateau central. Tome II. Thèse d'Etat, Université de Ouagadougou. 285 pages.
- Nair C.I., Jayachandran K. and Shashidhar S. (2008). Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology* 7: 4951-4958.
- Nath B.S., Suresh A., Varma B.M. and Kumar R.P.S. (1997). Changes in protein metabolism in hemolymph and fat body of the Silkworm, *Bombyx mori* in response to organsphosphorus insecticides toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (USA), 36: 169-173.
- Nencini C., Cavallo F., Capasso A., Franchi G.G., Giorgio G. and Micheli L. (2007). Evaluation of Antioxidative properties of *Allium* species growing wild in Italy. *Phytotherapy Research* 21: 874-878.
- Nicell J.A., Bewtra J.K., Biswas N. and Taylor E. (1993). Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. *Water Research* 27: 1629-1639.
- Nicell J.A. and Wright H. (1997) A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology* 21: 302–310.
- NTP (National Toxicology Program). (2010). Chemical health and safety information. National Institute of Environmental Health Sciences, National Institute of Health, USA. <http://ntp-server.niehs.nih.gov>. Accessed Jul 2010.
- Obinger C., Regelsberger G., Furtmuller P. G., Jakopitsch C. and Ruker F. (1999). Catalase peroxidases in cyanobacteria-similarities and differences to ascorbate peroxidases. *Free Radical Research* 31: 243-249.

- Ohya T., Morimura Y., Saji H., Mihara T. and Ikawa T. (1997) Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish . *Plant science* 125: 137-145
- Oueslati M.A., Haddad M. et Blake G. (1998). Elimination du phénol par deux plantes aquatiques : *Juncus fontanesii*( Gay) et *Lemna minor* L. *Revue des Sciences de l'eau* 4 :555-568.
- Penel C. (2000). The peroxidase system in higher plant. In integrated Plant System. H. Greppin, C. Penel, W.J. Broughton and R. Strasser, eds. University of Geneva. Switzerland. Pp 359-368
- Penel C., Valério L., Passardi F., Dobias J., Perez M. and Dunand C. (2004). Aspects moléculaires, biochimiques et physiologiques des peroxydases des plantes. *Enzymologie et Métabolisme* 166-169. *Congrès International de Biochimie. Marrakech. Maroc, 3-6 mai 2004.*
- Peralta-Zamora P., Esposito E., Pelegrini R., Grotto R., Reyes J. and Duran N. (1998). Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilised horseradish peroxidase. *Environmental Technology* 19: 55-63.
- Plagellat C. (2004). Origines et flux de biocides et de filtres uv dans les stations d'épuration des eaux usées, Thèse de Doctorat, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, Suisse.
- Poulos T.L., Edwards S.L., Wariishi H. and Gold M.H. (1993). Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *Journal of Biological Chemistry* 268: 4429-4440.
- Quintanilla-Guerrero F., Duarte-Vázquez M.A., García-Almendarez B.E., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R. and Regalado C. (2008). Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. *Bioresource Technology* 99: 8605–8611.
- Ragland B.D., Konrad R.J., Chaffin C., Robinson C.A. and Hardy R.W. (2000). Evaluation of a homogeneous direct LDL-cholesterol assay in diabetic patients: effect of glycemic control. *Clinical Chemistry* 46: 1848–1851.
- Rajapakse S., Nilmalgoda S.D., Molnar M., Ballard R.E., Austin D.F., Bohac J.R.(2004). Phylogenetic relationships of the sweetpotato in *Ipomoea* series *Batatas* (*Convolvulaceae*) based on nuclear beta-amylase gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30 : 623-32.

- Ramakrishna N., Lacey J., Candish A.A.G., Smith J.E. and Goodbrand I.A. (1990). Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay of aflatoxin B<sub>1</sub>, T-2 toxin and ochratoxin-A in barley. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 73: 71–76.
- Rannou P., Gawlicka A., Berner D., Pron A. and Nechtsschein M. (1998). Spectroscopic, structural and transport properties of conducting polyaniline processed from fluorinated alcohols. *Macromolecules*. 31: 1307–1315.
- Ranalli A. (1991a). the effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae* 37: 30-39.
- Ranalli A. (1991b). The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae* 39: 26-40.
- Rasmussen C.B., Henriksen A., Ahelskov A.K., Jensen R.B., Rasmussen S.K., Hejgaard J. and Welinder K.G. (1997). Purification, characterization and stability of barley grain peroxidase BP 1, a new type of plant peroxidase. *Physiologia Plantarum* 100: 102-110.
- Reinecke D.M. and Bandurski R.S. (1988). Auxin biosynthesis and metabolism In: P.J. Davies ed, plant hormones and their role in plant growth and development. Kluwer. Acad. Publ. Dordrecht pp 24-42.
- Regalado C., Garcia-Almendárez B.E. and Duarte-Vázquez M. A. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Rev.* 3:243-256.
- Rothan C. and Nicola J. (1989). Changes in acidic and basic peroxidase activities during tomato fruit ripening. *Horticultural Science* 24: 340-342
- Ruiz-Dueñas F.J., Camarero S., Perez-Boada M., Martinez M.J. and Martinez A.T. (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochemical Society Transactions* 29: 116-122.
- Sakharov I.Y., Castillo J.A., Areza J.C., Galaev I.Y. (2000). Purification and stability of peroxidase of African oil palm *Elaeis guineensis*, *Bioseparation* 9 125–132.
- Sakharov I.Y., Vorobiev A.C. and Castillo Leon J.J. (2003) Synthesis of polyelectrolyte complexes of polyaniline and sulfonated polystyrene by palm tree peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 661–667.
- Sakurai A., Toyoda S., Sakakibara M. (2001). Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Corpinus cinereus* peroxidase. *Biotechnology Letter* 23:995–998

- Santos de Araujo B., Santos de Oliveira J.O., Machado S.S. and Pletsch M. (2004). Comparative studies of the peroxidases from hairy roots of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas*, and *Solanum aviculare*. *Plant Science* 167: 1151-1157.
- Santos de Araujo B., Dec J., Bollag J.M. and Pletsch M. (2006). Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere* 63: 642-65.
- Şat I.G. (2008). The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *African Journal of Biotechnology* 7: 2248-2253.
- Saunders B.C., Holmes Siedle A.G. and Stark B.P. (1964). Peroxydase butterworths, Londons, 271p.
- Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 30:3875-3883.
- Scialabba A., Bellani L.M. and Dell'Aquila A. (2002). Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *European Journal of Histochemistry* 44: 351-358.
- Schönbein C. F (1855). Ueber die selbstblauung einiger pilze und das vorkommen von sauerstoffergerm sauerstofftragem in der pflanzenwelt. *Naturforschende Gesellschaft in Basel* 1: 339-355.
- Sharma A.K., Sehgal N. and Kumar A. (2002) A quick and simple biostrip technique for detection of lactose. *Biotechnology Letter* 24: 1737–1739.
- Shimon L.J.W., Rabinkov A., Miron T., Mirelman D., Wilchek M. and Frolow F. (2002). Alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*): crystallization and preliminary X-ray characterization. *Acta Crystallographica* 58 : 1335-1337.
- Silaghi-Dumitrescu R.L. (2003). Horseradish Peroxidase: summary of its structure, mechanism and substrate diversity. Department of chemistry, University of Georgia in Athens, Georgian, USA. Available at: <http://www.unige.ch/LABPV/publications/silaghi/Dumitrescu.html>.
- Singh J., Dubey A., Diwakar S. K., Rawat S.K., Batra N. and Joshi A. (2010). Biochemical Characterization of Peroxidases from the Fruits of *Mallus pumilus*. *International Research Journal of Biotechnology* (ISSN: 2141-5153) Vol. 1(4) pp.050-058, November, 2010

- Singleton D.W. and Khan S.A. (2003).Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. *Frontiers in Bioscience* 8:110–118.
- Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299:152-179.
- Smulevich G., Jakopitsch C., Droghetti E. and Obinger C. (2006). Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *Journal of Inorganic Biochemistry* 100: 568-585.
- Stajner and Varga S.I. (2003). An evaluation of antioxidant abilities of *Allium* species. *Acta biologica Szegediensis* 47: 103-106.
- Stanisavljević M. and Nedić L. (2004). Removal of phenol from industrial wastewaters by horseradish (*cochlearia armoracia* l) peroxidase. *Working and Living Environmental Protection* 4:345 – 349.
- Takemura Y., Wang D.H., Sauriasari R., Horita M., Tsutsui K., Sano K., Masuoka N., Takigawa T., Takaki J. and Ogino K. (2010). Evaluation of pyrogallol-induced cytotoxicity in catalase-mutant *Escherichia coli* and mutagenicity in *Salmonella typhimurium*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84:347–350.
- Thénard L.J. (1818). Observation sur des combinaisons nouvelles entre l'oxygène et les autres acides. *Annales de chimie et de physique* 8: 306-316.
- Theorell H. (1942). The preparation and some properties of crystalline horse-radish peroxidase. *för kemi, mineralogi och geologi* 16 (A) 2 : 1-11
- Tonegawa M., Dec J. and Bollag J.M. (2003) Use of additives to enhance the removal of phenols from water treated with horseradish and hydrogen peroxide. *Journal of Environmental Quality* 32:1222–1227
- Thongsook T. and Barrett D.M (2005) Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. Italica) Peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3206-3214.
- Veitch N.C. (2004).Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65: 249-259.
- Vernwal S.K., Yadav R.S.S. and Yadav K.D.S. (2006). Purification of a peroxidase from *Solanum melongena* fruit juice. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 43: 239-243.

- Vitali A., Botta B., Monache G.D., Zappitelli S., Ricciardi P., Melino S., Petruzzelli R., and Giardina B. (1998). Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell Cultures of cassia didymobotrya and biotransformation studies. *Biochemical Journal* (331, 513±519 (Printed In Great Britain)
- Volkammer R., Klotz B., Barnes I., Imamura T., Wirtz K., Washida N., Becker K.H. and Platt U., 2002. OH-initiated oxidation of benzene: I. Phenol formation under atmospheric conditions. *Physical chemistry chemical physics* 4: 1598-1610.
- Wagner M. and Nicell J.A. (2001a). Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater, *Water Science and Technology*. 43: 253–260.
- Wagner M. and Nicell J.A. (2001b). Treatment of a foul condensate from Kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research* 35: 485–495.
- Wagner M. and Nicell J.A. (2002). Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research* 36: 4041–4052
- Wang L., Kristensen B.K., Burhenne K., Rasmussen S.K. and Chang G.(2004). Purification and cloning of a Chinese red radish peroxidase that metabolises pelargonidin and forms a gene family in *Brassicaceae*. *Genetic* 343: 323-335.
- Wang S.Y., Gong Y.S., Zhou J.J. (2008). Chromatographic isolation and characterization of a novel peroxidase from large lima legumes. *Journal of Food Science* 74: 193-198.
- Welinder K.G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2: 388-393.
- Wright H. and Nicell J.A. (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology* 70: 69–79.
- Xialing C. and Lin M. (2009). Horseradish peroxidase catalyzed free radical cannot free move in reaction solution. *Journal of Biochemical Technology* 1:92-95
- Zaalishvili T.M., Dzhaparidze N.S., Sabelashvili D.M and Michilashvili R.D. (1990). The effect of Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> cations and biogenic amines on the poly (ADP-ribose) polymerase activities of brain nuclei and on the NAD content in nerve tissues. *Biokhimiia* 55: 695-64.

- Zia M.A., Kousar M., Ahmed I., Iqbal H.M.N. and. Abbas R.Z. (2011). Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds. *African Journal of Biotechnology* 10: 6300-6303
- Zhang G. and Nicell J.A. (2000). Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide, *Water Research* 34:1629–1637.
- Zongo I., Wéthé J., Merzouk B., Maïga A.H., Lopicque F. and Leclerc J.P (2011). Traitement de deux effluents textiles et d'un effluent simulé de tannerie par électrocoagulation: étude énergétique et effet des paramètres opératoires sur le traitement des polluants. *European journal of scientific research* 2: 216-235
- Zor T. and Selinger Z. (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry* 236:302–308

## LISTE DES PUBLICATIONS

- Diao M., Ouédraogo N., Baba-Moussa L.S., Savadogo P.W., Amani G.N., Bassolé I.H.N. and Dicko M.H. (2011). Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. *Biodegradation (Springer)*. 22:389–396.
- Diao M., Kone O.H., Ouedraogo N., Bayili R.G., Bassolé I.H.N., and Dicko M.H. (2011). Comparison of peroxidase activities from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* grown in Burkina Faso. *African Journal of Biochemistry Research* 5: 124-128.
- Diao M., Dabonne S., Imael H.N. Bassole, Lucien P. Kouame, Georges N'guessan Amani and Dicko M.H. (2011). Purification and characterisation of peroxydases from burkina radish (*raphanus sativus*). En correction à *Applied biochemistry and biotechnology*.
- Diao M, Ayekoué N.B., Dabonné S., Gnangui S., Bassolé I.H.N., Kouame L.P., Amani G.N. and Dicko M.H. (2011). Purification and characterization of sweet potato (*Ipomoea batatas*) peroxidases. Soumis pour publication.



# **ANNEXES: PUBLICATIONS**

## Article 1.

Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. *Biodegradation* (Springer). 22:389–396.

Mamounata Diao, Nafissetou Ouédraogo, Lamine S. Baba-Moussa, Paul W. Savadogo, Georges N Amani, Imaël HN Bassolé, Mamoudou H Dicko (2011)

# Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases

Mamounata Diao · Nafissétou Ouédraogo · Lamine Baba-Moussa · Paul W. Savadogo · Amani G. N'Guessan · Imael H. N. Bassolé · Mamoudou H. Dicko

Received: 18 May 2010 / Accepted: 18 August 2010 / Published online: 29 August 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** This study deals with the use of peroxidases (POXs) from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* to catalyze the degradation of free phenolic compounds as well as phenolic compounds contained in wastewater from leather industry. Secretory plant POXs were able to catalyze the oxidation of gallic acid, ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid, pyrogallol and 1,4-tyrosol prepared in ethanol 2% (v:v). Efficiency of peroxidase catalysis depends strongly on the chemical nature of phenolic substrates and on the botanical source of the enzymes. It appeared that POX from

*Raphanus sativus* had the highest efficiency. Results show that POXs can also remove phenolic compounds present in industrial wastewater such as leather industry. Removal of phenolic compounds in wastewater from leather industry by POX was significantly enhanced by polyethylene glycol.

**Keywords** Peroxidase · Leather · Wastewater · Biodepollution · Phenolic compound

---

M. Diao · N. Ouédraogo · I. H. N. Bassolé · M. H. Dicko (✉)  
Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bioinformatique (BAEBIB), UFR-SVT, Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 09 BP 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso  
e-mail: mdicko@univ-ouaga.bf

M. Diao  
e-mail: mamounadiao@yahoo.fr

N. Ouédraogo  
e-mail: nafisherif@yahoo.fr

I. H. N. Bassolé  
e-mail: ismael.bassole@univ-ouaga.bf

L. Baba-Moussa  
Laboratoire de Biologie et de Typage Moléculaire en Microbiologie, Département de Biochimie et Biologie Cellulaire, FAST, Université d'Abomey-Calavi, 05 BP 1604 Cotonou, Benin  
e-mail: laminesaid@yahoo.fr

P. W. Savadogo  
Institut de l'Environnement et la Recherche Agricole, CNRST, 04 BP 7192 Ouagadougou 04, Burkina Faso  
e-mail: Paul.savadogo@univ-ouaga.bf

A. G. N'Guessan  
UFR-Sciences et Technologies des Aliments, Université d'Abobo Adjamé, 02 BP 801 Abidjan, Ivory Coast  
e-mail: amanigeorges@yahoo.fr

## Abbreviations

PEG Polyethylene glycol  
POX Peroxidase

## Introduction

Phenolic compounds are one of the major classes of organic pollutants generated through various industrial processes, notably in leather industries (Nicell et al. 1993). Other sources of phenolic compounds are pesticides and phenol-containing products such as slimicides, disinfectants, antiseptics and medicinal preparations including mouthwash and sore throat lozenges (de Araujo et al. 2006). The exposure to phenols may result in liver damage and haemolytic anaemia. Respiratory uncoupling is thought to be the main mechanism for the toxic action of some phenols (Ren 2003).

In addition to the acute toxicity, some phenolic pollutants such as bisphenol A and alkylphenols display potential endocrine disrupting activities even at very low concentrations (Singleton and Khan 2003). Although the toxicity and environmental impacts of phenolic compounds are depending on the numbers, types and positions of substituted groups on the aromatic ring(s), some phenolic compounds could be toxic at high concentration to various organisms including humans (NTP 2010). Simple phenols such as pyrogallol is being shown to be toxic because of its mutagenicity (Takemura et al. 2010). Some substituted phenols, such as chlorophenols and alkylphenols, are also highly biorefractory, so that conventional biological processes cannot effectively remove these compounds (Karam and Nicell 1997). Polyphenolic derivatives such as condensed tannins may inhibit microorganisms and enzymes involved in the decomposition of organic pollutants (Scalbert 1991). As a result, the release of these compounds in rivers and sloughs without prior treatment may be responsible for the toxification of aquatic systems.

Conventional processes for removal of phenols from industrial wastewaters include extraction, adsorption on activated carbon, bacterial and chemical oxidation, electrochemical techniques, irradiation, etc. (Liu et al. 2002; Bratkovskaja et al. 2004;

Regalado et al. 2004). All of these methods suffer from serious shortcomings such as high costs, incompleteness of purification, formation of hazardous by-products, low efficiency and applicability to a limited concentration range. Nevertheless, these methods are not suitable for treating moderate to high concentrations of phenols (Liu et al. 2002; Regalado et al. 2004). Thus, the development of more effective treatment processes is necessary for the removal of these phenolic pollutants from industrial waste streams and the environment. It has been demonstrated that the oxidation of numerous aromatic compounds, such as phenols and aromatic amines, can be accomplished in an aqueous phase using a variety of enzymes including fungal laccases (Kim and Nicell 2006; Okazaki et al. 2002), tyrosinases (Yoshida et al. 2001), manganese POXs (Hirano et al. 2000), plant secretory POXs (Dec and Bollag 1994; Kobayashi et al. 1998; Caza et al. 1999; Ashraf and Husain 2010) and other enzymes (Sakurai et al. 2001). Among plant oxidases, plant secretory or extracellular POXs, often called class III POXs have been suggested some decades ago for biodepollution of wastewater containing aromatic compounds (Mayer and Harel 1979). Currently, horseradish peroxidase is the most studied enzyme for utilization in decontamination processes. The idea of using POXs for biodepollution is due to the fact they catalyze the polymerization and subsequent precipitation of aqueous phenolic compounds. During POX catalyses, phenols are converted into highly reactive radical species which polymerize by non-enzymatic processes (Hewson and Dunford 1976). The polymeric products are water-insoluble and can be easily removed by solid–liquid operations (Klibanov et al. 1980). The resulting supernatant is free of phenolic compounds, has low smell, less cloudy, and also less toxic. The chemical reactions involved in this catalytic process, the mechanisms of enzyme inactivation and the kinetics of these reactions are discussed elsewhere (Buchanan and Nicell, 1998). The advantage of using crude plant POX in remediation is also the relative cheapness of the crude enzymes and the process is environmental safe compared to other methods (Dec and Bollag 1994). However, to date, it has not been applied on an industrial waste containing phenolic compounds. Crude enzyme extract may be directly incubated with contaminated water instead of using pure enzyme preparation. The

purpose of this work is to assess on laboratory scale the potential use of crude POX extracts from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* in order to biodegrade wastewater from local leather industry.

## Materials and methods

### Chemicals and reagents

Guaiacol, pyrogallol, 1,4-tyrosol, 4-hydroxybenzoic acid, gallic acid, acetic acid and ferulic acid were purchased from Aldrich.  $\text{H}_2\text{O}_2$  was from Merck. Sodium acetate was purchased from Anachemia Rouses. Bovin serum albumin, catalase (EC 1.11.1.6, 12 400 units per mg protein), polyethylene glycol (average molecular mass of 3350 Da), Folin and Ciocalteu's phenol reagent were acquired from sigma Chemical Co. All other chemicals were of analytical grade.

### Wastewater

The wastewater used in these studies was obtained from a leather industry of TAN ALIZ society, in Ouagadougou, Burkina Faso. This stream was selected because it was the main source with the highest concentration of phenols in Ouagadougou (Burkina Faso).

### Plant materials

Enzymes were extracted from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor*. To minimize stress related differences in POX biosynthesis, all the plant species were grown in the same farm and in the same natural environment, in Ouagadougou (Burkina Faso), during the rainy-season 2007–2008.

### Peroxidase extraction and determination of enzyme activity

Enzyme extracts were prepared by mixing 250 mg of plant material with 1.2 ml of 50 mM Tris–HCl buffer pH 7.3 containing 0.5 M  $\text{CaCl}_2$  and 5 mM  $\beta$ -mercapto-ethanol, at 4°C for 1 h. After grounding, the homogenate was centrifuged (14000 $\times$ g, 4°C,

45 min) and the resulting supernatant was used as crude extract of POXs. Total protein was quantified by the linearized method of Bradford (Zor and Selinger 1996) using the ratio of  $A_{620}/A_{450}$  versus protein concentration. BSA was used as standard. POX activity was measured spectrophotometrically by monitoring the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dependent oxidation of guaiacol, at 25°C. The reaction mixture consisted of 10  $\mu\text{l}$  of 200-fold diluted crude enzyme extract, 20  $\mu\text{l}$  of 100 mM guaiacol, 10  $\mu\text{l}$  of 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 160  $\mu\text{l}$  of 50 mM sodium acetate pH 5.0. Control assays in which the enzyme extract or substrates were replaced by buffer were performed. The reaction was initiated by addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and monitored at 450 nm, over 30 min. One unit of POX activity (U) is defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu\text{mol}$  of guaiacol radical/min under the assay conditions.

### Batch treatment of aqueous phenol

Stock solutions (10 mM) of gallic acid, ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid, pyrogallol and 1,4-tyrosol in 2% ethanol/water (v/v) were prepared. These compounds were selected based on the fact that 4-hydroxybenzoic acid, tyrosol, ferulic acid and gallic acid are among the most important phenolic compounds found in most industrial wastewaters (Borja et al. 1995 Takemura et al. 2010).

Batch reactor for phenolic compound removal contained 0.9 ml of 10 mM stock solution of phenolic compound, 0.1 ml of plant enzymatic extract, 1 ml of 50 mM sodium acetate buffer pH 5 and 0.1 ml of 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The reaction was initiated by  $\text{H}_2\text{O}_2$  which was added in assay mixture. After incubation at 25°C aliquots of the reaction mixture were withdrawn at 5 min interval up to 30 min, and the enzymatic reaction was stopped by adding 0.05 ml of stock catalase solution (0.5 mg  $\text{ml}^{-1}$ ). Phenol residual concentration was measured with 5 min interval by the method of Folin and Ciocalteu's (Singleton et al. 1999).

### Batch treatment of wastewater from a leather industry

Wastewater samples were centrifuged at 3500 $\times$ g for 30 min to remove suspended materials. The supernatant was analyzed to determine initial concentration of phenolic compounds by the method of Folin and

Ciocalteu's (Singleton et al. 1999). The supernatant was then used to determine the degradation of wastewater phenolic compounds by plant POXs. Batch reactors contained 1 ml of supernatant, 100  $\mu$ l of 100 mM  $H_2O_2$ ; 1 ml of 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0 and 0–100  $\mu$ l enzymatic extract. The reaction mixture was stirred continuously during 3 h. Stock catalase solution ( $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) was added into centrifuge tubes for the purpose of stopping the reaction when required. Sample mixtures were centrifuged at  $3500 \times g$  for 30 min. The supernatant was analyzed for its absorbance to determine the concentration of residual phenolic compounds. Reaction controls were used for each incubation to confirm that phenolic compound removal was solely a consequence of POX activity. Control samples were treated concurrently with either in the presence or not of hydrogen peroxide. The effect of polyethylene glycol on the catalytic activity of POX was investigated by adding 100  $\mu$ l of 100 mM polyethylene glycol in the reaction mixture.

#### Statistical analysis

All spectrophotometric assays were monitored with a MRX 96-well microplate reader on-line interfaced to a computer (Hewlett Packard). Kinetic data were determined in the linear phase of reaction traces using MRX revelation software version 1CXD-4239 (Dyner Technologies, Inc, USA). The reactions were monitored over 10 min. The initial slopes of the reaction traces caused by enzyme activities were corrected with the slopes of the blanks. All experiments were carried out in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) and Student *t*-test ( $P = 0.05$ , considered as significant) were used to determine statistically significant differences between degradation assays.

## Results and discussion

### Degradation of pure phenolic substrates

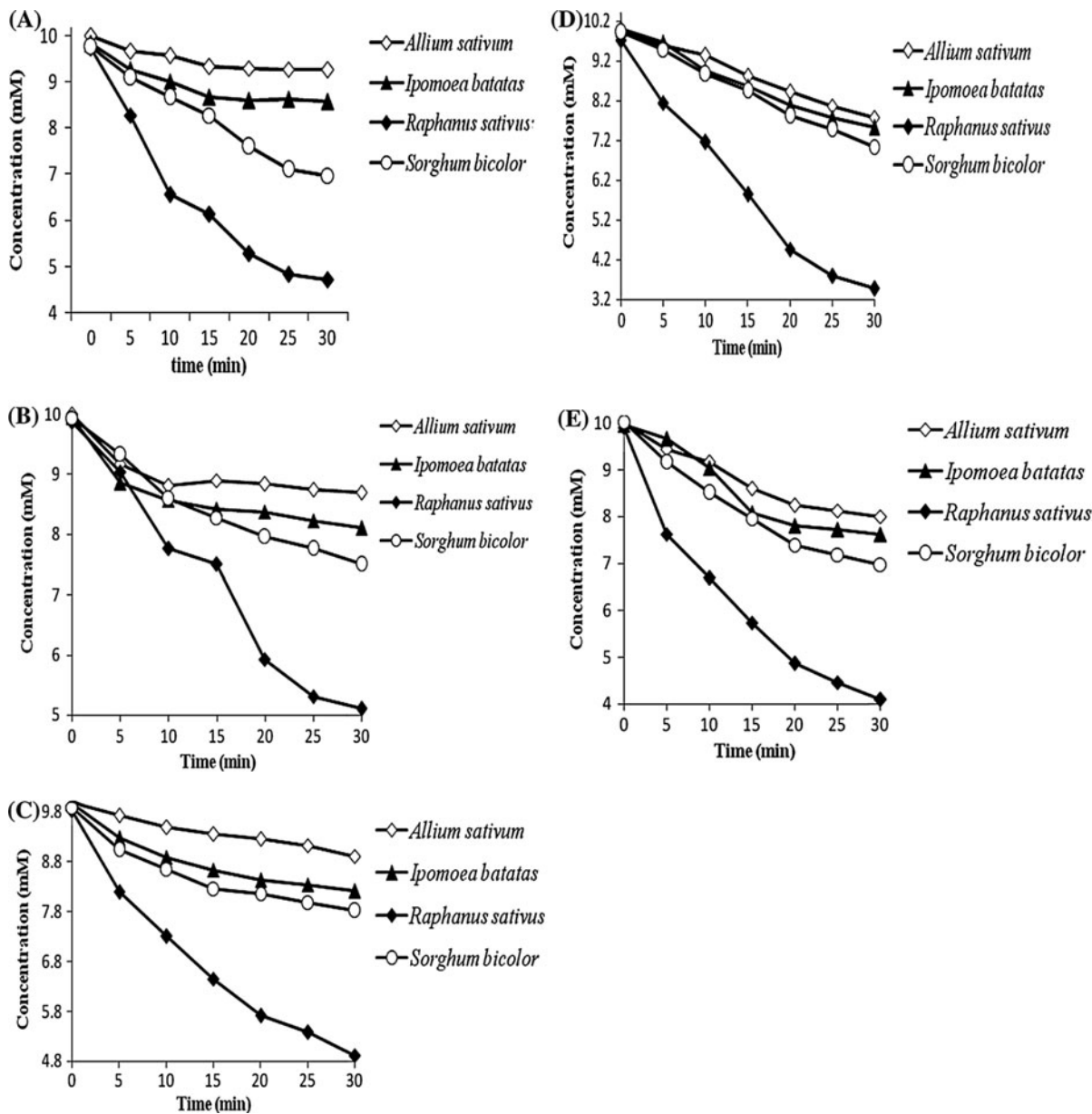
In order to harmonize the used method to quantify levels of phenolic compounds both with pure phenolic compounds and phenolic compounds contained in waste water, the Folin Ciocalteu method has been preferred to other spectrophotometric methods. For

comparison of the phenol removal efficiencies by peroxidases evaluated in this study, five aqueous phenols were treated with the crude extract from *Allium sativum* bulb, *Ipomoea batatas* tuber, *Raphanus sativus* roots and germinated grain of *Sorghum bicolor*. These four plants display different levels of POX activities. POX specific activities among these plants ranged from 22.1 to 294.6 U/mg. The highest specific activity was found in the bulbs of *Raphanus sativus*, followed by *Sorghum bicolor* and *Ipomoea batatas*. *Allium sativum* showed significantly lower activity than the other three species.

The time course of gallic acid, ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid, pyrogallol and 1,4-tyrosol removal by peroxidase-catalyzed polymerization is shown in Fig. 1. The phenomenon of oxidative coupling of phenols by enzymes was well recognized in the early 1960s (Brown 1967), but its application to wastewater treatment occurred about 15 years later (Klibanov and Morris 1981). Removal experiments were performed both with pure phenolic compounds as well as wastewater containing phenolic compounds.

The incubation of plant extracts with phenolic compounds without  $H_2O_2$  (control sample) did not result in a significant change of the concentration of the initial phenolic compounds. However in the presence of  $H_2O_2$  the concentration of phenolic compounds rapidly decreased (Fig. 1). This suggests that the oxidation of phenolic compounds used in the present study is mainly governed by the activity of POX rather than other endogenous oxidative enzymes such as polyphenol oxidases and laccases. Previous works have also shown that POXs are the major oxidative enzymes in sorghum varieties (Dicko et al. 2002, 2006). Five phenolic compounds were incubated with POX extracts and the reaction processes were monitored over a time (Fig. 1). For all the five standard phenolic compounds used as models of aqueous phenol, POXs extract have shown their efficiency to their degradation (Fig. 1).

However, degradation rates were different both between phenolic compounds and the botanical source of POX extracts (Fig. 1). This confirms that the efficiency of POXs on the catalysis is strongly dependant on the chemical nature of substrates (substrate specificity) and on the botanical source of POXs. Sakurai et al. (2001) have found a difference for the degradation of phenol and bisphenol A. The



**Fig. 1** Degradation of five phenolic compounds as a function of time by plant POXs. Reactions were carried out at pH 5, at 25°C and the reaction mixtures initially contained 10 mM phenolic compound, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 10 μl of enzymatic

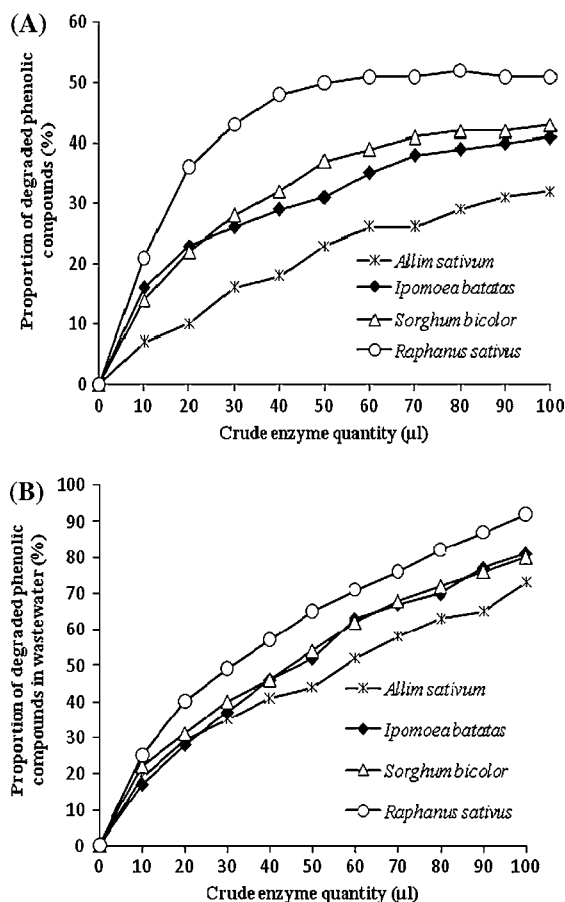
extract. Enzyme extracts were from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus*, or *Sorghum bicolor*. Phenolic compounds were **a** gallic acid, **b** ferulic acid, **c** 4-hydroxybenzoic acid, **d** 1,4-tyrosol, and **e** pyrogallol

most efficient POX extract for the degradation of the five phenolic compounds was the POX from *Raphanus sativus*. Nevertheless, behind *Raphanus sativus*, the extracts of *Ipomoea batatas* and *Sorghum bicolor* also have a significant level of degradation. Several works have demonstrated the ability of POXs to

degrade recalcitrant organic compounds like phenols and substituted phenols (Klibanov et al. 1980; Wu et al. 1997; Wright and Nicell 1999; Dalal and Gupta 2006). Some POXs convert virtually all aromatic compounds (phenols and amines) and even some non-aromatic compounds (Dunford 1999).

## Degradation of phenolic compounds in wastewater

In order to compare the efficiencies of POXs to degrade phenolic compounds contained in wastewater, the wastewater was incubated with various amounts of the crude POXS from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor*. As found with pure phenolic compounds (Fig. 1), no significant changes in the phenol concentrations were observed in control wastewater samples without the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and POX. Thus, the degradation of wastewater phenolic compounds was essentially due to POXs. In the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the reaction



**Fig. 2** Degradation of phenolic compounds in wastewater as a function of the amount of enzyme. Enzyme extracts were from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus*, or *Sorghum bicolor*. Wastewaters were either incubated with enzyme extracts in the absence of polyethylene glycol (a) or in the presence of polyethylene glycol (b)

mixtures tend to be uncolored, with the appearance of precipitates, indicating that the degradation of phenolic compounds was effectively caused by POX activities.

Residual quantities of phenolic compounds were measured following treatment with enzymatic extract and after centrifugation, as a function of enzyme quantities (Fig. 2a). Since polyethylene glycol (PEG) may enhance the action of enzymes in the presence of polymeric compounds (Dalal and Gupta 2006), its effect was also tested in the present study (Fig. 2b).

It clearly appeared that the addition of PEG in the reaction medium considerably enhanced the degradation of phenolic compounds (Fig. 2a and b). Without PEG, the maximal transformation of phenol by the POXs of the four plants ranged from 32 to 55%. The other advantage of using PEG is that, it is relatively a nontoxic organic compound (Kinsley and Nicell, 2000; Cheng et al. 2006; Gonzalez et al. 2008). In addition, it is a biodegradable compound and has a little impact on environment.

The best degradation was obtained with the extract from *Raphanus sativus* and the lowest, with the extract from *Allium sativum*. With the addition of PEG in the reaction medium, the yield of degradation increased rapidly as function of the amount of enzyme (Fig. 2b). The highest degradation yield was obtained with POXs from *Raphanus sativus* and the lowest with POXs from *Allium sativum*. The maxima yields of degradation obtained in the experimental conditions were 93, 76, 77, and 72% for POXs from *Raphanus sativus*, *Sorghum bicolor*, *Ipomoea batatas*, and *Allium sativum*, respectively. The comparison between the phenol degradation by POX without and with PEG showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the two methods. With PEG, the quantity of POX from *Raphanus sativus* necessary for degradation of phenolic compounds was lower than the amount necessary for the same level of degradation in the absence of PEG (Fig. 2a and b). Furthermore, the degradation was more efficient in the presence of PEG. The comparison of the profiles of the degradation kinetics (Fig. 2a and b) indicated that POX may be fully inactivated before a complete degradation of all phenolic compounds. Apparent inactivation of peroxidase during phenol polymerizing reaction was found to be mainly caused by



adsorption of peroxidase by reaction products. Nevertheless, PEG enhanced the yield of degradation probably by minimizing the interaction between free POX molecules and degradation products during the catalysis. Indeed, monitoring the degradation of pentachlorophenol by POX from *Cochlearia armoracia*, Zhang and Nicell (2000) also found similar results. Other studies on phenol removal by horse radish peroxidase have shown that PEG improved the phenol removal efficiency by forming a protective layer around the active centre of enzyme which prevents the attack of free phenoxy radicals formed in the catalytic cycle (Cheng et al. 2006). Most of the phenoxy radicals interact with PEG due to their greater affinity with PEG than the enzyme, thus preventing the adsorption of the reaction product on the active sites of enzyme molecules (Tonegawa et al. 2003; Gonzalez et al. 2008). Thus as previously found (Ikehata et al. 2003, 2005), the addition of PEG in the reaction mixture increased both the rate and the yield of degradation. The enzyme reaction in this method can be considered as a modified type of ping-pong kinetics, referred as peroxidase ping-pong by Dunford (1991).

## Conclusion

Crude plant extracts containing peroxidase activities can be used for biodepollution of wastewater containing phenolic compounds. Peroxidases from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* are able to catalyze the degradation of phenolic compounds such as gallic acid, ferulic acid, 1,4-tyrosol, pyrogallol, 4-hydroxybenzoic acid from wastewater. Among these plants *Raphanus sativus* is the most interesting source of POX for the biodepollution of phenolic compounds. This first study on a pilot assay on the elimination of phenolic compounds by peroxidases may serve as a basis for an experimental application in industrial effluents.

**Acknowledgments** This research project was supported through financial assistance from the Fondazione Lelio and Lisli Basso-Issoco, Italy, and Agence Universitaire de la Francophonie (AUF-GP3A), France.

## References

- Ashraf H, Husain Q (2010) Use of DEAE cellulose adsorbed and crosslinked white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase for the removal of alpha-naphthol in batch and continuous process. *Int Biodeter Biodegr* 64:27–31
- Borja R, Banks CJ, Alba J (1995) A simplified method for determination of kinetic parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic constituents of olive mill wastewater treatment by a heterogeneous microbial culture. *J Environ Sci Health A* 30:607–626
- Bratkovskaja I, Vidziunaite R, Kulys J (2004) Oxidation of phenolic compounds by peroxidase in the presence of soluble polymers. *Biochemistry (Moscow)* 69:985–992
- Brown BR (1967) Biochemical aspects of oxidative coupling of phenols. In: Taylor WI, Battersby AR (eds) *Oxidative coupling of phenols*. Marcel Dekker, New York, pp 177–197
- Buchanan ID, Nicell JA (1998) Kinetics of peroxidase interactions in the presence of a protective additive. *J Chem Tech Biotech* 72:23–32
- Caza N, Bewtra JK, Biswas N, Taylor KE (1999) Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Res* 33:3012–3018
- Cheng J, Yu SM, Zuo P (2006) Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared inter-layered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Res* 40:283–290
- Dalal S, Gupta MN (2006) Treatment of phenol wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering. *Chemosphere* 67:741–747
- de Araujo BS, Dec J, Bollag JM, Pletsch M (2006) Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere* 63:642–651
- Dec J, Bollag JM (1994) Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnol Bioeng* 44:1132–1139
- Dicko MH, Hilhorst R, Gruppen H, Traoré AS, Laane C, van Berkel WJH, Voragen AGJ (2002) Comparison of content in Phenolic compounds, polyphenol oxidases and peroxidases in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. *J Agric Food Chem* 50:3780–3788
- Dicko MH, Gruppen H, Hilhorst Riet, Voragen AGJ, van Berkel WJH (2006) Biochemical characterization of the major cationic sorghum peroxidase. *FEBS J* 273:2293–2307
- Dunford HB (1991) Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. In: Everse J, Everse KE, Grisham MB (eds) *Peroxidases in chemistry and biology*, vol II. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1–25, 225–227
- Dunford HB (1999) *Heme peroxidases*. Wiley-VCH, New York
- Gonzalez PS, Agostini G, Milrad SR (2008) Comparison of the removal of 2,4 dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. *Chemosphere* 70:982–989
- Hewson WD, Dunford HB (1976) Stoichiometry of the reaction between horseradish peroxidase and *p*-cresol. *J Biol Chem* 251:6043–6052
- Hirano T, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M (2000) Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme,

- manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:1958–1962
- Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW (2003) Treatment of oil refinery wastewater using crude *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide. *J Environ Eng Sci* 2:463–472
- Ikehata K, Buchanan ID, Pickard MA, Smith DW (2005) Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenol treatment. *Biores Technol* 96:1758–1770
- Karam J, Nicell JA (1997) Potential applications of enzymes in wastewater treatment. *J Chem Technol Biotechnol* 69:141–153
- Kim YJ, Nicell JA (2006) Impact of reaction conditions on laccase catalyzed oxidation of bisphenol A. *Biores Technol* 97:1431–1442
- Kinsley C, Nicell JA (2000) Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Biores Technol* 73:139–146
- Klibanov AM, Morris ED (1981) Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. *Enzyme Microb Technol* 3:119–122
- Klibanov AM, Alberti BN, Morris ED, Felshin LM (1980) Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters. *J Appl Biochem* 2:414–421
- Kobayashi S, Uyama H, Ushiwata T, Uchiyama T, Sugihara J, Kurioka H (1998) Enzymatic oxidative polymerization of bisphenol-A to a new class of soluble polyphenol. *Macromol Chem Phys* 199:777–782
- Liu JZ, Song HY, Weng LP, Ji LN (2002) Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase. *J Mol Catal B-Enzym* 18:225–232
- Mayer AM, Harel E (1979) Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18:193–215
- Nicell JA, Bewtra JK, Biswas N, Taylor E (1993) Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. *Water Res* 27:1629–1639
- NTP National Toxicology Program (2010) Chemical health and safety information. National Institute of Environmental Health Sciences, National Institute of Health, USA. <http://ntp-server.niehs.nih.gov>. Accessed Jul 2010
- Okazaki S, Michizoe J, Goto M, Furusaki S, Wariishi H, Tanaka H (2002) Oxidation of bisphenol A catalyzed laccase hosted in reverse micelles in organic media. *Enzyme Microb Technol* 31:227–232
- Regalado C, Garcia-Almendárez BE, Duarte-Vázquez MA (2004) Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem Rev* 3:243–256
- Ren S (2003) Phenol mechanism of toxic action classification and prediction: a decision tree approach. *Toxicol Lett* 144:313–323
- Sakurai A, Toyoda S, Sakakibara M (2001) Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Biotechnol Lett* 23:995–998
- Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30:3875–3883
- Singleton DW, Khan SA (2003) Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. *Front Biosci* 8:110–118
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152–179
- Takemura Y, Wang DH, Sauriasari R, Horita M, Tsutsui K, Sano K, Masuoka N, Takigawa T, Takaki J, Ogino K (2010) Evaluation of pyrogallol-induced cytotoxicity in catalase-mutant *Escherichia coli* and mutagenicity in *Salmonella typhimurium*. *Bull Environ Contam Tox* 84:347–350
- Tonegawa M, Dec J, Bollag JM (2003) Use of additives to enhance the removal of phenols from water treated with horseradish and hydrogen peroxide. *J Environ Qual* 32:1222–1227
- Wright H, Nicell JA (1999) Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Biores Technol* 70:69–79
- Wu Y, Taylor KE, Biswas N, Bewtra JK (1997) Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. *Water Res* 31:2699–2704
- Yoshida M, Ono H, Mori Y, Chuda Y, Onishi K (2001) Oxidation of bisphenol A and related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:1444–1446
- Zhang G, Nicell JA (2000) Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res* 34:1629–1637
- Zor T, Selinger Z (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* 236:302–308

## Article 2.

Comparison of peroxidase activities from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* grown in Burkina Faso. African Journal of Biochemistry Research Vol. 5(4), pp. 124-128.

Mamounata Diao, Oumou H. Kone, Nafissétou Ouédraogo, Romaric G. Bayili, Imael H. N. Bassolé, and Mamoudou H. Dicko (2011)

Full Length Research Paper

# Comparison of peroxidase activities from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* grown in Burkina Faso

Mamounata Diao, Oumou H. Kone, Nafissétou Ouedraogo, Romaric G. Bayili, Imael H. N. Bassole, and Mamoudou H. Dicko\*

Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bioinformatique (BAEBIB),  
Département de Biochimie et Microbiologie, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.

Accepted 15 February, 2011

Current applications of peroxidase in various areas of biotechnology and clinical biochemistry show the interest for further screening for peroxidase. Thus, peroxidase activities were screened in higher plants such as *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* grown in a tropical environment. The enzymes were investigated for their specific activities and best physico-chemical conditions for activity and stabilities. Optima conditions with respect to pH, temperature and their heat inactivation were determined by monitoring the hydrogen peroxide-dependant oxidation of guaiacol. Results revealed that peroxidase specific activities in *R. sativus* were higher than the other three plant species. Optimum pHs of all screened peroxidase activities were in the acidic range (pH 4.5 to 6.5). Optimum temperatures were ranging from 30 to 40°C. Peroxidase from *R. sativus* was the most thermostable enzyme among the four plants. This suggests that *R. sativus* is a good source of plant peroxidase, which could be used for various applications.

**Key words:** *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus*, *Sorghum bicolor*, peroxidase.

## INTRODUCTION

Peroxidases (POXs) (E.C.1.11.1.7) are among the most ubiquitous enzymes in plant species. POXs are also found in some animal tissues and microorganisms where they are assigned to play a role of protection against toxic peroxides (Welinder, 1992). In plants they participate in the lignification process (Wakamatsu and Takahama, 1993) and in the mechanism of defense in physically damaged or infected tissues (Biles and Martin, 1993).

POXs are heme-containing enzymes that use H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to oxidize a large diversity of hydrogen donors such as phenolic compounds, aromatic amines, ascorbic acid, auxin and certain inorganic ions (Vernwal et al., 2006). The family of plant POXs comprises yeast cytochrome c POXs,

plant ascorbate POXs, fungal POXs and classical plant secretory POXs. The group of mammalian POXs includes myeloPOX, lactoperoxidase, thyroid POX and prostaglandin H synthetase (Welinder, 1992). Reduction of hydrogen peroxides at the expense of electron donating substrates makes POXs useful in a number of biotechnological applications (Regalado et al., 2004).

In the food industry for example, POXs have been widely used as an indicator of vegetables bleaching, due to their high thermal stability and wide distribution (Rodrigo et al., 1997). Plant POXs are used to produce dyes from natural phenolic compounds (Egorov, 1995). In analytical biochemistry, POXs are used as reagents in clinical diagnosis and in enzyme immunoassays (Agostini et al., 2002).

They can also be used for the treatment of containing phenols and aromatic amine (Kinsley and Nicell, 2000; Klibanov et al., 1980; Nakamoto and Machida, 1992; Diao et al., 2010). They found several applications in bio-bleaching processes, lignin degradation, fuel and chemical production from wood pulp, production of dimeric

\*Corresponding author. E-mail: [mdicko@univ-ouaga.bf](mailto:mdicko@univ-ouaga.bf). Tel: (226) 50307064 /70272643. Fax: (226) 50307242.

**Abbreviations:** BSA, Bovine serum albumin; HRP, horseradish peroxidase; POX, peroxidase.

alkaloids, biotransformation of organic compounds, etc. (Ryan et al., 1994). Although POXs are ubiquitous in the plant kingdom, until now the major source of commercially available POXs is from horseradish (*Armoracia rusticana*) and soybean (*Glycine max*). However, plants of other species may provide POXs whose characteristics are comparable or higher than those of horseradish (Dicko et al., 2006a, b).

The overall objective of this study is to find novel sources of plant POXs for biotechnological applications. Specifically, POXs from plants such as *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus*, and *Sorghum bicolor*, grown in tropical climate may be predicted to display high thermostabilities and interesting catalytic properties.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and reagents

Guaiacol was purchased from Aldrich; bovine serum albumin was obtained from Sigma chemicals CO; hydrogen peroxide was purchased from Merck. Other chemicals and reagents employed were of analytical grade.

### Plant materials

Enzymes were extracted from *A. sativum* bulbs, *I. batatas* tubers, *R. sativus* roots and *S. bicolor* germinated grains. To minimize stress related differences in POX biosynthesis, all the plant species were grown in the same farm and in the same natural environment in Ouagadougou (Burkina Faso), during the rainy-season 2007 to 2008.

### Preparation of POX extracts

Enzyme extracts were prepared by mixing 250 mg of plant ground material with 1.2 mL of 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.3 containing 0.5 M CaCl<sub>2</sub> and 5 mM β-mercapto-ethanol, at 4°C for 1 h. The homogenate was centrifuged (14000 g, 4°C, 45 min) and the resulting supernatant was used as crude extract of POX. Protein assay was performed by the linearized method of Bradford (Zor and Selinger, 1996) using the ratio of A<sub>620</sub>/A<sub>450</sub> versus protein concentration. Bovine serum albumin was used as standard protein.

### POX assay

POX activity was measured with a spectrophotometric assay by monitoring the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidation of guaiacol, at 25°C. The reaction mixture consisted of 10 μL of 200-fold diluted crude enzyme extract, 20 μL of 100 mM guaiacol, 10 μL of 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 160 μL of 50 mM sodium acetate pH 5.0. Control assays in which the enzyme extracts or substrates were replaced by buffer were performed. The reaction was monitored at 450 nm. One unit of POX activity (U) is defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of guaiacol radical/min under the assay conditions.

### Determination the effect of pH on enzyme activities

The optimum pH was determined at 25°C by measuring the activity

of the enzyme in buffers of pH ranging from 3 to 8. The POXs activity was measured by performing the routine assay by changing the buffers at various pH values. The used buffers were those of McIlvaine, 50 mM citrate-phosphate.

### Determination the effect of temperature on enzyme activities

The optimum temperature was determined at the optimum pH of each enzyme by measuring the activity of the enzyme in temperatures ranging from 30 to 90°C. Thermal stability was studied by preincubating enzyme extracts at temperatures ranging from 30 to 90°C for 10 min. After heating, samples were immediately cooled on ice during 10 min and the residual enzyme activity was then determined with the routine assay.

### Statistical analysis

All spectrophotometric analyses were monitored with a MRX 96-well microplate reader on-line interfaced to a computer (Hewlett Packard). Kinetic data were determined in the linear phase of reaction traces using MRX revelation software version 1CXD-4239 (Dynex Technologies, Inc, USA). The reactions were monitored over 10 min. The initial slopes of the reaction traces caused by enzyme activities were corrected with the slopes of the blanks. All experiments were carried out in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) and Student t-test (P= 0.05, considered as signification) were used to determine statistically significant differences between enzyme assays.

## RESULTS

### Comparison of POX specific activities

The results of POX specific activities from *A. sativum* bulb, *I. batatas* tuber, *R. sativus* roots and grain of *S. bicolor* are summarized in Table 1. These four plants display different levels of POX activities using guaiacol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrates. POX specific activities among these plants ranged from 22.1 to 294.6 U/mg. The highest specific activity was found in plant tissues from *R. sativus*, followed by *S. bicolor* and *I. batatas*. *A. sativum* showed significantly lower activity than the other three species. POX specific activity in *R. sativus* was 13 fold higher than that of *A. sativum* and 9 and 4 fold higher than those of *I. batatas* and *S. bicolor*, respectively.

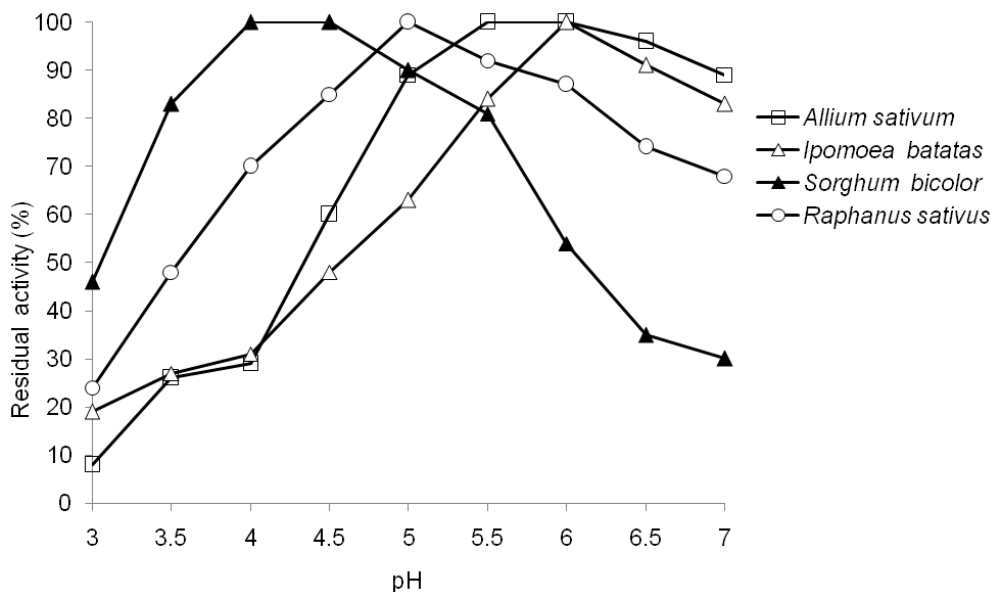
### Comparison of optimum pHs

The effect of pH on the activities of POXs from the four POX are shown in Figure 1. All POXs of these plants have their optima pH for activity in acidic buffers (pH < 6). POXs from *S. bicolor* were most active at pH 3.5 to 4 but POXs from *I. batatas* were strongly inactivated at this pH. However, *I. batatas* POXs were most active at pH 6.0. The optimum pH of activity for POXs from *A. sativum* bulbs was around pH 5.5 to 6.5 and POXs from *R. sativus* tubers presented an optimum activity at pH 5.

**Table 1.** Comparison of peroxidase activities\* among four plants.

Plant	Organs	Total protein (mg)	Total POX activity (U)	POX specific activity (U/mg)
<i>A. sativum</i>	Bulbs	24.3 ± 7	537.03 ± 14	22.1 ± 2
<i>I. batatas</i>	Tubers	36.9 ± 3	1154.97 ± 6	31.3 ± 2
<i>R. sativus</i>	Roots	14.7 ± 4	4348.3 ± 52	294.6 ± 13
<i>S. bicolor</i>	Grains (germinated)	28.4 ± 9	1948.24 ± 54	68.6 ± 6

\*Enzymes were extracted with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.3; containing 0.5 M CaCl<sub>2</sub> and 5 mM β-mercapto-ethanol. Enzyme activities were determined by monitoring the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependant oxidation of guaiacol.



**Figure 1.** Comparison of the effect of pH on POX activities. Enzyme activities were determined by monitoring the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependant oxidation of guaiacol in citrate-phosphate buffers (pH 3 to 7).

### Comparison of temperature effect

The effect of temperature on the activities and stabilities of POXs from the four plant species was examined (Figures 2 and 3). POXs from sorghum were most active at 40°C, but they were completely inactive at 80°C. However, at this temperature, POXs of *I. batatas* and *R. sativus* conserved more than 30% of their activities and were then later completely inactivated at 100°C. These POXs also retained above half of their activities after 10 min of incubation at 70°C. POXs from *I. batatas* and *R. sativus* were most active at 30°C. However, POXs from *A. sativum* are most active at 40°C and were completely inactivated at 90°C.

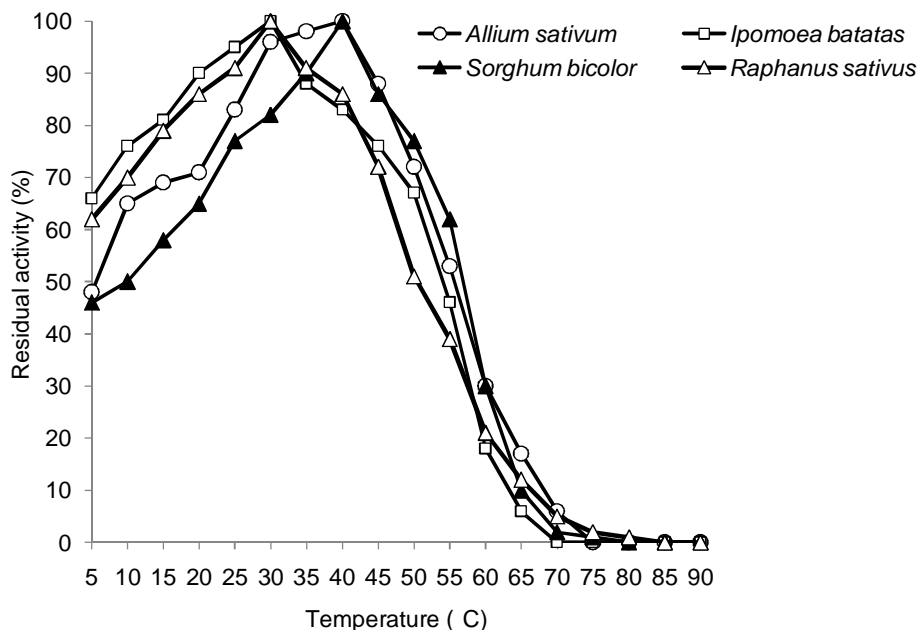
### DISCUSSION

In this contribution, POXs from four plants were compared for their specific activities, and catalytic properties. Based on their hydrogen peroxide-dependent oxidation of guaiacol, all the four plants had significant

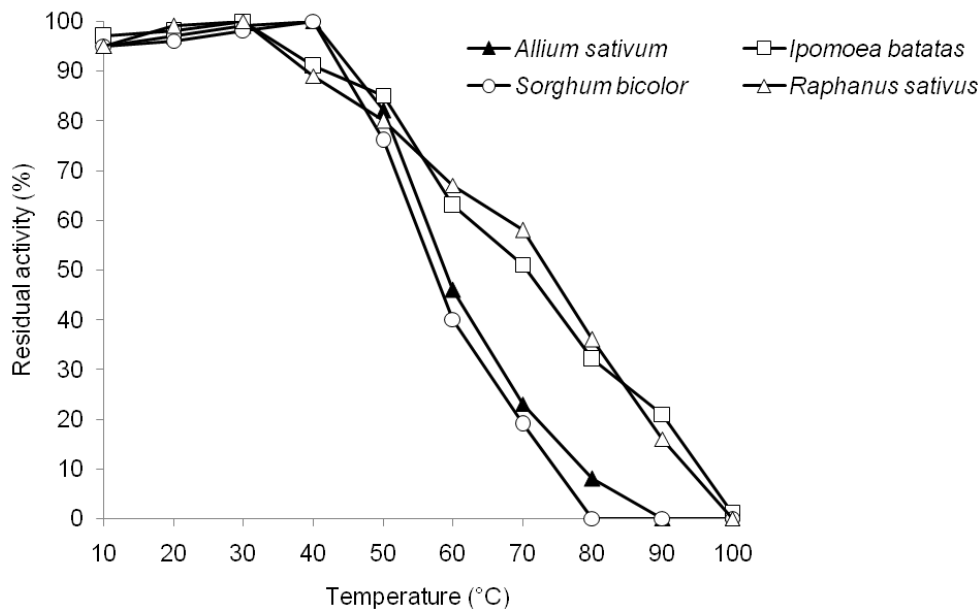
differences ( $P < 0.05$ ) in their content in POX activities. Among the four plant species, the highest POX activities were detected in *R. sativus*. However, these activities ( $294.6 \pm 13$  U/mg) were lower than those (413.5 U/mg) reported by Wang et al. (2004) on the black varieties of the same plant. POXs from *A. sativum* showed significantly lower activities than the other three species. POX specific activities in *I. batatas* (31 U/mg) are higher than data (15 U/mg) from the same plant reported by Santos et al. (2004). The environment may play a significant impact in these differences. POXs from these four plants had optimum pHs ranging from 4.0 to 6.5 with guaiacol as substrate.

Indeed using guaiacol as hydrogen donor, acidic optimum pHs have been reported for many plant POXs (Agostini et al., 1999; Mika and Lüthje, 2003). POXs from *A. sativum* and *S. bicolor* had a great range of pH activities. Other authors (Bhunja et al., 2002; Dicko et al., 2006a) showed that POX activities usually increased with decreasing pH.

Sakharov et al. (2003), using anionic POXs purified from African oil palm tree as biocatalysts, showed that



**Figure 2.** Comparison of the effect of temperature on POX activities. Reactions were performed in 50 mM sodium acetate buffer pH 5, with incubation temperatures ranging from 5 to 90°C. Enzyme activities were determined by monitoring the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependant oxidation of guaiacol.



**Figure 3.** Comparison of thermal stability of POXs. Enzyme activities were determined by monitoring the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependant oxidation of guaiacol.

polymerization of aniline was optimum at pH 3.5. Polyaniline is one of the most extensively investigated conducting polymers because of its high environmental stability and promising electronic properties. POX from *S. bicolor* displaying similar activities at the same range of

pH may be efficient for the same applications. Optima temperatures of activities were at 30°C for POXs from *I. batatas*, *R. sativus* and 40°C for POX from *A. sativum* and *S. bicolor*. El Ichi et al. (2008) reported an optimum temperature of 30°C for POX from *A. sativum* bulbs

cultivated in Tunisia similar to those of *I. batatas*, and *R. sativus*. Among the four plants, POXs from *R. sativus* are the most heat stable followed by POXs from *I. batatas*, *A. sativum* and *S. bicolor*.

## Conclusion

It appeared that *A. sativum* bulbs, *I. batatas* tubers, *R. sativus* roots and *S. bicolor* grains have different level of peroxidase activities. Peroxidases from *R. sativus* exhibited the highest specific activities. The present contribution shows that *R. sativus* cultivated in tropical climate such as Burkina Faso may be an alternative source to horseradish for peroxidases. It may also display interesting catalytic properties as well as thermal resistance.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research project was supported through financial assistance from the Fondazione Lelio and Lisli Basso-Issoco, Italy, and Agence Universitaire de la Francophonie (AUF-GP3A), France.

## REFERENCES

- Agostini E, Millard De Forchetti SR, Tigier HA (1999). Characterization and application of an anionic peroxidase from *Brassica napus* roots. *Plant. Perox. Newslett.*, 13: 153-159.
- Agostini E, Hernández-Ruiz J, Arnao MB, Milrad SR, Tigier HA, Acosta M (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35: 1-7.
- Bhunia A, Durani S, Wangikar P (2002). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnol. Bioeng.*, 72: 562-567.
- Biles CL, Martin RD (1993). Peroxidase, polyphenoloxidase, and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, 31: 499-506.
- Diao M, Ouédraogo N, Baba-Moussa L, Sawadogo PW, Amani GN, Bassole IHN, Dicko MH (2010). Biodegradation of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidase. *Biodegradation*. DOI 10.1007/s10532-010-9410-8, in press.
- Dicko MH, Gruppen H, Hilhorst R, Voragen, AGJ, van Berkel WJH (2006a). Biochemical characterization of the major cationic sorghum peroxidase. *FEBS J.*, 273: 2293-2307.
- Dicko MH, Gruppen H, Zouzouho OC, Traore AS, van Berkel WJH, Voragen AGJ (2006b). Effects of germination on amylases and phenolics related enzymes in fifty sorghum varieties grouped according to food-end use properties. *J. Sci. Food Agric.*, 86: 953-963.
- Egorov AM (1995). Peroxidase biotechnology and application. International Workshop peroxidase Biotechnology and Application. Oral abstracts: part I. Moscow, Russia.
- El Ichi S, Abdelghani A, Hadji I, Helali S, Limam F, Marzouki MN (2008). A new thermostable peroxidase from garlic (*Allium sativum*) bulb: its use in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensing. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 51: 33-41.
- Mika A, Lüthje S (2003). Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol.*, 132: 1489-1498.
- Kinsley C, Nicell JA (2000). Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Biores. Technol.*, 73: 139-146.
- Klibanov AM, Alberti BN, Morris ED, Felshin LM (1980). Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters. *J. Appl. Biochem.*, 2: 414-421.
- Nakamoto S, Machida N (1992). Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reactions using additives. *Water Res.*, 26: 49-54.
- Regalado C, Garcia-Almendárez BE, Duarte-Vázquez MA (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.*, 3: 243-256.
- Rodrigo C, Rodrigo M, Alvarruiz A, Frigola A (1997). Inactivation and regeneration kinetics of horseradish peroxidase heated at high temperatures. *J. Food Protect.*, 60: 961-966.
- Ryan O, Smyth MR, Fágáin CO (1994). Horseradish peroxidase: the analyst's friend. *Essays Biochem.*, 28: 129-146.
- Sakharov IY, Vorobiev AC, Castillo LJJ (2003). Synthesis of polyelectrolyte complexes of polyaniline and sulfonated polystyrene by palm tree peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.*, 33: 661-667.
- Santos de Araujo B, Santos de Oliveira JO, Machado SS, Pletsch M (2004). Comparative studies of the peroxidases from hairy roots of *Daucus carota*, *I. batatas*, and *Solanum aviculare*. *Plant Sci.*, 167: 1151-1157.
- Vernwal SK, Yadav RSS, Yadav KDS (2006). Purification of a peroxidase from *Solanum melongena* fruit juice. *Indian J. Biochem. Biol.*, 43: 239-243.
- Wang L, Kristensen BK, Burhenne K, Rasmussen SK, Chang G (2004). Purification and cloning of a Chinese red radish peroxidase that metabolises pelargonidin and forms a gene family in Brassicaceae. *Genetic*, 343: 323-335.
- Wakamatsu K, Takahama U (1993). Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiol. Plant.*, 88: 167-171.
- Welinder KG (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidase. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2: 388-393.
- Zor T, Selinger Z (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.*, 236: 302-308.



## **Article 3.**

Purification and characterisation of peroxidases from burkina radish (*Raphanus sativus*).

Mamounata Diao, Soumaila Daboné, Imael H. N. Bassole, Lucien P. Kouame, Georges N'guessan Amani and Mamoudou H. Dicko (2012).

Submitted: Applied Biochemistry and Biotechnology.

# Applied Biochemistry and Biotechnology

## Purification of Burkina radish peroxidase isoenzymes

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	ABAB-3975R1
<b>Full Title:</b>	Purification of Burkina radish peroxidase isoenzymes
<b>Article Type:</b>	Original Research
<b>Keywords:</b>	Peroxidase, isoenzyme, purification, Raphanus sativus, radish, phenolic compound.
<b>Corresponding Author:</b>	Mamoudou H. Dicko, PhD Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bioinformatique (BAEBIB), UFR-SVT, Université de Ouagadougou 09, BP : 948 Ouagadougou 03. Burkina Faso Ouaga, BURKINA FASO
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bioinformatique (BAEBIB), UFR-SVT, Université de Ouagadougou 09, BP : 948 Ouagadougou 03. Burkina Faso
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Mamounata DIAO, Msc
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Mamounata DIAO, Msc
	Soumaila DABONNE, PhD
	Lucien Patrice KOUAME, PhD
	Imael Henry Nestor BASSOLE, PhD
	Georges N. AMANI, PhD
	Mamoudou H. Dicko, PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	

## Purification of Burkina radish peroxidase isoenzymes

Mamounata DIAO<sup>(1)</sup>, Soumaila DABONNE<sup>(2)</sup>, Lucien Patrice KOUAME<sup>(2)</sup>, Imael Henry  
Nestor BASSOLE<sup>(1)</sup>, Georges N'Guessan AMANI<sup>(3)</sup> and Mamoudou H. DICKO<sup>(1)</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bioinformatique (BAEBIB), UFR-SVT, Université de Ouagadougou, Burkina Faso. 09 BP 848 Ouagadougou 09 (Burkina Faso).

<sup>2</sup>Laboratoire de biocatalyse et de bioprocédés. Université d'Abobo Adjamé 02 BP 801 Abidjan 02 Côte d'Ivoire.

<sup>3</sup>UFR-Sciences et Technologies des Aliments, Université d'Abobo Adjamé, 02 BP 801 Abidjan 02 (Côte d'Ivoire).

**Running title:** Radish peroxidase from Burkina Faso

**\*Correspondance :** Mamoudou H. DICKO, PhD.

Phone: (+226) 50307064 /70272643;

Fax: (+226) 50307242;

Email: [mdicko@univ-ouaga.bf](mailto:mdicko@univ-ouaga.bf); [mamounadiao@yahoo.fr](mailto:mamounadiao@yahoo.fr)

## Abstract

Peroxidase (POX) activities were extracted from radish (*Raphanus sativus*) grown in the environment of Burkina Faso. Analysis of crude extract by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) showed two major activities designated anionic POX1 and cationic POX2. POX1 was purified by cation-exchange chromatography followed by hydrophobic interaction-chromatography and POX2 was purified by cation-exchange and anion-exchange chromatographies. Purification yields and factors of POX1 and POX 2 were 22.11 % and 15.49 %, and 18.5 and 27.2 fold, respectively. Purified enzymes were monomeric proteins with molecular masses of 70 kDa and 40 kDa for POX1 and POX2, respectively, as determined by SDS-PAGE. Both isoenzymes had optimum pH of activity at 5.6. POX1 and POX2 had optimum temperatures of activity at 35° and 40 °C, respectively. POX2 appeared to be highly stable than POX1. Both POXs were activated by  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  but inhibited by  $K^+$ ,  $Na^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , EDTA and reducing compounds. POX1 and POX2 oxidize a wide range of phenolic substrates as monophenol, bis and polyphenol. Tested phenolic compounds were more oxidized by POX1 than POX2 except for ferulic acid, caffeic acid and 4-hydroxybenzoic acid. Nevertheless, efficiency of phenolic compounds oxidation may allow using these enzymes for bioremediation of industrial wastewater containing phenolic compounds.

**Keywords** peroxidase, purification, *Raphanus sativus*, radish, phenolic compound.

## Introduction

1  
2  
3 Plant secretory peroxidases (POXs) are heme-containing proteins, which are member of  
4  
5 oxidoreductases [E.C.1.11.1.7] and catalyze the oxidation of a wide variety of organic and  
6  
7 inorganic substrates in the presence of hydrogen peroxide [1-3].  
8  
9

10  
11 POX activities have been characterized in plants, microorganisms, and animals, where they  
12  
13 play important roles. In plants they participate in the lignification process [4] and in the  
14  
15 mechanism of defense in physically damaged or infected tissues [5]. These ubiquitous  
16  
17 enzymes are located in several subcellular compartments, notably in chloroplasts [6]. POX  
18  
19 activities in the cell walls of plants are suggested to play a role in defense against disease and  
20  
21 help wound healing. The primary function of POX may be to oxidize a variety of hydrogen  
22  
23 donors at the expense of hydrogen peroxide [7]. They can catalyze the oxidative  
24  
25 polymerization of phenols, anilines and other aromatics to insoluble oligomers in the presence  
26  
27 of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [8].  
28  
29  
30  
31

32  
33 Due to the high-redox potential required for phenolic compound oxidation, POXs are of  
34  
35 interest as industrial biocatalysts. They are probably the most well-suited enzymes for the  
36  
37 preparation of enzyme-conjugated antibodies which are used in enzyme linked  
38  
39 immunosorbent assays (ELISA), due to their ability to yield chromogenic products at low  
40  
41 concentrations [9]. POXs coupled with other enzymes in polyenzymatic systems producing  
42  
43 hydrogen peroxide are also used in the determination of many compounds, such as glucose in  
44  
45 blood. Because of the oxidative nature of POXs, there are several areas where they could  
46  
47 replace current chemical oxidant techniques. POXs are used for developing reliable methods  
48  
49 of the determination of hydrogen peroxide, which are of great importance in both the  
50  
51 biological and industrial fields [10]. These enzymes can still be employed in the  
52  
53 determination of lipid peroxidation in cell membranes [11] and in meat food products [12,  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**13].** POXs play important roles in food quality, including deterioration of color and flavor

**[14].** Some current applications of POX include treatment of waste water containing phenolic compounds, the synthesis of several different aromatic chemicals and polymeric materials

**[15].**

Radish (*Raphanus sativus*) is known to contain POX activities. However, no investigation has been carried out on the radish cultivated in the environment of Burkina Faso. The present work was undertaken to isolate and characterize POX isoenzymes from radish grown in Burkina Faso as alternative source of POX for technological applications.

## Materials and Methods

### Chemicals and reagents

Bovine serum albumin (BSA), hydrogen peroxide were from Sigma Chemical Co. DEAE-Sepharose CL-6B, CM-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200 HR and Phenyl-Sepharose CL-4B gels were from Pharmacia-LKB Biotech. Protein standards for molecular mass determination and reagents used for polyacrylamide gel electrophoresis were obtained from Bio-Rad. All other chemicals and reagents were of analytical grade.

### Plant Material

*Raphanus sativus* bulbs were collected at Ouagadougou (Burkina Faso) and stored at -30°C prior to extraction of peroxidases.

### Peroxidase Activity and Total Protein Determination

Crude enzyme extracts were prepared by grinding the bulbs of radish (20g) in 10 ml of distilled water containing 0.9 % NaCl (w/v). The homogenate was centrifuged at 6 000 rpm for 30 min. The supernatant filtered through Whatman paper N°1 was used as the crude extract and conserved at 4°C. POX activity was determined in triplicate by monitoring hydrogen peroxide dependent oxidation of guaiacol. Appearance of oxidation products was followed at 470 nm. For the routine assay, 200 mL of 50 mM guaiacol were mixed with 1.6 mL of 100 mM citrate-phosphate buffer pH 6 and 0.1 mL of enzyme solution, at 25°C. The reaction was started by addition of 100 mL of 100 mM hydrogen peroxide. Control assays were prepared by replacing the substrate or enzyme extract with buffer. Only the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidation of guaiacol was considered as POX activity. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that causes an increase of 0.001 absorbance per min. Total

1 protein concentration was determined in triplicate by the method of Lowry *et al.* [16], using  
2 bovine serum albumin as standard.  
3  
4  
5  
6

### 7 Purification procedures 8 9

10 Prior to purification, the effects of pH on enzyme activities and stabilities were determined in  
11 order to identify the best buffer to use. Results showed that 20 mM citrate-phosphate buffer  
12 pH 6 is the best buffer for enzyme stability. All purification steps were performed at 4°C. The  
13 crude enzyme extract from radish was loaded onto a CM-Sepharose CL-6B column (2.6 x 4.0  
14 cm) equilibrated with 20 mM citrate-phosphate buffer pH 6. The column was washed with the  
15 same buffer at flow rate of 1 ml/min. Bound proteins were then eluted over stepwise gradient  
16 of NaCl (0.3, 0.5 and 0.7 M), in 20 mM citrate-phosphate buffer, pH 6 (flow rate 1 ml/min,  
17 3.0 ml/fraction). The first fraction of pooled unbound POX activity (Peak 1) was loaded onto  
18 a DEAE-Sepharose CL-6B column (2.6 x 6.0 cm) equilibrated with 20 mM citrate-phosphate  
19 buffer pH 6. Unbound proteins were removed by washing the gel with two bed volumes of  
20 equilibration buffer. Bound proteins were then eluted over stepwise gradient NaCl (0.3, 0.5  
21 and 1 M), in 20 mM citrate-phosphate buffer, pH 6.0 (flow rate 1ml/min, 2.0 ml fractions).  
22 The active fractions were pooled and dialyzed overnight against 20 mM citrate-phosphate  
23 buffer, pH 6.0. No further purification steps were necessary.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45 On the other hand, the second fraction of the bound POX activity (Peak 2) eluted from CM-  
46 Sepharose CL-6B at the first step was saturated with ammonium sulfate to a final  
47 concentration of 1.7 M and loaded onto a phenyl-sepharose HP column for hydrophobic  
48 interaction chromatography. The active fractions were pooled and dialyzed overnight against  
49 20 mM sodium acetate buffer pH 6. No further purification steps were necessary.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57

### 58 Gel electrophoresis 59 60 61 62 63 64 65



1 For SDS-PAGE, the samples were denatured by treatment in 125 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8  
2 containing 4% (w/v) SDS, 1% (v/v) mercaptoethanol, 20% (v/v) glycerol and 0.025% (w/v)  
3 bromophenol blue, at 100°C, for 5 min. Electrophoresis was performed according to Laemmli  
4 (1970) on 1.5 mm thick slab gels (7 X 8 cm) containing 12% acrylamide, 375 mM Tris-HCl  
5 buffer pH 8.8 and 0.1% (w/v) SDS. Electrophoresis was carried out at 10 mA with a 25 mM  
6 Tris, 192 mM glycine buffer containing 0.1% (w/v) SDS as electrode buffer. Proteins were  
7 stained with silver nitrate according to Blum et al. (1987). The molecular-mass standard  
8 markers (Bio-Rad) were phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumin (45.0 kDa),  
9 carbonic anhydrase (31.0 kDa), soya bean trypsin inhibitor (21.5 kDa) and lysozyme (14.4  
10 kDa).

11 For non-denaturing PAGE, samples were mixed just before electrophoresis with sample  
12 buffer without 2-mercaptoethanol and SDS. Proteins were stained with silver nitrate  
13 according to Blum *et al.* [17]. For POX zymography, the crude enzyme extract was subjected  
14 to PAGE to identify POX isoenzymes. Enzyme-substrate staining of the native PAGE gels  
15 was carried out by monitoring the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidation of guaiacol.

#### 16 Effects of pH and temperature on enzyme activities and stabilities

17 The effect of pH on enzyme activity was determined by measuring the oxidation of guaiacol  
18 in a set of buffers at various pH values ranging from pH 2.6 to 10.0. The used buffers were  
19 100 mM citrate-phosphate buffer from pH 2.6-7, 100 mM sodium acetate buffer from pH 4 to  
20 5.6, 100 mM sodium phosphate from pH 5.6-8, 100 mM tris-HCl from pH 7-9 and 100 mM  
21 glycine from pH 8-10. The pH values of each buffer were determined at 25°C. The pH  
22 stability of each purified enzyme was studied in pH range 2.6 to 10.0 in the same buffers as  
23 mentioned above. After 2 h pre-incubation at 25°C, aliquots were taken and immediately  
24 assayed for residual POX activity. The effect of temperature on POX activity was performed

1 in 100 mM of the best buffer at optimum pH over a temperature range of 5 to 80°C using  
2 guaiacol as hydrogen donor under the routine POX assay. For thermal stability tests, the  
3  
4 aliquots of enzyme were preincubated at different temperatures ranging from 10 to 80°C for  
5  
6  
7 10 min. Residual activities were determined in the three cases at 37°C under the standard  
8  
9 assay conditions, are expressed as percentage activity of zero-time control compared to  
10  
11 untreated enzyme.  
12  
13

#### 14 15 16 Determination of substrate specificity

17  
18 The substrate specificity of the two POXs was determined by incubating each enzyme with  
19  
20 various phenolic substrates (10 mM) at 37°C in 100 mM citrate-phosphate buffer pH 5.6 for 5  
21  
22 min. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidation of these substrates was determined by spectrophotometry  
23  
24 (DU 7500, Beckmann, Munich). The oxidation rates of substrates were measured as a  
25  
26 decrease in absorption of the substrate or an increase of absorbance of the products. The same  
27  
28 reaction mixture and routine assay conditions were used by replacing guaiacol with ABTS  
29  
30 (A<sub>405</sub>; ε =36 800M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), pyrogallol (A<sub>420</sub>; ε=2640 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), catechol (A<sub>295</sub>, ε=1700 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>  
31  
32 <sup>1</sup>), ferulic acid (A<sub>318</sub>; ε=6000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), or other phenolic compounds (A<sub>420</sub>).  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

#### 41 Effect of some chemicals on POX activities

42  
43 To determine the effect of various compounds (metal ions, detergents and dithiol-reducing  
44  
45 agents) as possible activators or inhibitors of the purified POX, the enzymatic solutions were  
46  
47 preincubated at 37°C for 2 hours with the compounds and then the residual activity was  
48  
49 assayed. The final concentration of ions or chemicals agents in the reaction mixture was 5  
50  
51 mM. The substrate guaiacol was added to the medium and incubated at 37°C for 5 min. The  
52  
53 residual activity was assayed as the standard conditions.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Results and Discussion

### Purification

Zymography of POX activity by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) from a radish (*Raphanus sativus*) extract showed two major activities referred as POX1 and POX2 (Fig. 1). These two POXs were purified using three column chromatographic steps (Figs. 2a, 2b and 2c). The first step was a cation-exchange chromatography (Fig. 2a) over a column of CM-Sepharose. It allowed separating two isoenzymes POX1 and POX2. POX1 was bound to the column at pH 6, suggesting that its *pI* is lower than pH6, thus it is an acidic POX. However, POX2 was bound to the column at pH 6, and was further eluted with 0.3 M NaCl in citrate-phosphate buffer. This isoenzyme is considered as cationic POX. The most active fractions of POX1 peak were subjected to anion-exchange chromatography over a DEAE-Sepharose CL-6B column (Fig. 2b). A single peak of POX1 activity was obtained. This isoenzyme was purified at 18.5 fold with a yield of 22.1% (Table 1). The purification of anionic POX1 by DEAE cellulose column was a determinant step for removing several contaminant proteins. Indeed purification of anionic POXs by DEAE cellulose column is very common [18-20]. The peak of POX2 resolved on the CM-Sepharose CL-6B column step was applied to phenyl-Sepharose HP column for hydrophobic interaction chromatography (Fig. 2c). A single peak showing POX2 activity was eluted at 1.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. From this end-step in the purification, a final purification factor of 27.2 was obtained, with a yield of 15.5% (Table 1). Both isoperoxidases gave final yields significantly lower than those obtained (28%) by Dicko *et al.* [21] for the purification of cationic POX from sorghum. However, the yields are higher than those obtained (3.5 %) by Hermelinda *et al.* for POX from *Copaifera lansdorffii* [22]. Nevertheless, the purity was supported by SDS-PAGE, in which each isoenzymes appeared as single polypeptide band (Fig. 3).

1 SDS-PAGE allowed estimating molecular masses of POX1 and POX2 to be 70 kDa and 40  
2 kDa, respectively. Thus, the molecular mass of POX2 is almost two fold higher than that of  
3  
4 POX1. POX1 has also a molecular mass higher than other plant POXs ( $40 \pm 10$  kDa) such as  
5  
6 Japanese *Raphanus sativus* (28 KDa) [23], *Sorghum bicolor* (38 kDa) [21], *Coprinus*  
7  
8 *cinereus* (36 KDa) [24], lignin POX from *Cunninghamella elegans* (50 KDa) [25] and POXs  
9  
10 from leaves of royal palm tree *Roystonea regia* (51 KDa) [26].  
11  
12

13  
14 Molecular masses of POXs from various sources have been reported to range from 30 to 60  
15  
16 kDa [27]. The observed high molecular mass of POX1 may be attributed to post-translational  
17  
18 modifications of the polypeptide chain including the number and compositions of glycan  
19  
20 chains commonly present in plant POXs [21, 28, 29]. In addition, these POXs from Burkina  
21  
22 radish are monomeric proteins as found for plant secretory POXs [22, 30-32].  
23  
24  
25  
26  
27  
28

### 29 **Effects of pH and temperature**

30

31 The effect of different pH on the oxidation of guaiacol by POX1 and POX2 is illustrated in  
32  
33 Figs. 4 and 5. For both POXs, maximum activity was obtained at pH 5.6. This optimum pH  
34  
35 was similar to those of POX from *Solanum melongena* [33].  
36  
37

38 The pH dependence of the stability of POX2 (fig.5B) showed a maximal stability at pH range  
39  
40 of 4.6 to 7.6 in citrate-phosphate buffer (pH 4.6-7), sodium acetate buffer (pH 5.0-7) and  
41  
42 sodium phosphate buffer (pH 6-7.6) buffer when it was preincubated for 2 h at ambient  
43  
44 temperature. But, in these cases, the activity of POX1 was reduced by about 10 to 20% (Fig.  
45  
46 5A), when compared to that obtained with POX2 in sodium acetate buffer and sodium  
47  
48 phosphate buffer. It retained all of its activity in citrate-phosphate buffer only at pH6-6.6.  
49  
50

51 At pH below 4 and above 8.0, POX1 and POX2 activities drastically decreased as observed  
52  
53 by the oxidation of guaiacol. At low pH, the decrease of activity might be attributed to the  
54  
55 release of heme prosthetic group from the polypeptide chain, which resulted in the loss of  
56  
57  
58  
59

1 enzyme activity [34]. The decrease of activity at high pH could be attributed to the formation  
2 of phenol-conjugated base. Therefore, the basic form did not permit the phenolic compounds  
3 to act as hydrogen donors. Hence, the best results for the POX activities were obtained at pH  
4 4.6~8.0. This is quite interesting because the use of pH close to neutrality has been  
5 recommended for biotechnological applications.  
6

7  
8  
9  
10  
11 POX1 and POX2 were optimally active at 35°C and 40°C, respectively. Those optimum  
12 temperatures were lower than those reported for hyperthermostable POX from *solanum*  
13 *melongena* (84°C) [33] and those reported for *Spinacia oleracea* [35]. Nevertheless POX2 has  
14 similar optimum thermal activity to a copper-induced anionic POX from sunflower roots [36].  
15  
16 The thermal denaturation was investigated by incubation of the two enzymes at various  
17 temperatures for 15 min. POX1 and POX2 were fairly stable at temperature up to 30 and  
18 40°C, respectively. Above these temperatures, their activities declined rapidly as temperature  
19 increased, and were completely inactivated at 75-80°C.  
20  
21

### 22 Substrate Specificity

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38 A variety of phenolic compounds were tested for their ability to be oxidized by POX1 and  
39 POX2 in the presence of hydrogen peroxide (Table 2). POX1 and POX2 both oxidized a wide  
40 range of phenolic substrates such as monophenol, di and polyphenol. This is of great  
41 importance, since many industrial effluents contain a variety of phenolic contaminants; of  
42 which some are more amenable to enzymatic treatment to others. However, the efficiency of  
43 POX catalysis depends on the chemical nature of the reducing substrates. The results in Table  
44 2 show that ABTS and gallicol were the best substrates for POX1 and POX2, respectively.  
45  
46 Dopamine degree of oxidation by POX1 and POX2 were 86.9 and 91.3 %, respectively.  
47  
48 Gallic acid, 4-methoxyphenol, pyrogallol, and vanillin were over 50% oxidized by POX1.  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

The level of oxidation of tested phenolic compounds by POX1 is higher than for POX2 except for ferulic acid, caffeic acid and 4-hydroxybenzoic acid. The outcome of such studies might help to use the POX of Burkina radish to detoxify phenolic compound of wastewater [15] and therefore might have important implications with respect to phytoremediation.

### Effects of chemical compounds

The impact of various metal ions and chelating agents on the purified POX1 and POX2 activities is shown in Table 3. The two enzymes showed different behavior in the presence of chemical compounds. POX2 was activated by  $Ba^{2+}$  and inhibited by  $Mn^{2+}$ . However,  $Ba^{2+}$  had no effect on POX1. Thus, the common activator ions of the two POXs were  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ca^{2+}$ , and  $Cu^{2+}$  and the common inhibitors were  $K^+$ ,  $Na^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$ . POX activation with divalent cations such as  $Ca^{2+}$  is quite usual because the later is present in the structure of POXs, and it plays a role in the stability and activity of POX during the catalysis. It has been reported that heavy metals such as  $Zn^{2+}$ , were potent inhibitors of POX from Jerusalem artichoke (*H. tuberosus*) [37].

The influence of other chemicals rather than metal ions was also studied (Table 4). All the detergents tested inhibited POX1 and POX2 but to different degrees. Results show that POX activities were inhibited by reducing agent such as, sodium azide, sodium thiosulfate, sodium disulfite, ascorbic acid, and parachloro-mercuro benzoate (PCMB). POX activities were not very sensitive to EDTA and SDS. However, both POX1 and POX2 were highly inhibited by PCMB indicating that thiol groups may be important for POX catalysis. EDTA, an ion chelating also exerted an inhibitory effect. This clearly correlates with the fact some ions such as calcium are required to both POXs for their activities. Polyethylene glycol (PEG) enhanced the activities of both POXs. This non ionic polymer has been shown to be efficient in

improving POX catalysis notably during the degradation of phenolic compounds [15]. PEG might exert positive effect on POX with the protection of the enzyme by interacting with the reaction products [38].

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Conclusion

Burkina *radish* contains two major peroxidase isoenzymes. Both peroxidases have some identical physico-chemical properties (pH and optimum temperature). However, their molecular properties, substrate specificities and effect of some chemical compounds confirmed that the two enzymes were different. Moreover, the study on substrate oxidation showed that, they could play an important role in the preservation of the environment polluted by phenolic compounds. This property is of interest because it could be useful in finding solution to the thorny problem of degradation of recalcitrant phenolic compounds that resist on conventional methods for removal.

**Acknowledgements.** This research project was supported trough financial assistance from the Fondazione Lelio and Lisli Basso-Issoco, Italy, and Agence Universitaire de la Francophonie (AUF-GP3A), France.

### List of abbreviation:

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid,

PEG: Polyethylene glycol,

POX: Peroxidase,

PCMB: para-chloromercurio-benzoic acid,

EDTA: ethylene diamine tetra acetic acid.



## References

1. Banci, L. (1997). *Journal of Biotechnology*, 53, 253–263.
2. Yemenicioglu, A., Özkan, M., & Cemero\_lu, B. (1998). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4158–4163.
3. Köksal, E., & Gülçin, I. (2008). *Protein Peptide Letters*, 15, 320–326.
4. Wakamatsu, K & Takahama, U. (1993). *Physiologia Plantarum*, 68, 167–171.
5. Biles, C. L., & Martyn, R. D. (1993). *Plant Physiology and Biochemistry*, 31, 499–506.
6. Johnson-Flanagan, A. M., & McLachlan, G. (1990). *Physiologia Plantarum*, 80, 453–459.
7. Hirata, T., Ashida, Y., Mori, H., Yoshinaga, D. & Goad L. J. (2000). *Phytochemistry* 55, 197–202.
8. Dunford, H. B., & Stillman J. S. (1976). *Coordination Chemistry Review*, 19, 187–251.
9. Krell, H. W. (1991). University M. Curie, Lublind Poland, and University of Geneva, Geneva Switzerland. pp. 469–478.
10. Sergeyeva, T. A., Lavrik, N., & Rachkov, A. E. (1999). *Analytical Chimistry Acta*, 391, 289–297.
11. Kokçam, I., & Naziroglu, M. (1999). *Clinica Chimica Acta*, 289, 23–31.
12. Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715–724.
13. Medeiros, M. H. G., Loureiro, A. P. M., & Carvalho, V.M. (1996). *Revista de Medicina, São Paulo*, 75, 16–25.
14. Ashie, N. A., Simpson B. K., & Smith, J. P. (1996). *Critical Review in Food Science*, 36, 1–30.
15. Diao, M., Ouédraogo, N., Baba-Moussa, L., Savadogo, P. W., N'Guessan, A. G., Bassolé I. H. N., & Dicko M. H. (2011). *Biodegradation*, 22, 389–396.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
16. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farrar, L., & Randall, R. J. (1951). *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
  17. Blum, H., Beier, H., & Gross, B. (1987). *Electrophoresis*, 8, 93–99.
  18. Opstal, V., Bagamboula, C.F., Theys, T., Vanmuysen, S. C. M. & Michiels, C. W. (2006). *Journal of Applied Microbiology*, 10, 242–250.
  19. Mohamed, S.A., El-Badry, M. O., Drees, E. A. & Fahmy, AS (2008). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150, 127–137.
  20. Zia, M. A., Kousar, M., Ahmed, I., Iqbal, H. M. N. & Abbas R. Z. (2011). *African Journal of Biotechnology*, 10, 6300–6303
  21. Dicko, M. H., Gruppen, H., Hilhorst, R., Voragen, A. G. J., & van Berkel, W. J. H. (2006). *FEBS Journal*, 273, 2293–2307.
  22. Hermelinda, P. F. M., Cibele, M. C. P. G., Marcos, T., Marcus, S., Sergio, M., & Gláucia, M. P. (2007). *Quim. Nova*, 30, 1067–1071.
  23. Ohya, T., Morimura, Y., Saji, H., Mihara, T., & Ikawa, T. (1997). *Plant Science*, 125, 137–145.
  24. Ikehata, K., Buchanan, I. D., Pickard, M. A., & Smith, D. W. (2005). *Bioresource Technology*, 96, 1758–1770.
  25. Roushdy, M. M., Abdel-Shakour, E. H. & El-Agamy, E. I. (2011). *Journal of American Science*, 7, 6–13.
  26. Sakharov, I. Y., Vesgac, B. M. K., Galaev, I. Y., Sakharova, I. V., & Pletjushkina, O. Y. (2001). *Plant Science*, 161, 853–860.
  27. Thongsook, T. & Barrett, D. M (2005). Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) Peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3206–3214.
  28. Sakharov, I.Y., Castillo, J.A., Areza, J.C., Galaev, I.Y. (2000). *Bioseparation*, 9, 125–132.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
29. Christensen, J. H., Gjesing G. B., Welinder K., Montagu M. V. & Boerjan W. (1998).  
*Plant Physiology*, 118, 125–135.
  30. Johri, S., Jamwal, U., Rasool, S., Kumar, A., Verma, V. & Qazi, G.N. (2005). *Plant  
Science*, 169, 1014–1021.
  31. Vitali, A., Botta, B., Monache, G. D., Zappitelli, S., Ricciardi, P., Melino, S., Petruzzelli,  
R. & Giardina, B. (1998). *Biochemical Journal*, 331, 513–519.
  32. Kim, S. S., & Lee, D. J. (2005). *Journal of Plant Physiology*, 162, 609–617
  33. Vernwal, S. K. Yadav, R. S. S., & Yadav, K. D. S. (2006). *Indian Journal of Biochemistry  
and Biophysics*, 43, 239–243.
  34. Deepa, S. S. & Arumughan, C. (2002). *Phytochemistry*, 61, 503–511.
  35. Köksal, K. (2011). *International Journal of Pharmacology*, 7, 135–139.
  36. Hager, J., Houda, B., Michel, R., Gisèle, B., Elisabeth, J., & Ezzeddine, E. F. (2008).  
*Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 760–767.
  37. Şat, I. G. (2008). *African Journal of Biotechnology*, 7, 2248–2253.
  38. Kinsley, C. & Nicell, J. A. (2000). *Bioresource Technology*, 73, 139–146.

Table 1. Purification of POX1 and POX2 from Burkina radish.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units/mg)	Purification factor	Yield (%)
Crude extract	176.06	38530	226	1	100
CM- Sepharose CL-6B	15.36	29074	1892	8.4	75.5
DEAE-Sepharose CL-6B (POX1)	2.03	8519	4187	18.5	22.1
Phenyl sepharose CL-4B (POX2)	0.97	5969	6151	27.2	15.5

Table 2. Substrate specificity of the purified POXs of Burkina radish

Phenolic compound	*Relative proportion of oxidation (%)	
	POX1	POX2
ABTS	100	91.23
Gaïacol	86.19	100
4-hydroxybenzoic Acid	28.56	30.65
Ferulic Acid	17.5	40.22
Gallic Acid	53.34	34.52
Para-coumaric Acid	2.5	15.61
4-methoxyphenol Acid	61.66	55.43
Syringic Acid	31.74	29.82
1-Naphtol	27.08	9.22
Phloroglucinol	21.52	31.13
1,4-tyrosol	9.21	1.23
Caffeine	0.65	9.78
Vanillin	50.94	14.74
4-Hydroxyphenylacetic acid	0.91	0.69
Pyrogallol	82.82	66.08
Catechol	41.52	33.04
Dopamine	86.91	91.30
Tannic acid	3.69	3.34

\*Degree of oxidation is compared to ABTS

Table 3. Effect of metal ions on POX activities. Enzymatic activity was assayed with guaïacol as substrate.

*Metal ion	Relative activity (%)	
	POX1	POX2
Ba <sup>2+</sup>	100	156.21
Zn <sup>2+</sup>	30.7	30.56
Ca <sup>2+</sup>	115.2	108.1
Mg <sup>2+</sup>	124.2	111.36
Cu <sup>2+</sup>	161.4	165.45
K <sup>+</sup>	59.3	53.46
Na <sup>2+</sup>	73.4	64.02
Mn <sup>2+</sup>	91.2	88.18

\*Final concentration of the each ion was 5 mM in the reaction medium.

Table 4: Effect of detergents reducing agents and other compounds on POX activities

*Chemical compound	Relative activity (%)	
	POX1	POX2
Sodium disulfite	1.97	2.55
Ascorbic acid	0.67	0.53
Sodium thiosulfate	1.88	0.22
Parachloro-mercuro benzoate	36.01	30.38
Sodium azide	1.34	00
EDTA	52.45	60.31
Citric Acid	26.04	32.12
SDS	93.22	90.89
Polyéthylène glycol	256.23	261.16

\*Final concentration of the each chemical compound was 5 mM in the reaction medium.

### Figure and captions

Fig.1. Zymography of POX activities from Burkina radish using gaiacol as hydrogen donor.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Fig. 2. Purification of POX isoenzymes from Burkina radish. (A) Cation-exchange chromatography. (B) Anion-exchange chromatography, (C) Hydrophobic interaction chromatography.

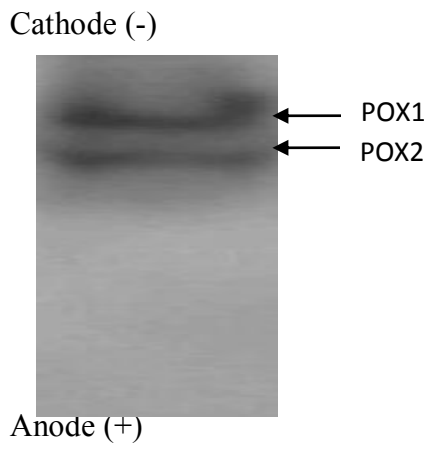
Fig.3. SDS-PAGE of purified POXs from Burkina radish. Lane A and D, molecular mass markers (values in kDa). Lane B, purified POX1. Lane C, purified POX2. Proteins were stained by silver nitrate.

Fig.4. Optimum pH of POXs from *R. sativus*. (A) optimum pH of POX1; (B) optimum pH of POX2.

Fig.5. Effect of pH and chemical nature of buffer on POX activities from *R. sativus*. (A) POX1; (B) POX2.



Fig.1



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Fig. 2.

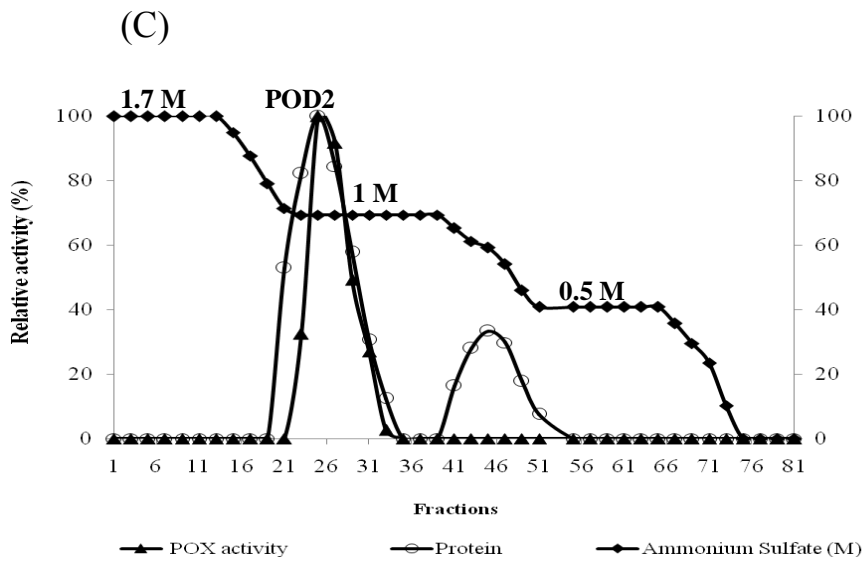
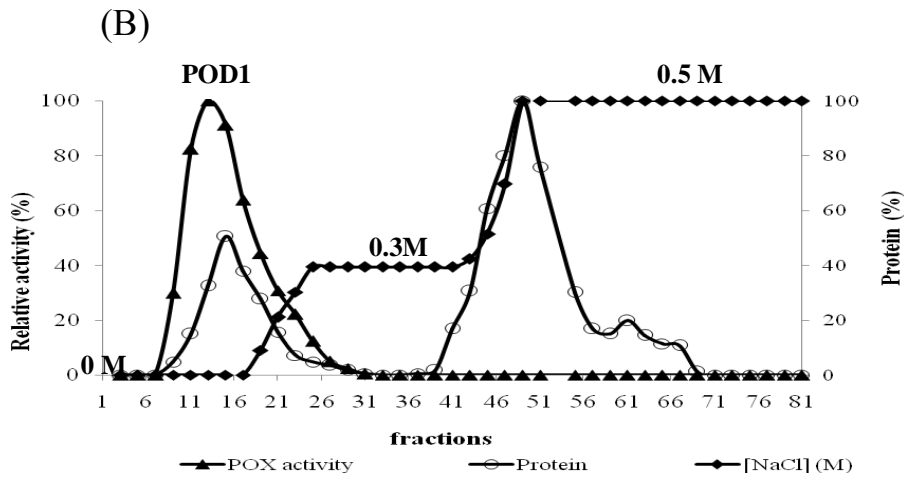
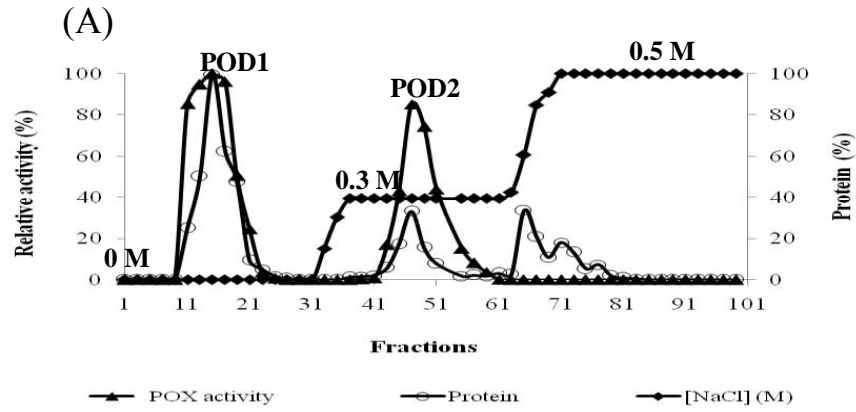


Fig. 3

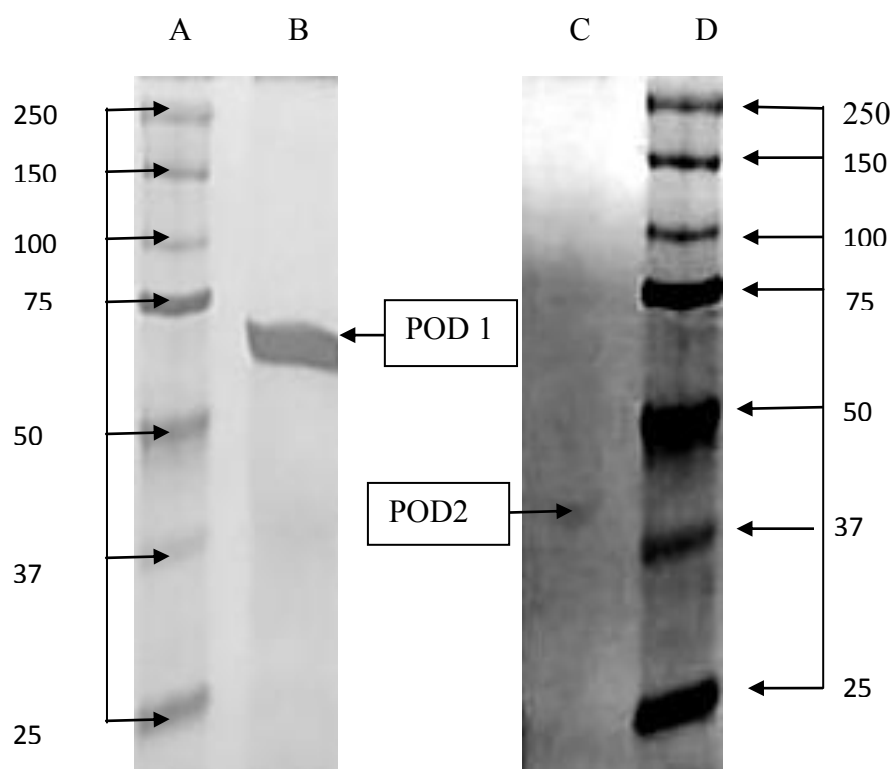


Fig.4

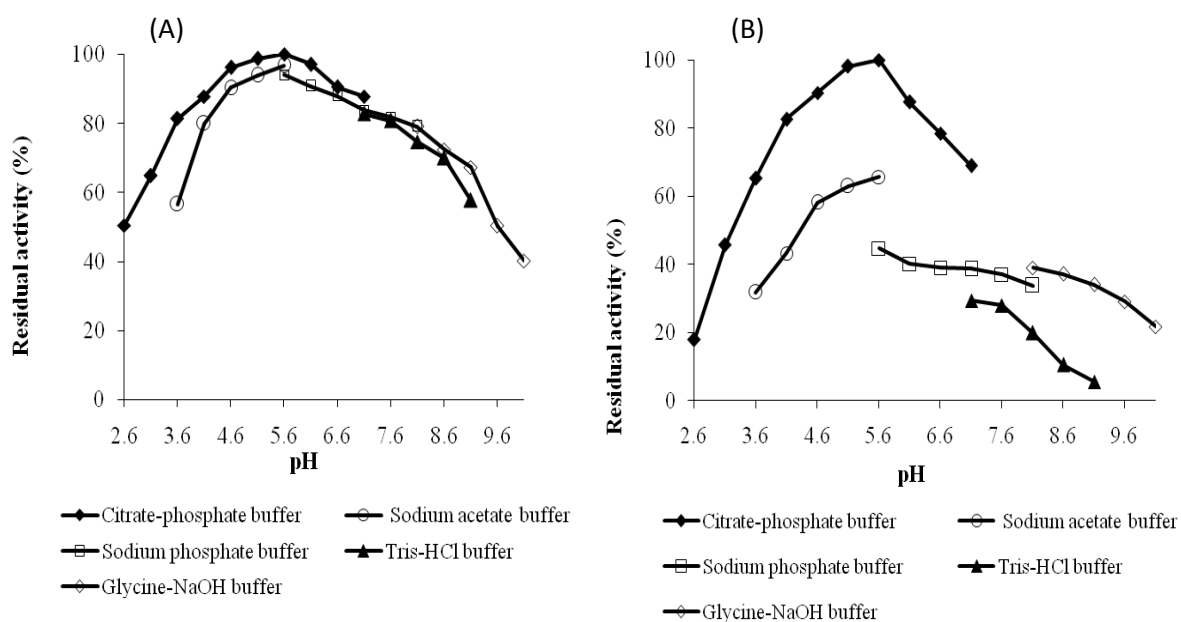
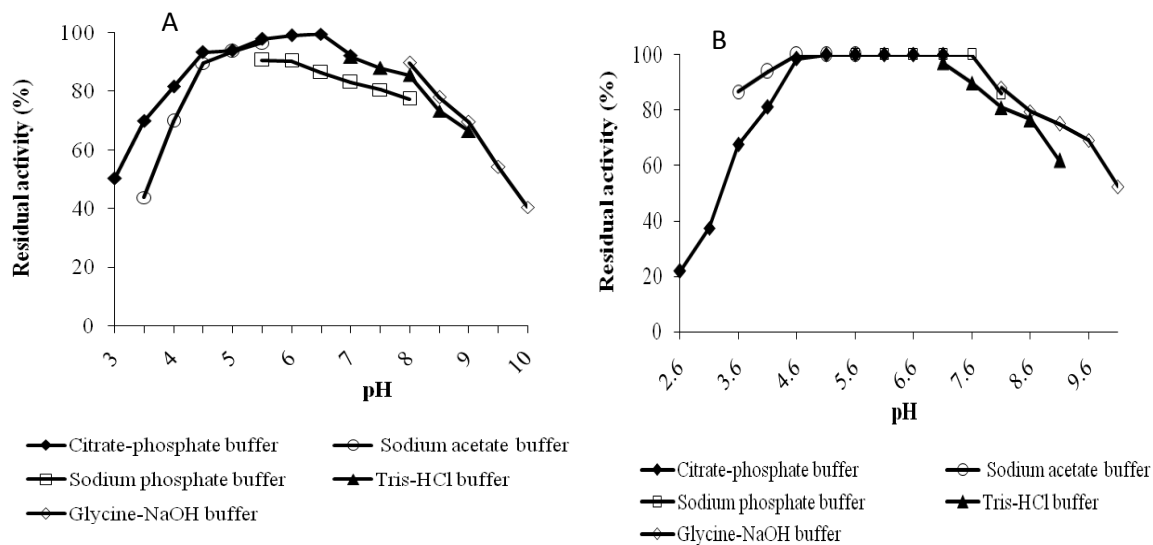


Fig.5



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## **Article 4.**

Purification and characterisation of Burkina sweet potato (*Ipomea batatas*) peroxidase

Mamounata Diao, Brice N'Cho Ayekoue , Soumaila Daboné, Imael H. N. Bassole, Lucien P. Kouame, Georges N'guessan Amani and Mamoudou H. Dicko (2012).

In preparation.

# **PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF SWEET POTATO (*Ipomoea batatas*) PEROXYDASES**

Mamounata DIAO<sup>(1)</sup>, Brice N'CHO AYEKOUE<sup>(2)</sup>, Soumaila DABONE<sup>(2)</sup>, Imael H. N. BASSOLE<sup>(1)</sup>, Patrice KOUAME<sup>(2)</sup>, Georges N'GUESSAN AMANI<sup>(3)</sup>, and Mamoudou H. DICKO<sup>(1)</sup>.

## **Author address:**

<sup>1</sup>Laboratoire BAEBIB, UFR-SVT, Université de Ouagadougou, Burkina Faso. 09 P 848  
Ouagadougou 09 (Burkina Faso)

<sup>2</sup>Laboratoire de Biocatalyse et des Bioprocédés, l'Université d'Abobo-Adjamé, Côte d'Ivoire 02 BP 801 Abidjan 02

<sup>3</sup>UFR-Sciences et Technologies des Aliments, Université d'Abobo Adjamé, 02 BP 801, Côte d'Ivoire

**Article Type:** ORIGINAL PAPER

**Correspondance :** Mamoudou H. DICKO, PhD.

Phone: (226) 50307064 /70272643;

Fax: (226) 50307242;

Email: [mdicko@univ-ouaga.bf](mailto:mdicko@univ-ouaga.bf)

## **Abstract**

A peroxidase (POXp) was purified from bulb of *Ipomoea batatas* and characterized. POXp was obtained by ammonium sulfate precipitation followed by gel-filtration and anion exchange chromatography. POXp showed a molecular mass of approx. 44 kDa by SDS-PAGE, pH and temperature optima at 6.0 and 45.0 °C, respectively. The presence of Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> enhanced the POXp activity but it was decrease by Mn<sup>2+</sup>, Na<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>. The Zn<sup>2+</sup> has not an effect on POXp. POXp oxidize a wide range of phenolic substrates as monophenol, bis and polyphenol. The greatest rate of oxidation was obtained with guaiacol. These properties may allow using these enzymes for bioremediation of industrial wastewater containing phenolic compounds.

## **INTRODUCTION**

Peroxidase (POX) is a ubiquitous enzyme which belongs to the oxidoreductase class of enzyme and generally catalyze a reaction between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as electron acceptor and many kinds of substrates by means of O<sub>2</sub> liberation from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Brill, 1971**).

They represent a group of enzymes widely distributed in the plant kingdom (**van Huystee, 1987**) and involved in many processes: plant growth and development (**Fielding and Hall, 1978b; Gibson and Liu 1978; Riquelme and Cardemil 1993**); cell wall composition, i.e. lignin biosynthesis (**Fukuda and Komamine 1982; Catesson *et al.*, 1986; Bruce and West 1989**), extensin polymerization (**Fry, 1987; van Hustee and Zheng, 1995**) and wall stiffening (**Fry, 1980**); responses to a wide range of environmental stresses and stimuli (**Castillo *et al.*, 1984; Markkola *et al.*, 1990; Cipollini, 1998**) and responses to the initial stages of mycorrhizal penetration (**Spanu and Bonfante, 1988**). A partial explanation for the many roles of peroxidase is its multimolecular form, or isozymes, which are correlated with the activity of plant growth regulators during differentiation (**Srivastava and van Huystee,**

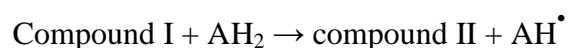
1977), involved in separate processes of organogenesis (**Kay and Basile, 1987**) and related to specific developmental events in tissue culture (**Whitmore, 1978; Maldonado and van Huystee, 1980; Fukuda and Komamine, 1982; Kay and Basile, 1987**), and wound-healing (**Angelini et al. 1990**).

POX is also widely used as an important reagent for clinical diagnosis and microanalytical immunoassay. Some applications for POX have been suggested in the medicinal, chemical and food industries (**Kwak et al., 1996**). Peroxidase has been used for food processing as an indicator of enzyme's stability (**Keleş, 1986**) and biotransformation of organic molecules (**Adam et al., 1999; Gülçin and Yıldırım, 2005**). Because of its broader catalytic activity, a wide range of chemicals can be modified using POX. Also, it can be used for other applications such as synthesis of various aromatic compounds, removal of phenolics from waste waters and the removal of peroxides from foodstuffs, beverages and industrial wastes (**Torres et al., 1997**).

The mechanism of reaction involves the addition of peroxide to the atom of Fe<sup>III</sup> in the haem group of the enzyme (E) and the formation of an intermediate compound I.

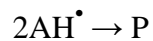
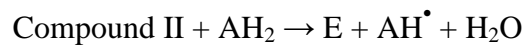


This intermediate, which contains the iron center (Fe<sup>IV</sup> = O) and a radical cation ( $\pi$  delocalised), is reduced by the substrate AH<sub>2</sub> producing a second intermediate in the catalytic cycle (compound II).



A different substrate molecule (AH<sub>2</sub>) reduces compound II, regenerating the enzyme in its native cationic form. During this process several substrate radicals are formed which react with each other forming various products (P), including oligomers and polymers (**Adam, 1999; Jones, 2001**).





The objective of this work was to purify and to characterize the sweet potato peroxidase, used in our first work on the biodegradation of phenolic compound (**Diao *et al.*, 2010**). This study will enable us to better apprehend the catalytic properties of the enzyme for the better use in industrial effluent decontamination of effluent

## **MATERIALS AND METHODS**

### Chemicals and reagents

Substrates for peroxidase were purchased from Merck, BSA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was from Sigma Chemical Co DEAE-Sepharose CL-6B, CM-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200 HR and Phenyl-Sepharose CL-4B gels were from Pharmacia-LKB Biotech. Protein standards for molecular mass determination and the chemical used for polyacrylamide gel electrophoresis were obtained from Bio-Rad. All other chemicals and reagents were of analytical grade.

### Enzymatic source and preparation of crude extract

*Ipomoea batatas* bulb were grown in Ouagadougou (Burkina Faso), during the rainy-season 2007–2008 and then stored at -20°C. After thawing, 300g of sweet potato were down in 450 ml of distilled water containing NaCl 0.9 % (w/v). The homogenate was centrifuged at 6,000 rpm for 30 min. The supernatant filtered through cotton was used as the crude extract and conserved at 4°C.

## Purification procedure

Prior to purification, the effects of pH were determined in order to know the best buffer to use. The result showed citrate-phosphate buffer pH 6 is the best. All steps of the purification procedure were performed at 25 °C.

The pure enzymatic extract was obtained by a three-step purification procedure. The first step consisted to homogenize crude extract (extract-1) with 80% ammonium sulfate. After standing for 12 h, the homogenate was centrifuged at 6,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant was discarded. The precipitate was dissolved in 1.2 ml of 20 mM citrate-phosphate buffer (pH 6.0) (extract-2) and used for the second purification step.

The second step consisted then to load on a Sephacryl S-200 HR column (1.6 X 65 cm) that had been equilibrated with 20 mM citrate-phosphate buffer pH 6.0, 1ml of extract-2 and eluted with the same buffer and a flow rate of 10 ml/h. Fractions of 1 ml were collected and fractions containing high peroxidase activity were pooled (extract-3).

The last step consisted to load 10 mL of the extract-3 on a DEAE-Sepharose column ((2.6 x 6.0). Unbound proteins were removed by washing the gel with two bed volumes of equilibration buffer. Bound proteins were then eluted over stepwise gradient (0.3, 0.5 and 1 M) NaCl, in 20 mM Citrate-Phosphate buffer, pH 6.0 (flow rate 1ml/min, 2.0 ml fractions).

The active fractions pooled were dialyzed overnight against 20 mM citrate-phosphate buffer pH 6.0 and constituted the purified of sweet potato and stored at 4°C.

The protein concentration of the fractions was estimated according to the method of Lowry *et al.* (1951) and the activity in each eluated fraction was determined in triplicate by measurement of the absorbance at 470 nm of guaiacol.

## Protein electrophoresis

The purified peroxidase was used for PAGE to estimate the purity or SDS-PAGE in order to estimate the molecular weight.

For SDS-PAGE, the sample were denatured by a 5 min treatment at 100°C in a 125 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8 containing 4% (w/v) SDS, 1% (v/v) mercaptoethanol, 20% (v/v) glycerol and 0.025% (w/v) bromophenol blue. Electrophoresis was performed according to **Laemmli (1970)** on 1.5 mm thick slab gels (7 X 8 cm) containing 12% acrylamide, 375 mM Tris-HCl buffer pH 8.8 and 0.1% (w/v) SDS. Electrophoresis was carried out at 10 mA with a 25 mM Tris, 192 mM glycine buffer containing 0.1% (w/v) SDS as electrode buffer. Proteins were stained with silver nitrate according to the method of **Blum et al. (1987)**. The molecular-mass standard makers (Bio-Rad) were  $\beta$ -myosin (250.0 kDa),  $\beta$ -galactosidas (150.0 kDa), BSA (100.0 kDa), ovalbumin (75.0 kDa), carbonic anhydrase (50.0 kDa), soya bean trypsin inhibitor (37.0 kDa) lysozyme (25.0 kDa) and aprotinin (15.0 kDa).

For non-denaturing PAGE samples were mixed just before running with sample buffer without 2-mercaptoethanol and SDS. Proteins were stained with silver nitrate according to the method of **Blum et al. (1987)**.

For POX zymography, the crude enzyme extract was used for PAGE to identify POX isoenzymes. Enzyme-substrate staining of the native PAGE gels was carried out by monitoring the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidation of guaiacol.

## Effect of temperature and pH

The effect of pH on the enzyme activity was determined by measuring the oxidation of the guaiacol in a series of buffers at various pH values ranging from pH 2.6 to 10.0. The used buffers were 100 mM citrate-phosphate buffer from pH 2.6-7.0, 100 mM sodium acetate buffer from pH 3.6 to 5.6, 100 mM sodium phosphate from pH 5.6-8.0, 100 mM tris-HCl

from pH 7.0-9.0 and 100mM glycine from pH 8.0-10.0. The pH values of each buffer were determined at 25°C.

The pH stability of enzyme was studied in pH range 2.6 to 10.0 in 100 mM buffers. After 2 h preincubation at 25°C, aliquots were taken and immediately assayed for residual POX activity.

The effect of temperature on POX activity was performed in 100 mM of best buffer at optimum pH over a temperature range of 10 to 80°C using gallicol as hydrogen donor under the routine POX assay.

For thermal stability tests, the aliquots of enzyme were preincubated at different temperatures ranging from 10 to 80°C for 10 min. Residual activities, determined in the three cases at 25°C under the standard test conditions, are expressed as percentage activity of zero-time control of untreated enzyme.

#### Substrate specificity determination

POXp activity was determined with various phenolic substrates (10 mM) at 25°C in 100 mM citrate-phosphate buffer pH 6.0. The oxidation of these substrates was determined by spectrophotometry (DU 7500, Beckmann, Munich). The oxidation rates of substrates were measured as increases or decreases in absorption using the same reaction mixture and assay conditions but with gallicol replaced by ABTS ( $A_{405}$ ;  $\epsilon = 36.8 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), Pyrogallol ( $A_{420}$ ;  $\epsilon = 2640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), Catechol ( $A_{295}$   $\epsilon = 1700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), Ferulic acid ( $A_{318}$ ;  $\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), other compound ( $A_{420}$ ).

## Effect of some chemical agents

To determine the effect of various compounds (metal ions, detergents and dithiol-reducing agents) as possible activators or inhibitors of the purified POX, the enzymatic solutions were preincubated at 25°C for 2 hours with the compounds and then the activity was assayed. The substrate guaiacol was as substrate and the residual activity was determined in the standard conditions.

## RESULTATS AND DISCUSSION

### Purification of peroxidase

For the partial purification of peroxidase, crude extract was precipitated by using solid ammonium sulphate that was added the extract until they were 80% saturated. An 83.53% recovery of peroxidase activity was obtained on this step.

Further purification was obtained by gel filtration on a Sephacryl S-200 HR column, resulting in one peak at the 103<sup>rd</sup> fraction (Figure 1A). From this step in the purification, a purification factor of 3.90 was obtained, with a yield of 37.93 % (Table 1). The last step of purified was obtained by ion-exchange chromatography on a DEAE-Sepharose-CL6B column, resulting in one peak eluted with a sample (0 M NaCl) gradient (Figure 1B). From this end-step in the purification, a final purification factor of 20.57 was obtained, with a yield of 18.25 % (Table1). This yield (18.25 %) is significantly better than those (3.5 %) obtained by **Hermelinda et al. (2007)** with the purification of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. But it's lower than those obtained by **Zia et al (2011)** with the POX of apple (39.99 %) and orange seeds (33.70 %).

## Molecular properties

To determine the apparent molecular weight, the purified, denatured and reduced peroxidase was analyzed by SDS-PAGE. The purified enzyme appears as a single protein band of molecular weight about 44 kDa (Fig.2). These results suggest that the purified enzymes had monomeric structure as most of peroxidases of the world plant (**Johri et al., 2005; Vitali et al., 1998; Kim and Lee, 2005, Hermelinda et al., 2007**). In comparison to other molecular weights of purified plant peroxidase, POX of our study was similar to those from cationic peroxidase Cs of *Raphanus sativus* (44KDa) (**Kim and Lee, 2005**) and lower than peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia* (51 kDa) (**Sakharov et al., 2001**). But it's higher than those (38 kDa) from sorghum grain peroxidase (**Dicko et al., 2006**); those from Japanese *Raphanus sativus* (28KDa) (**Ohya et al., 1997**) and those (31 kDa) from anionic peroxidase A3n of *Raphanus sativus*, (**Lee and Kim, 1994**).

## Optimum pH and pH stability studies

The effect of different pH on the oxidation of guaiacol by POXp is illustrated in Figures 3. It was found that POXp purified from sweet potato had optimum pH at 6.0. It's similar to those obtain by **Sisecioglu et al (2010)** on the POX from Turkish black radish. But it's lower than those (5.5) from sorghum peroxidase and *Solanum melongena* fruit juice (**Nwanguma and Eze., 1995; Vernval et al., 2006**), those (5.2) from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) (**Köksal, 2011**). After 2 hours incubation, the enzyme retained more than 80% of its activity at the range pH 4.6-8.6 in phosphate-citrate buffer (4.6-7.0), sodium-acetate buffer (5-5.6), sodium-phosphate buffer (5.6-8) and tris-HCl buffer (7-8.6) (figure 4). But, in the glycine-NaOH buffer at pH 8-8.6, the activity was reduced by about 10 %, when compared to that obtained in Tris-HCl buffer.

### Optimum temperature and thermique denaturation

The effect of temperature on the activity of this enzyme was examined at 25 °C for 5 min in 100 Mm citrate phosphate buffer (pH 6.0). The optimum temperature for the enzyme activity was around 45 °C (Fig. 5).

The peroxidase from *Ipomoea batatas* was optimally active at 45°C. However, they were sensitive to temperature above 45°C and lost 75 to 93% of their catalytic activity after 120 min of preincubation. This optimum temperature is lower than those reported for hyperthermostable peroxidase from the *solanum melongena* (84°C) (Vernwal et al., 2006). But it's higher than those (40°C) from fruits of *Mallus pumilus* (Singh et al., 2010) and those from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.)(Sisecioglu et al., 2010).

### Effect of metal ions, reducing and detergent agents

The influence of various metal ions and chelating agents on the purified enzymes is presented in Table 2.  $\text{Cu}^{2+}$  increased the activity, thereby, indicating their potential role as cofactor. Zaalishvili et al. (1990) observed that at low  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations, the binding of these ions to the high-affinity sites of the enzyme increases the polymerase activity, whereas at high  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations, the binding may also occur to sites with a lower affinity for the metal, which results in the inhibition of the enzyme activity. The  $\text{Zn}^{2+}$  has not an effect on POXp. However Singh et al. (2010) reported that  $\text{Zn}^{2+}$  established an inhibition to Chocklaty, Kinnaur and Maharaji peroxidases, which are *Mallus pumilus* varieties. Furthermore, Şat (2008) show that inhibitors effect of  $\text{Zn}^{2+}$  on POX from Jerusalem artichoke (*H. tuberosus*). Contrary to Wang et al. (2008),  $\text{Zn}^{2+}$  stimulates lima bean seed peroxidases. POXp was activated by  $\text{Mn}^{2+}$ . However, Dubey et al. (2007) observed for apple peroxidases an inhibition with this ion. POXp was also activated by  $\text{Ba}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ . POX activation with divalent cations such as  $\text{Ca}^{2+}$  is quite usual because the later is present in the structure of POXs, and it plays a role in

the stability and activity of POX during the catalysis. POXp was inhibited by  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Na^{2+}$  and EDTA. Contrary to our result, **Singh et al. (2010)** recorded stimulation by  $Fe^{2+}$  on peroxidases from *Mallus pumilus*.

The influence of other chemicals rather than metal ions was also studied (Table 3). All the detergents tested inhibited POXp but to different degrees. Results show that POX activities were totally inhibited by reducing agent such as, sodium azide, sodium thiosulfate and ascorbic acid sodium disulfite. It was inhibited by PCMB indicating that thiol groups may be important for POX catalysis. EDTA, an ion chelating also exerted an inhibitory effect. This clearly correlates with the fact some ions such as calcium is required to both POXs for their activities. POXp activities were not very sensitive to EDTA and SDS. Polyethylene glycol (PEG) enhanced the activities of both POXs. This non ionic polymer has been shown to be efficient in improving POX catalysis notably during the degradation of phenolic compounds **Diao et al (2011)**. PEG might exert positive effect on POX with the protection of the enzyme by interacting with the reaction products **Kinsley and Nicell (2000)**.

### Substrate Specificity

A variety of phenolic compounds were tested for their ability to be oxidized by POXp in the presence of hydrogen peroxide (Table 4). It oxidized a wide range of phenolic substrates such as monophenol, di and polyphenol. This is of great importance, since many industrial effluents contain a variety of phenolic contaminants; of which some are more amenable to enzymatic treatment to others. However, the efficiency of POX catalysis depends on the chemical nature of the reducing substrates. The results in Table 5 show that gäiacol was the best substrate for POXp. ABTS and Pyrogallol degree of oxidation was 73.3 % and 62.3%, respectively. catechol were over 50% oxidized by POX1. The outcome of such studies might



help to use the POX of Burkina potato to detoxify phenolic compound of wastewater (**Diao et al., 2010**) and therefore might have important implications with respect to phytoremediation.

## Conclusion

Briefly, peroxidase from sweet potato was extracted, purified and characterized by determination of its some biochemical properties. It was showed the POX could be purified from potato bulb at three steps, ammonium sulphate precipitation, Sephacryl S-200 HR gel filtration and ion-exchange chromatography on a DEAE-Sepharose. As for result of the studies for determination the stable pH of enzyme, it was seen that the enzyme was very durable especially under the acidic condition. Optimal active ph was 6.0 and optimal temperature at 45°C.

Moreover, the substrate specificity study showed that, they could play an important role in the preservation of the environment polluted by phenolic compounds. This resultant is very important because it could be very useful in finding solution to the thorny problem of recalcitrant phenolic compounds depollution that resist on conventional methods for removal.

## Acknowledgements

This research project was supported trough financial assistance from the Fondazione Lelio and Lisli Basso-Issoco, Italy, and Agence Universitaire de la Francophonie (AUF-GP3A), France.

## List of abbreviation:

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid,

PEG: Polyethylene glycol,

POX: Peroxidase

PCMB: para-chloromercurio-benzoic acid,

EDTA: ethylene diamine tetra acetic acid.

## References

- Adam W, Lazarus M, Saha-Moler CR, Weichold O, Hoch U, Scherier P (1999). Biotransformations with peroxidases. *Adv. Biochem. Eng.* 63: 74-108.
- Vitali A, Botta B., MONACHE DG, Zappitelli S, Ricciardi P, Melino S, Petruzzelli R and Giardina B (1998). Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies. *Biochem. J.* 331, 513±519
- Angelini R, Manes F, Federico R (1990) Spatial and functional correlation between diamine oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chickpea stems. *Planta* 182: 89–96
- Brill AS (1971). Peroxidase and Catalase. In: Florkin and Stotz, Editors, (3rd ed.), *Comp. Biochem.* 14: 447-479.
- Bruce RJ, West CA (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension culture of castor bean. *Plant Physiol* 91: 889–897
- Castillo FJ, Penel C, Greppin H (1984) Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves. *Plant Physiol* 74: 846–851
- Catesson AM, Imberty A, Goldberg R, Czaninsky Y (1986) Nature, localization and specificity of peroxidases involved in lignifications processes. In: Greppin H, Penel C, Gaspar Th (eds) *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University of Geneva, Geneva, Switzerland, pp 189–198
- Cipollini DF Jr (1998) The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind induced mechanical perturbation. *Am J Bot* 85: 1586–1591

- Dubey A , Diwakar SK, Rawat SK, Kumar P, Batra N, Joshi A, Singh J  
(2007).Characterization of Ionically Bound Peroxidases from Apple (*Mallus pumilus*)  
Fruits. Prep. Biochem.&Biotechnol. 37: 1-12.
- Fielding JL, Hall JL (1978b) A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in  
roots of *Pisum sativum*. II. Distribution of enzymes in relation to root development. J  
Exp Bot 29: 983– 991
- Fry SC (1987) Formation of isodityrosine by peroxidase isozymes. J Exp Bot 38: 853–862
- Fukuda H, Komamine A (1982) Lignin synthesis and its related enzymes as markers of  
tracheary-element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia  
elegans*. Planta 155: 423–430
- M. Gajhede, Plant peroxidases: substrate complexes with mechanistic implications, Biochem.  
Soc. Trans. 29 (2001) 91–99.
- Gibson DM, Liu EH (1978) Substrate specificities of peroxidase isozymes in the developing  
pea seedling. Ann Bot 42: 1075–1083
- Gülçin İ, Yıldırım A (2005). Purification and characterization of peroxidase from Brassica  
oleracea var. Acephala. Asian J. Chem. 17: 2175-2183.
- Hermelinda PFM, Cibele MCPG<sub>2</sub>, Marcos T, Marcus S, Sergio M, Gláucia MP (2007).  
Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from  
*copaifera langsdorffii* leaves. Quim. Nova 30: 1067-1071
- S. Johri, U. Jamwal, S. Rasool, A. Kumar, V. Verma, G.N. Qazi Purification and  
characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability  
to oxidize IAA Plant Science 169 (2005) 1014–1021

- Jones P, Roles of water in heme peroxidase and catalase mechanisms, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 13791–13796.
- R. Kader, M. Irmoulj, J.P. Nicolas, M. Metche, Involvement of blueberry peroxidases in the mechanism of anthocyanin degradation in blueberry juice, *J. Food Sci.* 67 (2002) 911–915.
- Kay LE, Basile DV (1987) Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol* 84: 99–105
- Keleş F (1986). Gıda ilemede peroxidazlar (In Turkish). *Gıda*, 11: 117-123.
- Kim SS, Lee DJ (2005). Purification and characterization of a cationic peroxidase Cs in *Raphanus sativus*. *Journal of Plant Physiology* 162: 609-617
- Köksal E, Gülçin İ (2008). Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L.) buds. *Protein Peptide Lett.* 15(4): 320-326.
- Köksal, K. (2011). Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*): Partial purification and some biochemical properties. *International Journal of Pharmacology* 7: 135-139.
- Kwak SS, Kim SK, Park IH, Liu JR (1996). Enhancement of peroxidase activity by stress related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43: 565-568.
- Kwak SS, Kim SK, Park IH, Liu JR (1996). Enhancement of peroxidase activity by stress related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43: 565-568.
- Riquelme A, Cardemil L (1993) Peroxidases in the cell walls of seeds and seedlings of *Araucaria araucana*. *Phytochemistry* 32: 15–20
- Sang-Soo Kwak,\* Soo-Kyung Kim,\* T Moon-Soon Lee,\* Kyung-Hee Jung,\* Il-Hyun Parkt and Jang-Ryol Liu\*. acidic peroxidases from suspension-cultures of sweet potato. *Phytochemistry*, Vol. 39, No. 5, pp. 981 984, 1995

- Singh J., Dubey A., Diwakar S. K., Rawat S. K., Batra N, and. Joshi A (2010). Biochemical Characterization of Peroxidases from the Fruits of *Mallus pumilus*. International Research Journal of Biotechnology (ISSN: 2141-5153) Vol. 1(4) pp.050-058, November, 2010
- Lee MY, Kim SS (1994). Characteristics of 6 isoperoxidases from Korean radish root. *Phytochemistry*. 35:287-90.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farrar L, Randall RJ (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*.193:265-275.
- Maldonado BA, van Huystee RB (1980) Isolation of a cationic peroxidase from cultured peanut cells. *Can J Bot* 58: 2280–2284
- Markkola AM, Ohtonen R, Tarvainen O (1990) Peroxidase activity as an indicator of pollution stress in the fine roots of *Pinus sylvestris*. *Water Air Soil Pollut* 52: 149–156
- Ohya T, Morimura Y, Saji H, Mihara T, Ikawa T. (1997) Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish . *Plant science* 125: 137-145 (23 ref.)
- Spanu P, Bonfante-Fasolo P (1988) Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol* 109: 119–124
- Srivastava OmP, van Huystee RB (1977) IAA oxidase and polyphenol oxidase activities of peanut peroxidase isozymes. *Phytochemistry* 16: 1527–1530
- Torres F, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R (1997). Bio-catalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in media containing organic solvents. *Wat. Sci. Technol*. 36: 37-44
- van Huystee, R. B.; *Ann. Rev. Plant Physiol*. **1987**, 38, 205.
- van Huystee RB, Zheng X (1995) Peanut peroxidase, its location and extensin, coniferyl oxidation. *Plant Physiol Biochem* 33: 55–60
- Whitmore FW (1978) Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus.

Wang SY, Gong YS, Zhou JJ (2008). Chromatographic Isolation and Characterization of a Novel Peroxidase from Large Lima Legumes. *J. Food Science*.74(3): 193-198.

Zia MA, Kousar M, Ahmed I, Iqbal HMN and Abbas RZ. (2011). Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(33), pp. 6300-6303, 6 July, 2011

Table 1. Purification of POX1 and POX2 from Burkina potato

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units/mg)	Purification factor	Yield (%)
Crude extract	1019,97	41100,23	40,29	1	100
Ammonium sulfate	443,78	34330.18	77,36	1,92	83,53
Sephacryl-S100 HR	99,22	2225,17	157,14	3,90	37,93
DEAE-Sepharose CL-6B	9,05	7500.34	828,77	20,57	18,25

Table 2: Effect of metal ions on POX activities. Enzymatic activity was assayed with guaiacol as substrate.

<b>Agents chimiques</b>	<b>Relative activity (%),5 mM</b>
<b>Ba<sup>2+</sup></b>	146,69
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	102,49
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	140,49
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	105,78
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	147,52
<b>K<sup>+</sup></b>	25,20
<b>Na<sup>2+</sup></b>	64,46
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	27,27
<b>EDTA</b>	15,70

Table 3. Effect of detergents reducing agents and other compounds on POX activities.

Enzymatic activity was assayed with guaiacol as substrate.

<b>Agents réducteurs</b>	<b>Relative activity (%)</b>
<b>sodium disulfite</b>	7,43
<b>ascorbic acid</b>	00
<b>sodium thiosulfate</b>	00
<b>PCMB</b>	59,29
<b>sodium azide</b>	00
<b>citric Acid</b>	00
<b>SDS</b>	33,05
<b>Polyéthylène glycol</b>	556,61



Table 4: Substrate specificity of the purified POXs of Burkina radish

<b>Phenolic compound</b>	<b>Relative activity (%)</b>
<b>ABTS</b>	73,28
<b>Gaiacol</b>	100
<b>4-hydroxybenzoic Acid</b>	22 ,19
<b>ferulic Acid</b>	10,99
<b>gallic Acid</b>	28,79
<b>para-coumaric Acid</b>	2,93
<b>4-methoxyphenol Acid</b>	32,56
<b>syringic Acid</b>	6,23
<b>1-Naphtol</b>	27,10
<b>Phloroglucinol</b>	3,29
<b>1,4-Tyrosol</b>	3,66
<b>caffeine</b>	2,19
<b>vanillin</b>	5,13
<b>4-hydroxyphenylacetic Acid</b>	2,19
<b>pyrogallol</b>	62,34
<b>catechol</b>	57,69
<b>dopamine</b>	35,49
<b>tannic acid</b>	0,00

## Figure and captions

**Fig. 1.** Purification of POX from Burkina rpotato. (A) Gel filtration on Sephacryl S-200 HR column. (B) Anion exchange chromatography on DEAE-Sepharose CL-6B column. For further details, see “Matérials and methods.

**Fig. 2.** SDS-PAGE of purified POX from Burkina potato. Lane A, molecular weight markers (values in kDa). Lane B, purified POXp. Proteins were stained by silver nitrate.

**Fig. 3.** The effect of pH on the enzyme activity. Activities were determined by measuring the oxidation of the guaiacol in a series of buffers at various pH values ranging from pH 2,6 to 10,0.

**Fig.4.** The pH stability of POXp. POXp activity was carried with guaiacol as substrate, after 2h preincubation at 25°C in series of buffers at various pH values ranging from pH 2,6 to 10,0.

**Fig. 5.** Effect of temperature on the POXp. POXp activities were determinate at the indicated temperature in 100 mM citrate-phosphate buffer pH 6.0 using guaiacol as substrate under the standard test conditions.

**Fig. 6.** Thermal denaturation of POXp. The enzyme was maintained for 10 min at the indicated temperatures in 100 mM citrate-phosphate buffer (pH 6.0). The residual activity was then measured at 25°C under the standard assay conditions.

Fig. 1

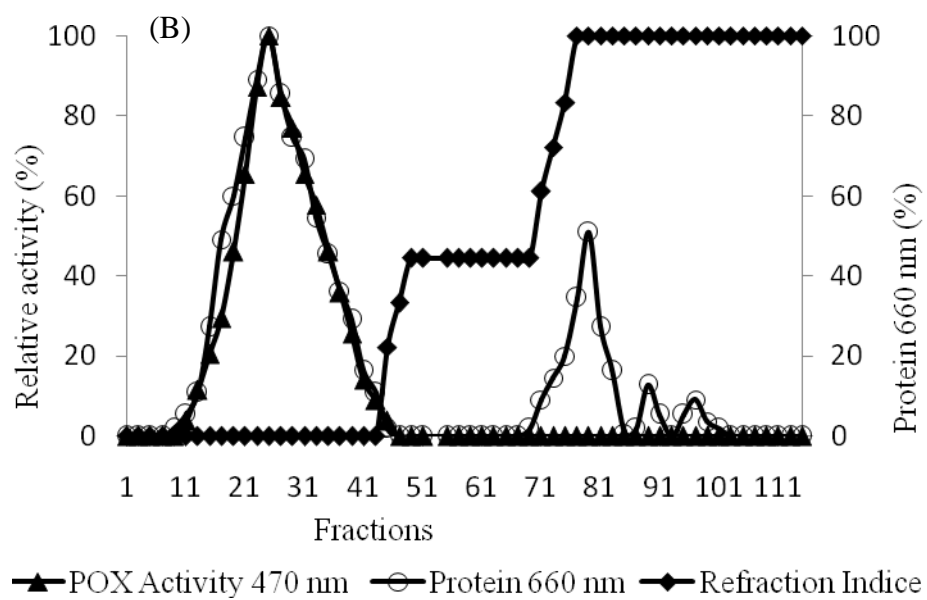
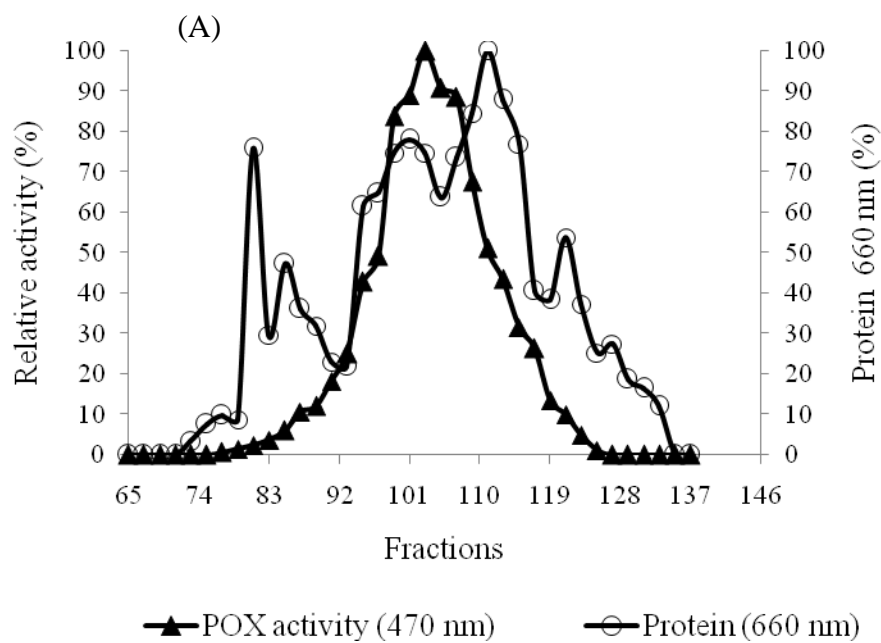


Fig.2.

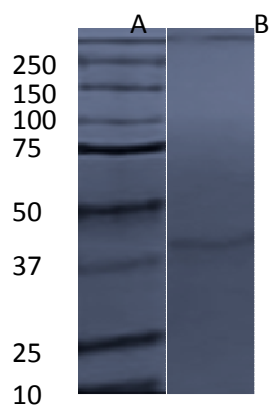


Fig.3

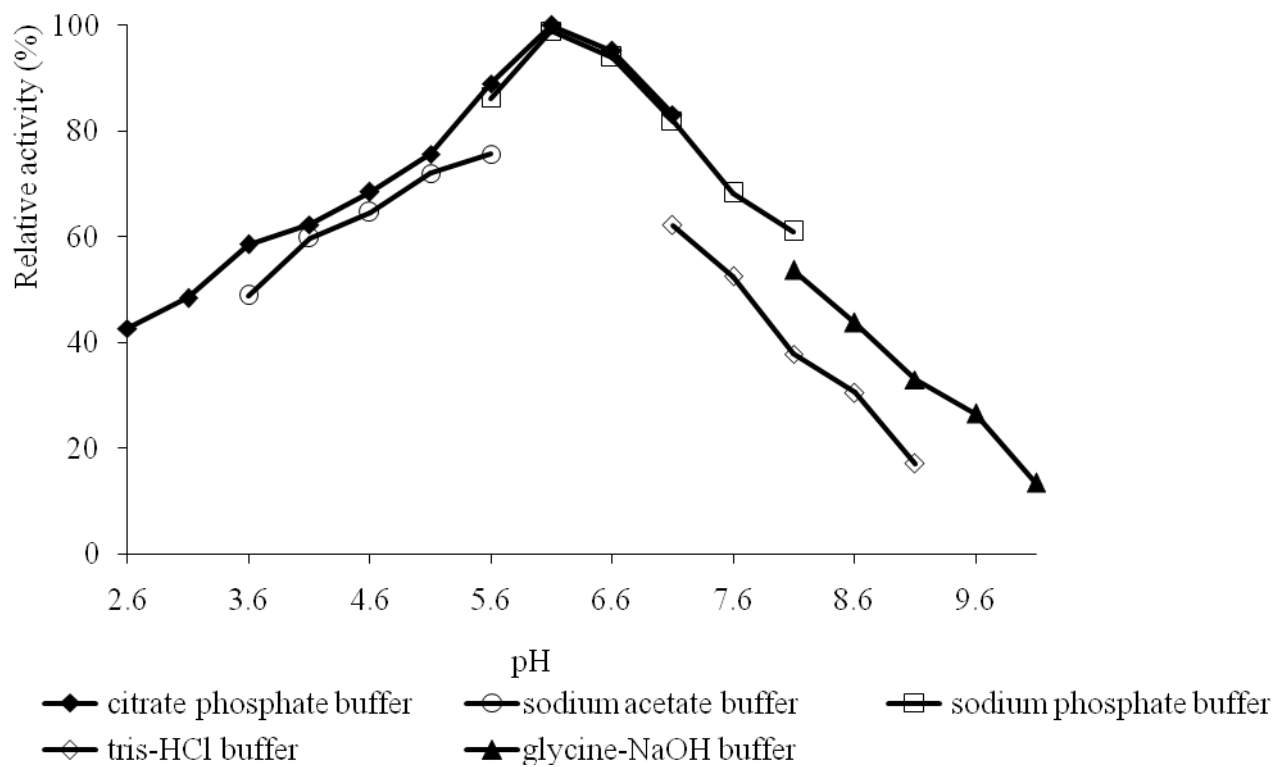


Fig. 4

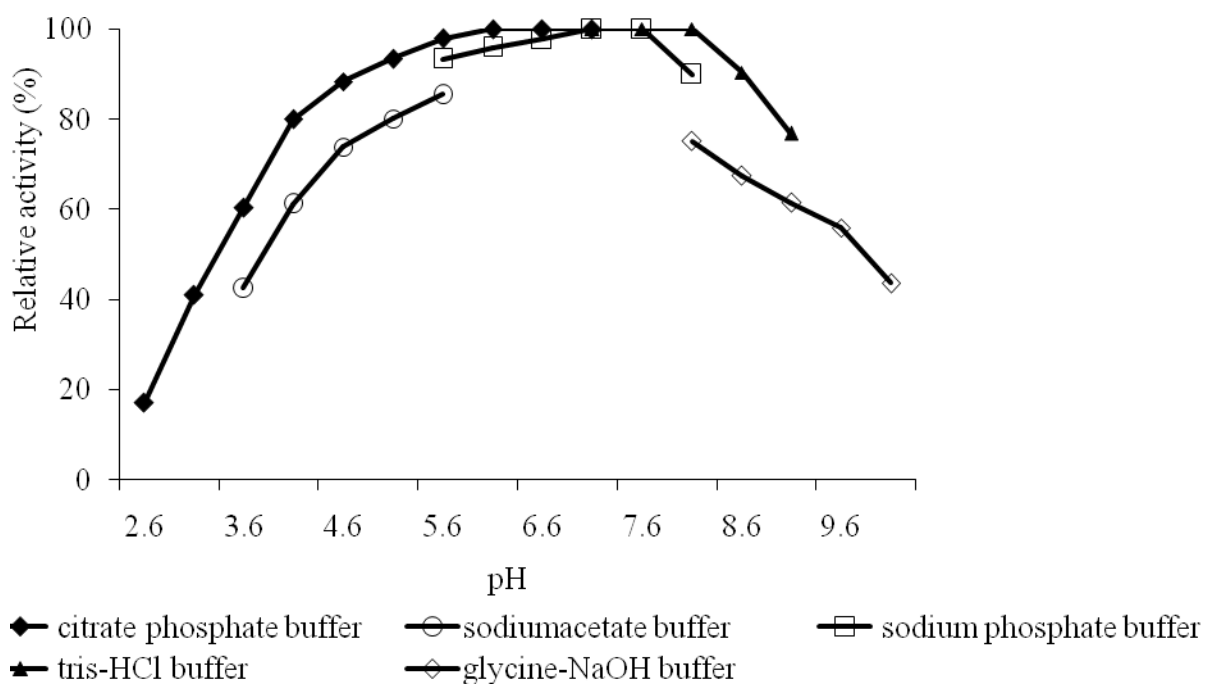


Fig.5

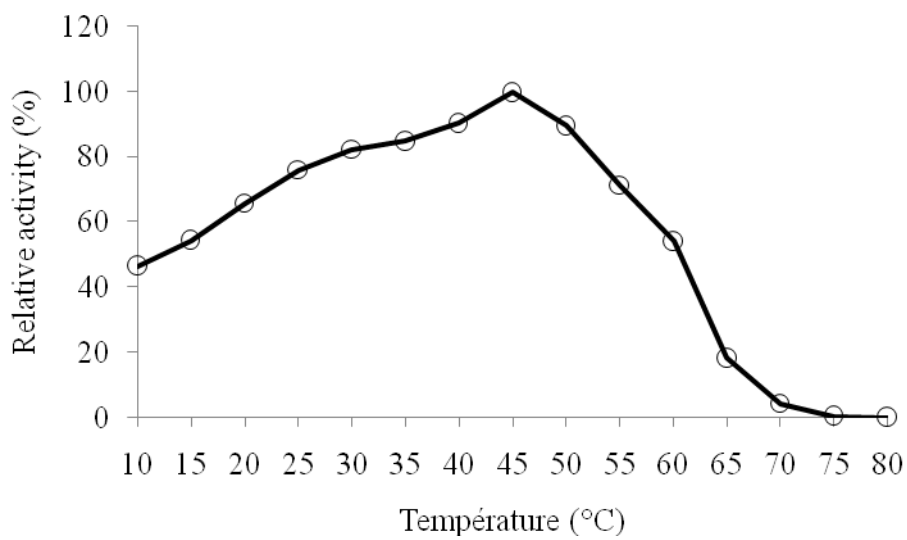


Fig.6

