

OPTIMISATION DU BIOCAPTEUR DE TYPE SERIGRAPHIE A BASE DE TYROSINASE POUR LA DETECTION DE DERIVES PHENOLIQUES

V. Dragancea

Université de Nantes, France

INTRODUCTION

Le terme «phénol» regroupe un ensemble de molécules hydroxylées substituées, dérivées du benzène (phénols simples) et de ses homologues supérieurs (crésols) et de molécules à noyaux polycondensés (naphtols et naphtols sulfonés). Depuis longtemps avec l'apparition de différents modes de conservation comme la congélation ou l'irradiation, le fumage est devenu une technique de valorisation des produits.

Lors du fumage, la fumée se dépose sur le produit. La composition chimique de la fumée est très variable selon la température et la quantité d'air présente lors de la pyrolyse. On y trouve des phénols, des alcools, des acides organiques, des composés carbonylés et des hydrocarbures, etc. Ces composés de la fumée réagissent avec les composants de l'aliment. Certains composés sont cancérigènes, principalement les 3-4 benzopyrène. D'autres hydrocarbures polycycliques aromatiques contenus dans la fumée sont également dangereux.

Les composés phénoliques sont étudiés en raison de leur propriété antioxydants et sont plus utilisés dans la fabrication de résines, des polymères et des produits pharmaceutiques [1]. Cependant, le coût élevé et les temps de rotation lents des méthodes photométriques et chromatographiques conventionnelles [2] indiquent un besoin de techniques analytiques plus rapides. Pour répondre à ce besoin, un système à base de détecteur simple d'utilisation, peu coûteux, jetable (accessible) et fortement sensible aux phénols, devient de plus en plus important dans l'analyse environnementale et les produits agroalimentaires [3].

La détermination quantitative des concentrations en composés phénoliques est donc indispensable pour le maintien de la qualité organoleptique de nombreux produits alimentaires fumés et le respect des différentes législations sur la qualité des produits agroalimentaires.

1. DOSAGE ELECTROENZYMATIQUE DU PHENOL

1.1. Un biocapteur enzymatique de troisième génération

L'immobilisation de l'élément biologique, en particulier celle des enzymes, sur la surface

d'électrode est un aspect important et nécessaire à une détection sélective des composés phénoliques. Les enzymes peuvent être immobilisées par des méthodes chimiques et/ou physiques. Le choix de la technique d'immobilisation dépend du type d'élément biologique utilisé (enzyme, cellule entière...), du transducteur et de l'environnement dans lequel le biocapteur fonctionne.

La réticulation consiste, à l'aide d'un agent réticulant, à créer des liaisons chimiques qui renforcent la cohésion de la membrane. Nous avons choisi d'utiliser une électrode de type sérigraphié à base de carbone. Il s'agit d'une configuration comportant l'électrode de travail dont la surface est modifiée par une préparation de tyrosinase permettant ainsi de conférer à la surface une sélectivité vis-à-vis de la détection de certains dérivés phénoliques. A côté de l'électrode de travail, l'électrode de référence a été sérigraphiée en utilisant une encre à base d'un mélange d'argent et de chlorure d'argent. Un système électrochimique à trois électrodes est alors obtenu en rajoutant l'électrode auxiliaire. Les trois électrodes sont sérigraphiées séparément sur un support en alumine.

1.2. Principe du biocapteur à tyrosinase

La tyrosinase (Tyr, polyphénol oxydase ou monophénol mono-oxygénase), est une métalloprotéine formée de 4 sous-unités monomères [4]. Le site actif de la Tyr peut être dans trois états d'oxydation (fig.1) : E_{met} pour la forme "metoxy", lorsque les atomes d'oxygène sont liés aux atomes de cuivre mais plus entre eux, E_{oxy} pour la forme "oxy", lorsque les atomes d'oxygènes sont liés entre eux et aux atomes de cuivre, et E_{deoxy} pour la forme "deoxy" lorsque le site actif n'est pas lié à l'oxygène [5,6,7]. Ces trois formes interviennent dans tous les mécanismes moléculaires relatifs aux activités de divers substrats. Ainsi toutes les interactions enzyme/substrat ont lieu sur ces sites actifs.

Les biocapteurs ampérométriques basés sur l'immobilisation de la Tyr permettent la détection des dérivés monophénoliques et o-diphénoliques. Le fonctionnement du biocapteur est basé sur la mesure du courant de réduction de l'ortho - quinone enzymatique générée au potentiel 0V /Ag/AgCl. La réponse ampérométrique de l'électrode est directement liée à la concentration en substrat dans

la solution. Le principe de détection du biocapteur est montré par la figure 1.

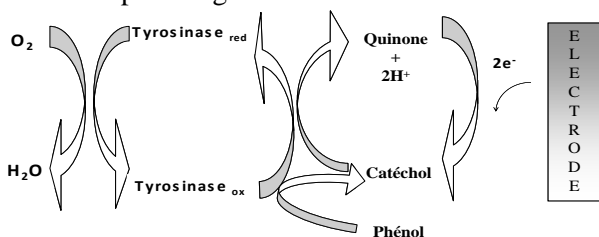


Figure 1. Représentation schématique du fonctionnement du biocapteur à tyrosinase.

2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans l'objectif de trouver une meilleure composition de la membrane utilisée et d'augmenter les performances analytiques du biocapteur en termes de sensibilité et de répétabilité, nous avons utilisé un plan d'expériences [7] qui permet d'étudier l'influence de différents paramètres physico-chimiques mais aussi leurs interactions sur les performances analytiques du biocapteur. Pour notre étude nous avons appliqué les plans d'expériences factoriels complets à trois facteurs et deux niveaux (notés respectivement + et -). Le nombre d'expériences à réaliser est alors de $2^3 = 8$.

Les propriétés analytiques d'un biocapteur sont évaluées en termes de sensibilité, de linéarité et de stabilité opérationnelle. On a démontré que le meilleur compromis entre eux c'est le mélange de trois composés : la tyrosinase 5mg/ml dans l'eau distillée ; le Paa - poly (allylamine), 0,05% dans l'eau distillée ; la Glutaraldéhyde (Glut), 0,0125% dans l'eau distillée.

L'ortho-quinone produit par la réaction enzymatique est un composé qui peut être réduit électrochimiquement en ortho-diphénol correspondant. Le courant de réduction maximal se situe à un potentiel $E = -0.3V$, tandis qu'à 0 V/Ag/AgCl, on minimise les réactions de réductions électrochimique de l'oxygène (fig.2).

La cinétique d'une réaction enzymatique est

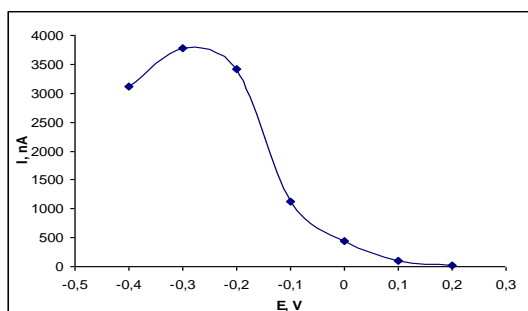


Figure 2. Influence du potentiel de mesure sur la réponse de biocapteur Tyr/Paa/Glut. toujours dépendante de la valeur du pH dans l'environnement de l'enzyme. La variation de

l'intensité du courant en fonction du pH du milieu réactionnelle présente une forme caractéristique en cloche. La réponse ampérométrique optimale a été enregistrée pour un pH de 6.0. Le signal du biocapteur est influencé par le taux de méthanol dans la solution. Les meilleurs niveaux de stabilité ont été obtenus pour les électrodes stockées à la température ambiante et à 30°C. Les électrodes conservent l'activité pendant plusieurs jours (25 jours).

3. CONCLUSIONS

Dans cette étude un biocapteur sérigraphié modifié par la tyrosinase pour la détection des dérivés phénoliques a été conçu. L'enzyme est immobilisée à l'aide d'un film ultra fin obtenu par co-réticulation avec un agent de pontage.

La composition de l'électrode Tyr/Paa/ Glut a été optimisée afin d'obtenir un compromis entre sensibilité et linéarité. La limite de détection est inférieure à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la sensibilité est d'environ $25 \text{ nA} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ et la réponse est linéaire sur une gamme de concentrations comprise entre 10 et $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Les réponses ampérométriques obtenues ont été étudiées en fonction de divers paramètres expérimentaux. Les propriétés analytiques de l'électrode modifiée ont été validées par différents tests statistiques.

Références bibliographiques

1. **Manahan, S.E.**, 1991. *Environmental Chemistry*. Lewis Publishers, Inc, Chelsea, USA.
2. **Janda, V., Krijt, K.**, 1984. *Recovery of phenols from water by continuous steam distillation extraction*. J. Chromatogr. 283, 309-314.
3. **Onnerfjord P., Emnus J., Marko-Varga G., Gorton Lo, Ortega F. et Dominguez E.**, Tyrosinase graphite-epoxy based composite electrodes for detection of phenols. Biosensors & Bioelectronics 10 (1995) 607-619.
4. **Klabunde T., Eicken Ch., Sacchettini J. C. and Krebs B.**, Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. 1998 Nature America Inc.
5. **Lerch, K.**, 1995. Tyrosinase : molecular and active-site structure. In: *Enzymatic browning and its prevention*. C.Y.Lee and J.R.Whitaker. Washington, USA, American Chemical Society. 64-80.
6. **Solomon E. I., Sundaram U. M. and Machonkin T. E.**, 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. Chem. Rev., 96, (7), 2563-2605.
7. **Eicken, C., Krebs, B. and Sacchettini, J. C.**, 1999. Catechol oxidase - structure and activity. Curr. Opin. Struc. Biol., 9, (6), 677-683.

Recomandat spre publicare : 03.09.2009.