

## BIOCAPTEUR POUR LA DÉTECTION DE DÉRIVÉS PHÉNOLIQUES DES PRODUITS FUMÉS

### BIOSENZOR PENTRU DETECȚIA DERIVAȚILOR FENOLICI ÎN PRODUSELE AFUMATE

**DRAGANCEA Veronica<sup>1\*</sup>, STURZA Rodica<sup>1</sup>, PATRAȘ Antoanela<sup>2</sup>**

\*Auteur correspondant e-mail: rodica.sturza@chim.utm.md,

**Résumé.** Une électrode enzymatique de type sérigraphie modifiée par la tyrosinase a été mise au point. Cette électrode a été optimisée pour fonctionner en mode FIA (Analyse par Injection en Flux). Le but de ce travail est la détermination quantitative des concentrations en composés phénoliques, pour le maintien de la qualité organoleptique de nombreux produits alimentaires fumés et le respect de législation visant l'innocuité des denrées.

**Mots clés:** phénol, tyrosinase, produits fumés, biocapteur, sérigraphie

**Rezumat.** Un electrod enzimatic de tip serigrafat, modificat cu tirozinaza a fost elaborat pentru analiza anumitor compuși fenolici. Electroful obținut a fost optimizat și testat prin metoda de analiză în flux continuu. Obiectivul principal al acestei lucrări este determinarea cantitativă a unor compuși fenolici pentru menținerea calității organoleptice a produselor alimentare afumate și respectarea legislației privind siguranța alimentară.

**Cuvinte cheie:** fenol, tirozinaza, produse afumate, biosenzor, serigrafie

## INTRODUCTION

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Le plus souvent, ils sont étudiés en raison de leurs propriétés antioxydantes et anticarcinogènes. Les phénols sont probablement les composés organiques le plus souvent associés aux problèmes organoleptiques; ils provoquent des problèmes de goût et d'odeur à des concentrations aussi faibles que 1 µg/L (Onnerfjord *et al.*, 1995).

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 présent lors de la pyrolyse. On y trouve des phénols, des alcools, des acides organiques, des composés carbonylés et des hydrocarbures. Certains composés sont cancérigènes, principalement les 3-4 benzopyrène (Knockaert, 1990). D'autres hydrocarbures aromatiques contenus dans la fumée sont également dangereux. Les composés phénoliques présents dans les aliments fumés font partie des produits apportés par le fumage. La détermination quantitative des concentrations

---

<sup>1</sup>Université Technique de Moldova, Chișinău, République de Moldova

<sup>2</sup>Université des Sciences Agricoles et de Médecine Vétérinaire Iasi, Roumanie

en composés phénoliques est donc indispensable pour le maintien de la qualité organoleptique de nombreux produits alimentaires fumés et le respect de législation visant l'innocuité des denrées.

Le dosage des dérivés phénoliques est souvent réalisé par la chromatographie liquide d'haute performance (CLHP), chromatographie en phase gazeuse (CPG), spectrométrie de masse et calorimétrie. Cependant, malgré les performances reconnues pour ces méthodes, certains facteurs limitent leur utilisation en routine tels que le coût de l'analyse et la préparation des échantillons à analyser qui constitue toujours une phase très laborieuse (Rodriguez-Lopez *et al.*, 2001). A même temps ces techniques présentent l'inconvénient d'être difficilement "implantables" dans les sites de production. Les biocapteurs et les capteurs pourraient constituer donc une méthode alternative, rapide et très prometteuse pour les dosages en routine de composés phénoliques dans les produits fumés dans les sites industriels (Nikoleli *et al.*, 2018).

## MATÉRIAUX ET MÉTHODES

### Réactifs

Les produits chimiques utilisés sont : phénol, glutaraldéhyde (SIGMA). p-crésol, m-crésol, gaïacol, crésol, eugénol, 4-ethylguaicol (ACROS), syringol, o-crésol (ALDRICH), isoeugénol (LANCASTER), 4-propylguaicol de SAFC, diclorophénol, tyrosinase (E.C.1.14.18.1, approximativement 3216 U/mg) de Fluka, poly (allylaminehydrochloride) de Alfa Aesar. Le stock des solutions standard de composés phénoliques a été préparé dans méthanol pour CLHP (PROLABO).

### Méthodes et équipements

#### FIA -l'analyse par injection en flux continu

Le dispositif expérimental utilisé durant cette étude pour l'analyse par injection en flux continu est constitué d'une pompe péristaltique multicanaux (Ismatec) permettant un réglage du débit volumique, d'une valve d'injection six voies (Rhéodyne) munie d'une boucle d'injection de volume égal à 100  $\mu$ L, d'un potentiomètre (BAS CV-1B), d'un enregistreur  $i=f(t)$  (Linseis L200E) et d'une cellule électrochimique de détection de type wall-jet fabriquée au laboratoire. L'analyse par injection en flux continu a été utilisée pour tester le biocapteur en termes de sensibilité, stabilité, répétitivité et linéarité.

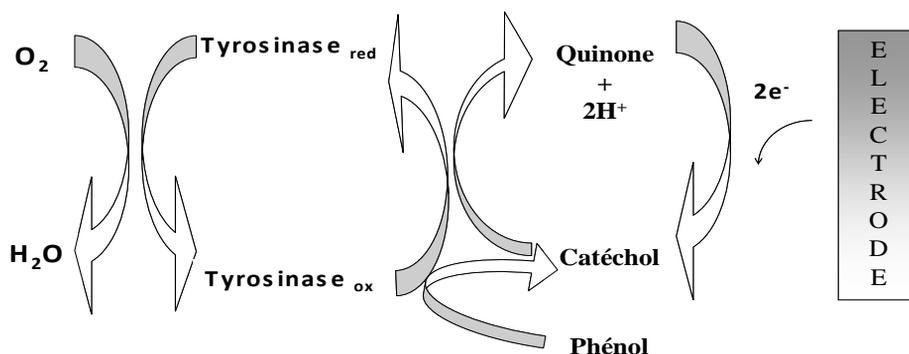
#### CPG -chromatographie en phase gazeuse

Le système chromatographique est représenté par un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard HP 6891, l'échantillon est injecté manuellement à l'aide d'une microsiringue à 1  $\mu$ l et d'un détecteur à ionisations de flamme (FID). Le mode d'injection est un mode « splitless », la colonne utilisée est une colonne HP5. L'analyse a été effectuée en chromatographie de partage (gaz / liquide). La température du détecteur est 260°C, celle de l'injecteur: 290°C. La réponse du détecteur est enregistrée à l'aide du logiciel HP ChemStations.

## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les travaux les plus récents se sont intéressés à la fabrication de biocapteurs de type sérigraphiés permettant d'effectuer le dosage des composés phénoliques.

Les biocapteurs ampérométriques basés sur l'immobilisation de la tyrosinase permettent la détection des dérivés monophénoliques et o-diphénoliques. Le fonctionnement du biocapteur modifié par la tyrosinase pour la détection de phénol est représenté dans fig.1.



**Fig. 1** Représentation schématique du fonctionnement du biocapteur modifié par la tyrosinase pour la détection des phénols

L'oxydation du phénol par la tyrosinase se fait dans deux étapes avec la formation du catéchol comme espèce intermédiaire, lors de cette oxydation la tyrosinase est réduite à la forme active de tyrosinase. La tyrosinase sous la forme oxydée est régénérée à son tour par l'oxygène présente dans la solution.

Ensuite l'o-quinone est électrochimiquement réduite en catéchol qui génère un courant catalytique dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de phénol présent dans la solution.

Les biocapteurs de type sérigraphie à base de tyrosinase sont obtenus dans le cadre de notre travail, après la fonctionnalisation de l'électrode sérigraphie par la modification de la surface de l'électrode de travail avec une membrane qui contient tyrosinase, poly (allylamine), et glutaraldéhyde.

Pour trouver une composition optimale de la membrane utilisée et augmenter les performances analytiques du biocapteur en termes de sensibilité et de stabilité opérationnelle, nous avons utilisé un plan d'expériences. Nous avons varié les facteurs suivant: la tyrosinase, la polyallylamine et la glutaraldéhyde, qui semblent en mesure d'avoir un effet sur la réponse du biocapteur (tab. 1).

Les niveaux bas noté par '-' et haut noté par '+' choisis pour construire ce plan d'expérience s'appuient sur différents travaux préliminaires et sur les résultats obtenus précédemment pour des électrodes déjà testées dans le laboratoire.

Tableau 1

## Choix des paramètres à étudier

No	Facteur	Niveau bas (-1)	Niveau haut (+1)
1	Tyrosinase (Tyr), mg/ml	2,5	5,0
2	Polyallylamine (Paa),%	0,025	0,05
3	Glutaraldehyde (Glut), %	0,0125	0,025

L'organisation des manipulations à réaliser pour un plan complet  $2^3$  est résumée dans le tableau 2.

Tableau 2

## Matrice d'un plan factoriel complet à trois facteurs et deux niveaux

Expérience	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Réponse
1	-	-	-	$y_1$
2	+	-	-	$y_2$
3	-	+	-	$y_3$
4	+	+	-	$y_4$
5	-	-	+	$y_5$
6	+	-	+	$y_6$
7	-	+	+	$y_7$
8	+	+	+	$y_8$
<b>Effet</b>	<b>E<sub>1</sub></b>	<b>E<sub>2</sub></b>	<b>E<sub>3</sub></b>	

Pour résoudre le plan d'expériences, on procède au calcul des effets de chaque facteur et des interactions sur chaque réponse (sensibilité, stabilité opérationnelle).

Les valeurs des effets s'obtiennent par le calcul. Si l'effet calculé (ou l'interaction) est du même ordre de grandeur que son erreur, il peut influencer ou pas la réponse. Pour qu'un effet soit considéré significatif ou non, il est nécessaire de le comparer à l'écart type sur les effets, noté  $\sigma_E$ .

L'écart type sur les effets,  $\sigma_E$ , peut enfin être obtenu à partir de la formule suivante:

$$\sigma_E = \sqrt{\frac{1}{16} \sum_{i=1}^8 y_i^2}$$

Ainsi huit types des électrodes sont prévus et testées. Selon les résultats obtenus, on a résumés les effets des facteurs choisi comme suit:

- l'augmentation de la quantité de tyrosinase utilisée influence de façon notable la sensibilité de l'électrode;
- l'augmentation du taux de Paa dans la membrane induit une augmentation de la stabilité opérationnelle du biocapteur;

- l'augmentation simultanée du taux de Paa et de celui de la tyrosinase permet d'améliorer la répétabilité des mesures;
- la diminution du taux de Glut permet d'améliorer la linéarité de l'électrode modifiée ainsi que la stabilité opérationnelle.

Compte tenu des résultats de plans d'expérience, nous avons choisi de modifier les électrodes à partir du mélange correspondant à l'essai 4 dans la matrice du plan d'expériences: la tyrosinase 5mg/ml (équivalent à 16 unités), la polyallylamine (Paa) 0,05%, la glutaraldéhyde (Glut) 0,0125%.

Cette composition donne un meilleur compromis entre la sensibilité et la stabilité opérationnelle. Les électrodes modifiées sont préparées en déposant manuellement sur l'électrode de travail une solution constituée de ces trois composés mélangés en volumes équivalents (50 $\mu$ L).

L'utilisation de l'électrode modifiée avec la tyrosinase pour la détection du phénol a nécessité la recherche des conditions optimales d'analyse. Nous avons étudié l'influence du potentiel, du pH et du solvant organique sur la réponse du biocapteur. La limite de détection est inférieure à 10  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>, la sensibilité est d'environ de 25 nA. $\mu$ mol<sup>-1</sup>.L et la réponse est linéaire sur une gamme de concentrations comprise entre 10 et 150  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>.Le biocapteur obtenu fonctionne en AIFC à 0 V vs. Ag/AgCl et présente des propriétés analytiques satisfaisantes.Ce travail a permis ensuite l'application du biocapteur à la détection des composés phénoliques dans des produits fumés.

En même temps, pour valider les résultats obtenus avec le biocapteur pour le dosage des composés phénoliques dans les produits fumés, nous avons analysé les enchantions avec la chromatographie en phase gazeuse. Dans le tableau 3, les résultats sont les moyennes de trois déterminations successives.

Tableau 3

**Comparaison des teneurs en phénol et p-crésol obtenus avec le biocapteur en mode FIA et par chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

Produits analysés	FIA, C, $\mu$ mol/ L	CPG C, $\mu$ mol/ L
Jambon fumé	Phénol + p-crésol : <b>44.44 <math>\pm</math> 1.09</b>	Phénol : 40.23 $\pm$ 1.38 p-crésol : 4.87 $\pm$ 0.42 Total : <b>45.10 <math>\pm</math> 1.8</b>
Bacon fumé	Phénol + p-crésol : <b>39.10 <math>\pm</math> 0.99</b>	Phénol : 36.68 $\pm$ 7.31 p-crésol : 2.32 $\pm$ 0.39 total : <b>39.00 <math>\pm</math> 7.70</b>
Filet de poulet fumé	Phénol + p-crésol : <b>41.40 <math>\pm</math> 2.35</b>	Phénol : 35.13 $\pm$ 1.12 p-crésol : 17.21 $\pm$ 1.73 total : <b>52.34 <math>\pm</math> 2.85</b>
Saumon fumé	Phénol + p-crésol : <b>37.07 <math>\pm</math> 1.86</b>	Phénol : 30.76 $\pm$ 0.86 p-crésol : 7.50 $\pm$ 1.34 total : <b>38.26 <math>\pm</math> 2.20</b>

Nous avons trouvé pour les taux de dérivés phénoliques dans les produits fumés une bonne corrélation entre les résultats obtenus en chromatographie en phase gazeuse et par le biocapteur en analyse en flux continu. On peut affirmer donc, que la méthode ampérométrique en utilisant le biocapteur à tyrosinase est juste.

## CONCLUSIONS

1. Nous avons mis au point un biocapteur simple pour la détection du phénol.
2. On a optimisé la composition de l'électrode pour améliorer les performances analytiques (sensibilité et stabilité) du biocapteur final.
3. L'électrode Tyr/Paa/Glut peut être utilisée pour déterminer les faibles concentrations en phénol dans des échantillons réels, tels que le jambon; le bacon le poulet et le saumon fumé.

*Remerciements:* Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) - projet S0446 SAIN (2017 – 2019).

## RÉFÉRENCES

1. Knockaert C., 1990 - *Le fumage du poisson*, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, IFREMER, p40
2. Onnerfjord P., Emnus J., Marko-Varga G., Gorton Lo, Ortega F., Dominguez E., 1995 - *Tyrosinase graphite-epoxy based composite electrodes for detection of phenols*. Biosensors & Bioelectronics, 10, 607-619.
3. Rodriguez-Lopez J.N., Fenoll L.G., Penalver M.J., Garcia-Ruiz P.A., Varon R., Martinez-Ortiz F., Garcia-Canovas F., Tudela, J., 2001 - *Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of o-diphenol*. BBA-Protein Struct.M. 1548 (2), 238-256.
4. Nikoleli G.P., Nikolelis D.P., Siontorou C.G., Karapetis S., Varzakas T., 2018 - *Novel Biosensors for the Rapid Detection of Toxicants in Foods*. Adv Food Nutr Res. 2018;84:57-102. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.01.003. Epub 2018 Mar 7.

## BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF SMOKED PRODUCTS

*Abstract.* A tyrosinase modified serigraphy electrode has been developed. This electrode has been optimized to operate in FIA (Flux Injection Analysis) mode. The aim of this work is the quantitative determination of phenolic compounds concentration of some smoked food products, on the frame of the maintenance of organoleptic quality and the respect of food safety legislation.

**Key words:** phenol, tyrosinase, smoked products, biosensor, serigraphy