



(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 37351 A1** (51) Cl. internationale : **C12Q 1/00**

(43) Date de publication :
31.05.2016

(21) N° Dépôt :
37351

(22) Date de Dépôt :
11.09.2014

(71) Demandeur(s) :
**Université Abdelmalek Essaâdi - Tétouan, Avenue Palestine, M'hannech II B.P. 2117
- Tétouan (MA)**

(72) Inventeur(s) :
**Abdellatif Ben abdellah ; Abdelaziz BOUCHAIB ; Amine LAGLAOUI ; Mohamd
BEKKALI ; Amal MAURADY ; Abdelhay ARAKRAK ; Carlo CARBONI ; Benoit
GROSDIDIER**

(74) Mandataire :
Mohamed EL Harzli

(54) Titre : **biodetecteur pour la surveillance de l'infiltration d'oxygène, méthode pour la
fabrication du biodetecteur**

(57) Abrégé : La présente invention concerne un senseur colorimétrique d'oxygène dont le principe de fonctionnement est une réaction d'oxydation enzymatique. C'est un solide hydrogel sur lequel nous avons immobilisé la PPO et son substrat en absence d'oxygène. Le contact du senseur avec l'oxygène engendre l'oxydation du substrat, selon une réaction irréversible, en produisant des substances colorées comme illustré sur la figure -2-.

ABREGE

La présente invention concerne un senseur colorimétrique d'oxygène dont le principe de fonctionnement est une réaction d'oxydation enzymatique. C'est un solide hydrogel sur lequel nous avons immobilisé la PPO et son substrat en absence d'oxygène. Le contact du senseur avec l'oxygène engendre l'oxydation du substrat, selon une réaction irréversible, en produisant des substances colorées comme illustré sur la figure -2-.

**BIODETECTEUR POUR LA SURVEILLANCE DE L'INFILTRATION D'OXYGENE,
METHODE POUR LA FABRICATION DU BIODETECTEUR.****Etat de la technique**

- 5 Le problème de l'infiltration d'oxygène dans les emballages est une préoccupation majeure de plusieurs secteurs industrielle, agroalimentaire, pharmaceutique, médicale électronique..... Par exemple, un produit alimentaire ou médical emballé sous vide pourris suite à une infiltration accidentelle ou intentionnelle d'oxygène. Souvent cette détérioration des produits alimentaires passe inaperçue, ce qui peut représenter un réel danger pour le
- 10 consommateur.
Afin de remédier ce problème, plusieurs types de senseurs d'oxygène ont été conçus. Les plus courantes sont basés sur l'extinction de la luminescence de certaines substances convenables [1]. Ce sont des colorants dont les molécules sont excitées par la lumière ultra violette. Ces molécules se dés excitent en contact de l'oxygène provoquant ainsi un
- 15 changement de couleur du senseur [2]. D'autres systèmes sont à base de colorants dont les formes réducteur et oxydante ont des couleurs différentes. En contact de l'oxygène il y a transformation de la forme réductrice en forme oxydante indiquant ainsi la présence d'oxygène par changement de couleur [3].
- 20 Malgré leur efficacité à détecter l'oxygène, ces indicateurs souffrent de certains problèmes, ils sont réversibles, coûteux et présentent un problème de stockage. Mais leur inconvénient majeur est qu'ils sont constitués de substances chimiques qui peuvent avoir des effets néfastes pour la santé humaine. En effet, il y a actuellement tendance générale à supprimer tout ce qui est chimique des emballages alimentaires et une demande accrue pour les produits naturels.
- 25 Gardiol, et al [4,5] ont breveté un senseur enzymatique d'oxygène dans lequel ils ont utilisé la laccase et l'ascorbat-oxydase. Il se présente sous forme d'une solution aqueuse contenant l'acide ascorbique, la laccase et l'ascorbate oxydase. La solution a été encapsulée dans un sachet en polyéthylène basse densité pour permettre une bonne diffusion de l'oxygène. Au contact de l'oxygène la solution devient bleue. Ce senseur présente lui aussi un problème
- 30 de stockage puisqu'il s'agit d'un senseur liquide et souffre d'un temps de réponse très long de l'ordre de 24 heures

La polyphénoloxydase (PPO) est une enzyme largement répandue dans le règne végétal. C'est l'enzyme responsable du brunissement et de mûrissement des fruits et légumes. Il

35 catalyse l'oxydation des polyphénols par l'oxygène [6,7]. Les produits de cette oxydation se polymérisent pour donner des substances colorées brunes ou rouges. Le schéma de cette réaction est donné par la figure -1-.

L'action de la PPO peut se produire aussi bien en phase liquide que lorsqu'il est

40 immobilisé en phase solide. L'immobilisation de la PPO en phase solide ou gel a été largement étudiée [8, 9,10] et les études montrent que la PPO garde son activité lorsqu'il est immobilisé en phase solide. Nous avons profité de cette propriété pour concevoir le présent senseur d'oxygène.

45 Objet de l'invention

La présente invention concerne un senseur colorimétrique d'oxygène dont le principe de fonctionnement est une réaction d'oxydation enzymatique. C'est un solide hydrogel sur lequel nous avons immobilisé la PPO et son substrat en absence d'oxygène. Le contact du

50 senseur avec l'oxygène engendre l'oxydation du substrat, selon une réaction irréversible, en produisant des substances colorées comme illustré sur la figure -2-.

L'enzyme et son substrat sont immobilisés sur un hydrogel issu de produits naturels et sans aucun risque pour la santé humaine. L'hydrogel utilisé peut être préparé à partir de toute sorte de gomme ou gel naturels : gomme de tragacathe, gomme arabique, indubiose, agarose, agar-agar... L'enzyme utilisé est extraite de fruits et plantes locales, partiellement ou totalement purifiée. La liste des plantes sources d'enzyme que nous avons testé contient : cœur de palmier, pomme, banane, champignon de paris, coing et pomme de terre. Les produits utilisés comme substrat de l'enzyme peuvent être sélectionnés parmi la liste suivante :

- Les phénols simples,
- Les acides aminés, ,
- les acides organiques comme
- Les flavonoïdes et les tannins

La particularité de ce senseur, est d'une part, il est constitué de substances extraites de produits naturels qui ne présentent aucun risque pour la santé humaine, d'autre par le système se présente sous forme d'un solide hydrogel qui demeure stable et efficace même après plusieurs jours de stockage. Il est donc très pratique et facile à utiliser pour détecter une possible infiltration d'oxygène.

Méthode de préparation du biosenseur d'oxygène

A titre d'exemple, nous avons préparé un senseur d'oxygène contenant la PPO, que nous avons extrait du champignon de paris ou du cœur du palmier, un gel d'indubiose et l'un des substrats suivants : l'acide gallique ou l'acide chlorogénique. Le protocole de la préparation est le suivant :

- Préparer la solution d'enzyme de concentration minimale 1mg/ml
- Préparer la solution du substrat de concentration minimale égale a 2.10^{-2} mol/l dans une solution tampon de pH compris entre 6 et 7.5
- Préparer la solution d'indubiose de concentration comprise entre 2,5 et 10% ;
- Chauffer la solution d'indubiose jusqu'au moins 50°C pour obtenir le gel d'indubiose

Pour préparer l'indicateur, au moins un volume de la solution d'enzyme de concentration minimale 1mg/ml et au moins un volume de substrat de concentration minimale 2.10^{-2} mol/l sont mélangés à au moins 2 volumes de l'hydrogel liquide. Le mélange est mis sous vide dans un flacon imperméable à l'oxygène et se solidifie à la température ambiante

Suivie de l'évolution du senseur par spectrophotométrie

Une quantité du senseur est mit en contact de l'oxygène de l'air dans un cuve du spectrophotomètre. L'activité de la PPO dans l'hydrogel et par suite la vitesse initiale de la réaction d'oxydation ont été déterminées en suivant l'évolution de l'absorbance en fonction du temps. L'absorbance maximale des produits de la réaction d'oxydation se situe entre 420 et 480 nm. A titre d'exemple la figure-3- représente l'évolution de l'absorbance à 470 nm du senseur contenant la PPO du champignon de paris et l'acide gallique. Il s'agit bien de l'allure de l'évolution de l'absorbance d'un produit obtenu par une réaction enzymatique. Une variation importante de l'absorbance est obtenue au bout de 10 min. ce qui permet de dire que le senseur a un temps de réponse assez court. Ceci est confirmé par le suivie de l'évolution de la couleur du senseur au cours du temps.

Évolution de la couleur des senseurs

L'observation de la couleur des senseurs d'oxygène que nous avons élaboré montre qu'ils

50 sont translucides en absence d'oxygène. En les exposants à l'oxygène de l'air, ils changent de couleur et leur coloration est de plus en plus intense au cours du temps, figures 4, 5 et 6.

Effet de la durée du stockage sur la réponse du senseur

5 A titre d'exemple, nous avons stockée le senseur contenant la PPO du cœur de palmier et l'acide gallique en absence d'oxygène pendant un mois. Le senseur garde son aspect et ne subit aucun changement temps qu'il est à l'abri d'oxygène. Une fois il entre en contact avec l'oxygène de l'aire, il subit un changement de couleur observable au bout de vingt minutes, figure-8-.

Liste des figures :

- Figure 1 : Réaction d'oxydation enzymatique des polyphénols catalysée par la PPO ;
Figure 2 : schéma du principe du bio senseur enzymatique d'oxygène ;
10 Figure 3 : évolution de l'absorbance du senseur contenant la PPO du champignon de paris et l'acide gallique ;
Figure 4 : évolution de la couleur du senseur contenant la PPO du champignon de paris et l'acide chlorogénique ;
Figure 5 : évolution de la couleur du senseur contenant la PPO du cœur de palmier et
15 l'acide gallique ;
Figure 6 : évolution de la couleur senseur contenant la PPO du cœur de palmier et l'acide chlorogénique ;
Figure 7 : évolution de la couleur senseur contenant la PPO du cœur de palmier et l'acide
20 gallique suite au contact de l'oxygène après 1 mois de stockage.

Références

1. Klimant, O.S. Wolfbeis, Oxygen-sensitive luminescence materials based on silicone-soluble ruthenium diimine complexes, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3160–3166
- 2.. Baker N.R, Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008) 89–113.
3. Stefan W, Otto S. Wolfbeis. Irreversible sensing of oxygen ingress . *Sensors and Actuators B* 153 (2011) 199–204
4. Gardiol, A, E. Hernandez, R, J. Reinhammar, B. Harte, B, R. Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase Enzyme and *Microbial Technology* , Volume 18 (5) Elsevier – Apr 1, 1996.
5. Gardiol, A, E. Hernandez, R, J. Reinhammar, B. Harte, B, R. Device for reducing oxygen with a reduced oxidase with color formation. Patent Number 5,654,164. Date of Patent: Aug. 5, 1997
6. Martinez V,M, Whitaker J,R. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Tech.* 6: 195-200 (1995)
7. Sanchez-Ferrer A. Rodriguez-Lopez JN. Garcia Canovas F. Garcia- Carmona F. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1247: 1-11 (1995)
8. Vilanova E. Manjon A. Iborra JL. Tyrosine hydroxylase activity of immobilized tyrosinase on Enzacryl-AA and CPG-AA supports: stabilization and properties. *Biotchnol Bioeng* 1984;26:1306–12.
9. Algieri, L. Donato, P. Bonacci, L. Giorno. Tyrosinase immobilised on polyamide tubular membrane for the L-DOPA production: Total recycle and continuous reactor study *C Biochemical Engineering Journal* 66 (2012) 14– 19;
10. Munjal, N. Sawhney S,K. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels, *Enzyme Microb. Technol.* 30 (2002) 613–619.

REVENDECATIONS

- 5 1. Biodétecteur pour détecter la présence de gaz d'oxygène dans un espace fermé muni d'un moyen qui permet l'introduction du gaz d'oxygène à partir de l'extérieur de l'espace fermé et d'une zone transparente qui fournit une indication visuelle de la présence de l'oxygène gazeux par changement de coloration, caractérisé en ce que ledit biodétecteur est un hydrogel stable qui change de couleur par réaction enzymatique irréversible en phase solide ;
- 10 2. Méthode pour préparer le biodétecteur de la revendication 1, caractérisée en ce que le polyphénoloxydase (PPO) est fixé sur un gel extrait de plantes utilisant un substrat sélectionné à partir du groupe constitué des phénols simples, des acides aminés, des acides organiques, des flavonoïdes et des tannins ;
- 15 3. Biodétecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un hydrogel solide, le polyphénoloxydase et le substrat du polyphénoloxydase ;
- 20 4. Méthode pour préparer le substrat du biodétecteur selon la revendication 2, la méthode comprenant :
- préparer la solution d'enzyme de concentration minimale de 1mg/ml ;
 - préparer la solution du substrat de concentration minimale de 2.10^{-2} mol/l dans une solution tampon de pH compris entre 6 et 7.5 ;
 - préparer la solution d'indubiose de concentration comprise entre 2,5% et 10% ;
 - 25 • chauffer la solution d'indubiose jusqu'à au moins 50°C pour obtenir le gel d'indubiose ;
- 30 5. Méthode pour préparer le biodétecteur selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'enzyme est extraite de plantes et de fruits ;
- 35 6. Méthode pour préparer le biodétecteur selon les revendications 2 à 5, caractérisée en ce que le substrat de l'enzyme est sélectionné à partir du groupe constitué de l'acide gallique, de l'acide chlorogénique, de pyrocatechol, des flavonoïdes et des tannins ;
- 40 7. Méthode pour préparer le biodétecteur selon les revendications 2 à 6, caractérisée en ce qu'au moins un volume de la solution d'enzyme de concentration minimale 1mg/ml et au moins un volume de substrat de concentration minimale 2.10^{-2} mol/l sont mélangés à au moins 2 volumes de l'hydrogel liquide chaud ;
- 45 8. Méthode pour préparer le biodétecteur selon la revendication 7 caractérisée en ce que le mélange substrat-enzyme-hydrogel est mis sous vide en l'absence de l'oxygène pour se solidifier à la température ambiante.

DESSINS

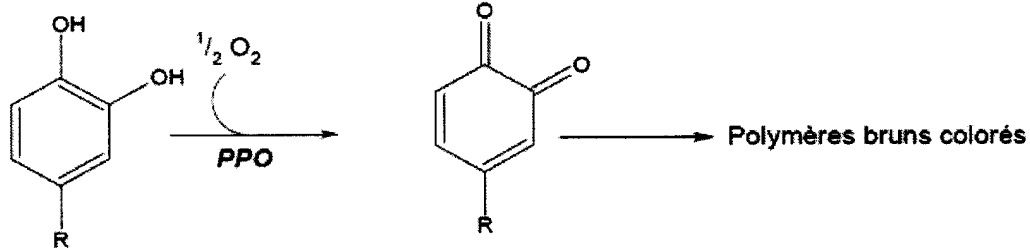


Figure-1-

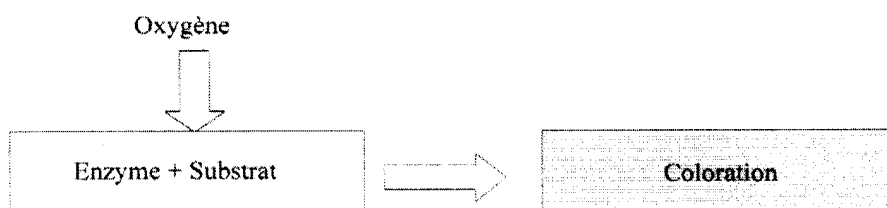


Figure-2-

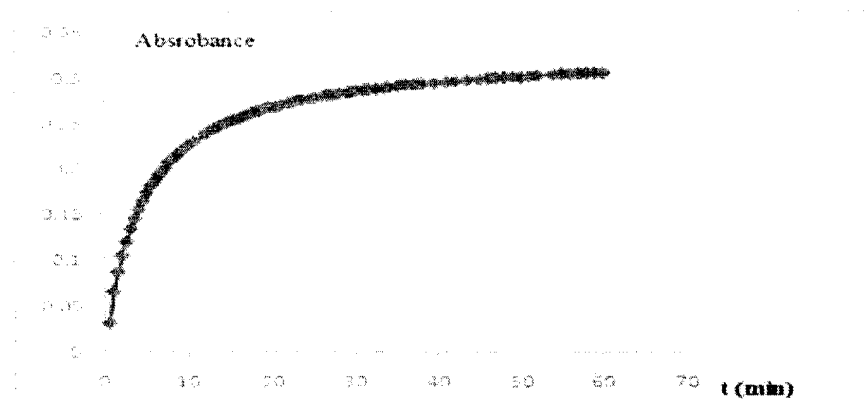


Figure-3-

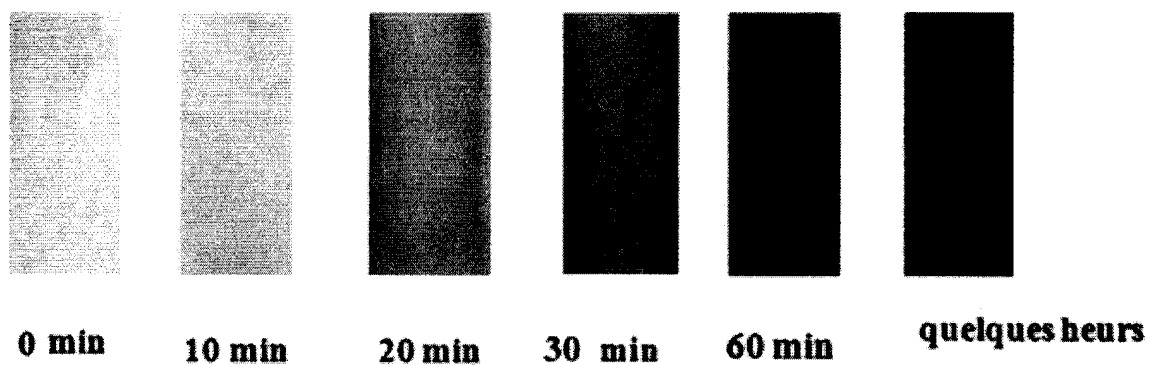


Figure-4-

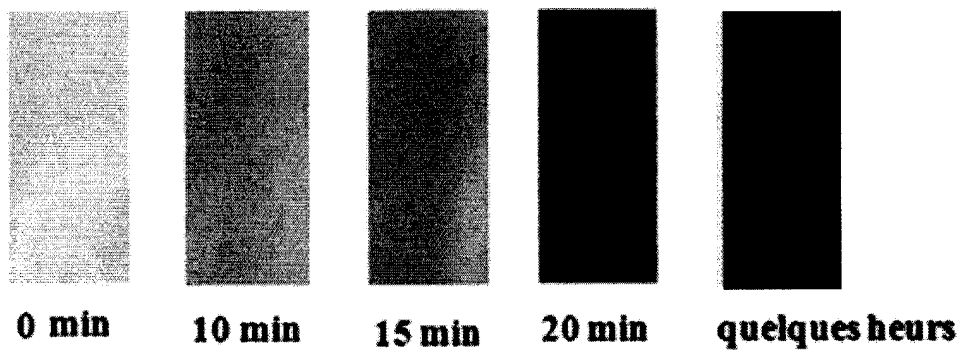


Figure-5-

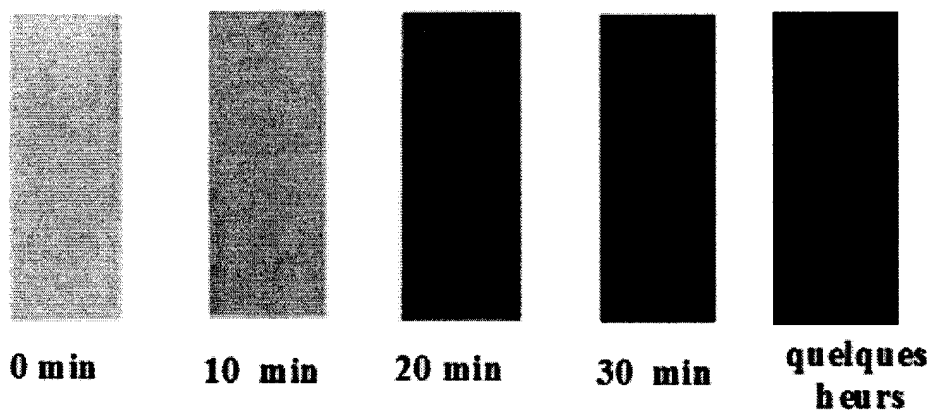


Figure-6-

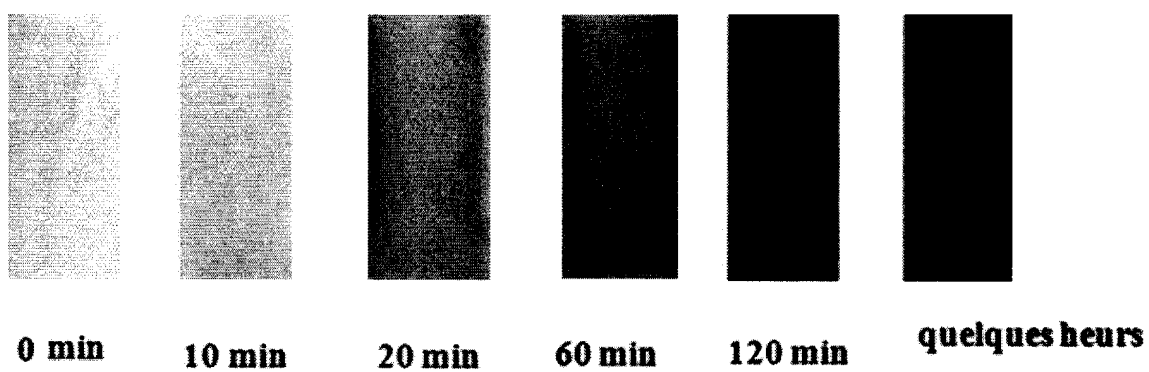


Figure-7-

U



**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97
relative à la protection de la propriété industrielle)**

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 37351	Date de dépôt : 11/09/2014
Déposant : UNIVERSITE ABDELMALEK ESSAADI	
Intitulé de l'invention : Biodétecteur pour la surveillance de l'infiltration d'oxygène, méthode pour la fabrication du biodétecteur	
<p>Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.</p> <p>Les documents cités par l'examineur dans la partie rapport de recherche sont joints au présent document</p>	
<p>Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :</p> <p>Partie 1 : Considérations générales</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés</p> <p>Partie 2 : Rapport de recherche</p> <p>Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention</p>	
Examineur: M. Bendaoud	Date d'établissement du rapport : 29/12/2014
Téléphone: 0522586400	

Partie 1 : Considérations générales

Cadre 1 : base du présent rapport

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
Pages 1-3
- Planches de dessin
No. 1-7
- Revendications
No. 1-8

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB : C12Q1/00 ; C12Q1/26
CPC : C12Q1/00 ; C12Q1/26

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

EPOQUE, Espacenet, Orbit

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
Y	WO2007051860 ; 2007/05/10 ; FRAUNHOFER GES FORSCHUNG [DE]	1-8
Y	EP2145756; 2010/01/20; AMCOR FLEXIBLES TRANSPAC NV [BE]	1-8
A	WO2009111768; 2009/09/11; PAPER PAK IND [US]; VERSTEYLEN SAYANDRO [US]; RIEHLE LINDSAY SNOWDEN [US]	1-8
A	WO9207899; 1992/05/14; MINNESOTA MINING & MFG [US]	1-8
A	WO2009111768; 2009/09/11; PAPER PAK IND [US]; VERSTEYLEN SAYANDRO [US]; RIEHLE LINDSAY SNOWDEN [US]	1-8

*Catégories spéciales de documents cités :

-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
 -« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
 -« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 -« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
 -« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité

Cadre 4 : Remarques de clarté

Bien que les revendications 2 à 4 et 8 aient été rédigées en tant que revendications dépendantes de produit, elles semblent avoir comme objet le procédé de préparation du biodecteur. Par conséquent, ces revendications manquent de concision.

Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté (N)	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications aucune Revendications 1-8	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : WO2007051860 ; 2007/05/10 ; FRAUNHOFER GES FORSCHUNG [DE]

D2 : EP2145756; 2010/01/20; AMCOR FLEXIBLES TRANSPAC NV [BE]

D3 : WO2009111768; 2009/09/11; PAPER PAK IND [US]; VERSTEYLEN SAYANDRO [US]; RIEHLE LINDSAY SNOWDEN [US]

D4 : WO9207899; 1992/05/14; MINNESOTA MINING & MFG [US]

D5: WO2009111768; 2009/09/11; PAPER PAK IND [US]; VERSTEYLEN SAYANDRO [US]; RIEHLE LINDSAY SNOWDEN [US]

1. Nouveauté (N) :

Aucun des documents mentionnés ci-dessus ne décrit l'utilisation de polyphénol oxydase comme indicateur de rupture d'un emballage hermétique, d'où l'objet de la revendication 1 est nouveau. Par la suite toutes les revendications dépendantes le sont.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 décrit une matrice constituée d'un polymère au moins en partie organique et au moins un composant choisi parmi les composants qui sont réactifs vis-à-vis de l'oxygène après activation appropriée. Ces composants sont de préférence des composés consommant de l'oxygène et/ou pouvant indiquer la présence d'oxygène. Le vernis peut notamment être utilisé en tant que vernis de revêtement ou en tant qu'adhésif. L'invention concerne également un substrat doté d'un revêtement dudit vernis, un matériau composite constitué d'une pluralité de couches, lesdites couches étant reliées par ce vernis, ainsi que les procédés de fabrication de ces produits. Selon un mode de réalisation particulier, la matrice est constituée de polymères hybrides organiques-inorganiques. Ces polymères peuvent cependant être complètement organiques. Le

composé réactif vis-à-vis de l'oxygène peut être encastré dans la matrice ou y être relié par une liaison covalente, ici est utilisée la glucose oxydase ; par conséquent l'objet de la revendication 1 ne diffère pas de D1 en ce qu'elle décrit aussi un détecteur d'oxygène basé sur une enzyme, la polyphénol oxydase. De même que la polyphénol oxydase, la glucose oxydase est une enzyme responsable du brunissement enzymatique, de ce fait les deux enzymes ayant le même effet technique d'intérêt pour cet invention elles seront donc considérées comme équivalentes pour remplir l'objet de cette invention.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme la détection de présence d'oxygène dans des emballages par une enzyme alternative.

Les documents cités décrivent des systèmes enzymatiques de détection ou d'élimination d'oxygène.

Le document D2 décrit un système fonctionnel d'emballage des produits, en particulier des produits alimentaires, comprenant une encre sensible à l'oxygène, un composé ferrocine (changement de couleur du jaune au vert) ou pyrogallol (changement d'être transparent à brun).

L'invention en D3 concerne un emballage alimentaire muni de tampons alimentaires absorbants contenant un ou plusieurs agents actifs. Elle concerne également des agencements de structures absorbantes et d'agents actifs dans les tampons alimentaires absorbants comprenant oxydase (y compris la glucose oxydase et l'hexose oxydase), oxygénase, une peroxydase, une oxydoréductase, une invertase, l'amylase, la catalase, et maltase, ou des combinaisons de ceux-ci.

Les articles décrits en D4 présentent des structures poreuses hydrophiles de support chargées avec un système enzymatique qui catalyse une réaction d'un substrat avec de l'oxygène, et si nécessaire de l'eau ou de l'humidité pour consumer l'oxygène, ces articles sont décrites et utilisées pour éliminer l'oxygène dans des emballages contenant des produits sensibles à l'oxygène.

L'invention en D5 concerne un emballage alimentaire muni de tampons alimentaires absorbants contenant un ou plusieurs agents actifs. Elle concerne également des agencements de structures absorbantes et d'agents actifs dans les tampons alimentaires absorbants.

La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 28 de la loi N° 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, l'objet des revendications 1 et revendication indépendantes n'étant pas conforme aux critères d'activité inventive définis par l'article 28. Le procédé de préparation du détecteur indépendamment de la revendication de produit reste inventif.

3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible