## 081 P274 2011

# Nouveau modèle d'électrode enzymatique pour la détermination du glucose

Applications aux milieux biologiques

B.J. VINCKÉ, J.-M. KAUFFMANN, M.J. DEVLEESCHOUWER et G.J. PATRIARCHE

Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles Campus Plaine 205/6, Boulevard du Triomphe, B 1050 Bruxelles, Belgique.

#### SUMMARY

New type of enzymatic electrode for the determination of glucose: applications in biological media.

A new type of selective enzymatic electrode is proposed for the determination of glucose in biological media. The use of potassium hexacyanoferrate (III) as electron acceptor for the oxidation of glucose allows to employ the enzyme imperfectly purified as well as the enzyme produced in vivo in Aspergillus Niger suspensions. The judicious choice of the indicating electrode and the enzyme immobilization method allow a rapid and sensitive determination of glucose  $(2.10^{-3} \text{ M} - 5.10^{-6} \text{ M})$ .

The stability is longer than three weeks.

The dynamic properties, such as; stability, reproducibility, sensitivity and the large linear concentration range, may be compared to those obtained with usual techniques used for glucose determination in biological media.

## RÉSUMÉ

Un nouveau type d'électrode enzymatique est proposé pour le dosage du glucose dans les milieux biologiques. L'utilisation de l'hexacyanoferrate (III) comme accepteur d'électrons lors de l'oxydation du glucose permet l'usage de l'enzyme imparfaitement purifié ou même de l'enzyme produit in vivo dans des suspensions d'Aspergillus Niger. Le choix judicieux de l'électrode indicatrice et du mode d'immobilisation de l'enzyme permet une détermination rapide et sensible du glucose de 2.10<sup>-3</sup> M à 5.10<sup>-6</sup> M avec une stabilité de plus de trois semaines. Les propriétés dynamiques telles que stabilité, reproductibilité, sensibilité ainsi que son large domaine de linéarité peuvent être avantageusement comparées aux méthodes classiques d'analyse.

## INTRODUCTION

Le développement récent des techniques d'immobilisation enzymatique [1,2] a conduit à l'utilisation de dispositifs bioanalytiques dans lesquels les biocatalyseurs (enzymes ou bactèries) sont immobilisés au proche voisinage des systèmes de détections électrochimiques [3-8].

L'attrait de tels dispositifs est manifeste : leur mise en œuvre autorise une sensibilité accrue, une réponse rapide, une stabilisation aisée de l'enzyme et la possibilité de les appliquer aux mesures en flux continu.

Le dosage du glucose en mitieu complexe constitue une application particulièrement bien adaptée à ce type d'analyse. Le principe de la méthode repose sur la détection à l'électrode indicatrice d'un des produits intervenant au cours de la réaction enzymatique :

$$β$$
-D glucose +  $H_2O$  +  $O_2$  glucose  $\xrightarrow{oxydase}$  acide gluconique +  $H_2O_2$  (1)

Ainsi une électrode à glucose peut-elle aisément être construite en immobilisant la glucose oxydase (biocatalyseur), soit à la surface d'une électrode à pH détectant l'acide gluconique libéré [9], soit à la surface d'une électrode de platine mesurant l'oxygène consommé [10-12] ou le peroxyde d'hydrogène formé [13-15].

Enfin, certains auteurs [16] ont proposé une méthode originale basée sur l'oxydation spécifique du glucose en acide gluconique en présence de glucose oxydase et d'hexacyanoferrate (III) selon:

Glucose + 
$$H_2O$$
 +  $2 [Fe(CN)_6]^{3-}$  glucose oxydase gluconate +  $2H^+$  +  $2 [Fe(CN)_6]^{4-}$  (2)

Manuscrit reçu le 13 septembre 1983; accepté le 17 octobre 1983.



L'hexacyanoferrate (II) formé au cours de la réaction est détecté par oxydation à la surface de l'électrode indicatrice selon :

2 [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4</sup> Electrode 2 [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> + 2 e<sup>-</sup>(3)

Ce mode d'analyse évite l'interférence des traces de catalase, enzyme généralement associée à la glucose oxydase et qui perturbe les dosages basés sur la détection du peroxyde d'hydrogène ou de l'oxygène (équation 1).

La plupart des électrodes indicatrices proposées mettent en jeu l'oxydation à potentiel contrôlé de l'ion hexacyanoferrate (II) sur une électrode de platine ou de carbone vitreux. Les performances de ces électrodes sont toutefois limitées par la réactivité du matériau constitutif [16-18]. Dans le but d'accroître la sensibilité de la méthode, nous proposons l'utilisation d'une électrode que l'on peut classer parmi les nouveaux modèles d'électrodes modifiées et décrites antérieurement par Kauffmann et al. [19].

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

## Appareillages

Les mesures voltampérométriques et ampérométriques ont été réalisées à l'aide d'un polarographe Brucker E 100 relié en synchronisation à un enregistreur I = f(E) ou I = f(t) Hewlett-Packard type 7004 B. Les mesures de voltammétrie cyclique ont été effectuées à l'aide des unités PAR 174 A et 175 associées à un enregistreur PAR XY RE0074.

Le système potentiostatique comporte une électrode de référence au calomel saturé, reliée à la solution par un pont d'électrolyte indifférent, une électrode auxiliaire en platine et l'électrode indicatrice. Cette dernière est une électrode métallique en aluminium modifiée par pulvérisation d'une solution à base de graphite colloïdal dispersé dans du polyméthacrylate de méthyle (30% p/p Acheson Dag 40). La préparation et les caractéristiques de cette électrode ont été décrites antérieurement [19] ainsi que son application aux molécules organiques [21] et inorganiques [20].

Les mesures en voltammétrie cyclique ont été réalisées à l'aide de cette électrode modifiée, d'une électrode à pâte de carbone (Metrohm EA 267, pâte Metrohm EA 267 C) et d'électrodes en carbone vitreux (Metrohm AG) CV<sub>1</sub> et CV<sub>2</sub>.

#### Réactifs

Tous les réactifs sont de qualité Merck P.A.

Le tampon phosphate est préparé à partir d'une solution de dihydrogénophosphate de sodium 0,1 M dont le pH est ajusté à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium.

La gélatine est de qualité microbiologique (Difco). La glucose-oxydase (Merck EC 1.1.3.4) est extraite d'Aspergillus Niger et présente une activité de 80 U/mg. L'eau est déminéralisée et ensuite bidistillée.

## Construction de l'électrode enzymatique

L'électrode enzymatique comporte l'électrode indicatrice, recouverte d'une membrane de gel enzymatique maintenue par une seconde membrane de dialyse en cellophane de 0,05 mm d'épaisseur comme le schématise la figure 1.

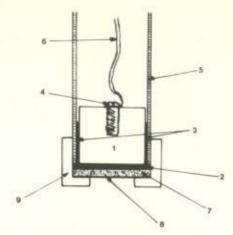


Fig. 1. - Electrode enzymatique:

Barreau d'aluminium;
 Couche conductrice à base de graphite colloïdal;
 Resine epoxy;
 Vis de connexion;
 Tube en verre;
 Fil conducteur;
 Gel de glucose oxydase (EC 1.1.3.4);
 Membrane de dialyse;
 Embout amovible.

Fig. 1. - Enzymatic electrode

- 1) Aluminium rod; 2) Graphite-based conducting coating;
- 3) Epoxy resin; 4) Connecting screw; 5) Glass tube; 6) Conducting wire; 7) Gel of glucose oxidase (EC 1.1.3.4);
- 8) Dialysis membrane; 9) Removable ring.

### Préparation du gel

L'incorporation de l'enzyme dans un gel facilite les manipulations et permet d'obtenir des coupes d'épaisseurs bien déterminées (150 µm) à l'aide d'un microtome à congélation (Leitz type 1310). Le gel est préparé par addition de 10% de gélatine à 1 ml de tampon phosphate 0,1 M (pH: 7,40) à 90 °C.

La température de la solution est ensuite ramenée à 50 °C avant d'y ajouter la glucose oxydase (500 U/ml de tampon). Le milieu est rapidement homogénéisé (pendant 15 à 20 secondes) et refroidi sous courant d'eau froide.

## Conditionnement de l'électrode enzymatique

Avant d'effectuer les déterminations proprement dites, il s'est avéré indispensable de réaliser un préconditionnement de l'électrode enzymatique. Le procédé consiste à maintenir l'électrode à + 0,4 V vs E.C.S. pendant environ deux heures sous barbotage d'azote, dans un tampon à base de phosphate 0,1 M de pH 7,4 et 2.10<sup>-2</sup> M en hexacyanoferrate (III) de potassium. Ensuite, l'oxygène présent dans le gel enzymatique est éliminé par addition de glucose; concentration finale 5.10<sup>-3</sup> M.

Ces opérations assurent une stabilisation électrochimique de la surface, la saturation de la couche de gel enzymatique en hexacyanoferrate (III) et surtout éliminent l'oxygène emprisonné dans le gel par réaction enzymatique avec le glucose.

## Mode opératoire

L'électrode enzymatique préconditionnée est soigneusement rincée à l'eau bidistillée, puis introduite dans la solution à analyser renfermant le glucose et l'électrolyte.

Un barbotage d'azote préalable pendant 20 minutes assure la désoxygénation de cette solution thermostatisée à 30,0 ± 0,2 °C. Les déterminations de glucose sont réalisées par la méthode des additions standards, ou à partir d'une droite d'étalonnage.

Après utilisation, l'électrode enzymatique est conservée à 4 °C dans une solution de tampon à base de phosphate 0,1 M contenant 2.10<sup>-2</sup> mole 1<sup>-1</sup> d'hexacyanoferrate (III)

#### de potassium.

## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

#### A. Choix de l'électrode indicatrice

Il est bien connu que les électrodes à enzymes mettent en jeu une réaction électrochimique, généralement au niveau de la surface d'électrodes classi-

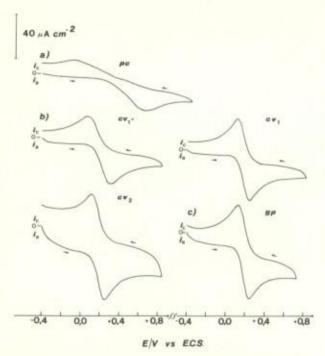


Fig. 2. — Voltammétries cycliques de l'hexacyanoferrate (11) de potassium 5.10<sup>-4</sup> M en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 au niveau de plusieurs électrodes de carbone.

Vitesse de balayage : 20 mV.s<sup>-1</sup>,

a) pâte de carbone; b) CV; carbone vitreux poli sur alumine et papier filtre, CV; carbone vitreux poli sur alumine et feutre doux, CV; seconde électrode en carbone vitreux poli sur alumine et feutre doux; c) électrode de graphite pulvérisé.

Fig. 2. — Cyclic voltammograms of 5.10<sup>-4</sup> M potassium hexacyanoferrate (II) in 0.1 M phosphate buffer pH 7,4, at different carbone electrodes:

Scan rate: 20 mV.s-1.

a) carbone-paste; b) CV<sub>1</sub> glassy-carbon polished with alumina powder on rough filter paper, CV<sub>1</sub> glassy-carbon polished with alumina on solft felt cloth, CV<sub>2</sub> second glassy-carbon polished with alumina on soft felt cloth; c) graphite-sprayed electrode. ques: platine, or, carbone vitreux. Considérées comme inattaquables, ces électrodes développent toutefois des comportements étroitement liés à la nature du matériau constitutif. L'état de conservation, la qualité du matériau, la formation d'oxydes superficiels, le traitement électrochimique, sont autant de facteurs aléatoires susceptibles d'engendrer des courants résiduels élevés [24].

L'étude comparative du comportement de l'hexacyanoferrate (II) en voltammétrie cyclique à l'aide de plusieurs électrodes à base de carbone a été réalisée. Les enregistrements repris au niveau de la figure 2 à pH 7,4 illustrent les différents tracés : (a) à l'électrode à pâte de carbone, (b) à l'électrode de carbone vitreux type CV<sub>1</sub> et type CV<sub>2</sub> et (c) à l'électrode modifiée proposée dans ce travail. Comme il est possible de l'observer, la pâte de carbone possède un courant résiduel faible, mais l'hexacyanoferrate (II) développe un tracé mal défini et très irréversible.

Les électrodes de carbone vitreux CV<sub>1</sub> et CV<sub>2</sub>, traitées de la même manière (polissage à la pâte d'alumine et feutre doux), présentent des courants résiduels différents (courbes CV<sub>1</sub>, CV<sub>2</sub>). La courbe CV<sub>1</sub> correspond à l'électrode CV<sub>1</sub>, mais le polissage a été réalisé à l'aide d'une pâte d'alumine et de papier filtre. Ce polissage est moins doux, aussi enlève-t'il totalement la couche d'oxydes superficiels d'où il en résulte un comportement moins réversible [25,26].

A l'électrode modifiée (c), les tracés sont parfaitement définis, réversibles, reproductibles et les courants de base du même ordre de grandeur que ceux observés sur CV<sub>1</sub>.

En raison des avantages présentés par l'électrode modifiée, celle-ci est proposée comme base de ce travail.

#### B. Choix du mode d'immobilisation

L'immobilisation d'enzymes au sein d'un gel peut s'effectuer, soit par inclusion physique de l'enzyme soluble à l'intérieur des mailles constitutives de polymères saccharidiques, protéiniques ou acryliques, soit par liaisons chimiques covalentes entre diverses fonctions de l'enzyme et des agents de liaisons bifonctionnels, tels que la glutaraldéhyde, l'acide bisdiazobenzidine-2, 2' disulfonique, etc., donnant naissance à divers polymères insolubles.

Ces deux modes d'immobilisation sous la forme d'un gel de gélatine à 10% et d'un gel de glutaraldéhyde selon le principe de Guibault et al. [14] ont été mis en œuvre.

#### a) Polymérisation à l'aide de la glutaraldéhyde

Le procédé a été envisagé de deux manières distinctes : une polymérisation sur membrane de dialyse, afin d'obtenir un polymère de 150 µm d'épaisseur, est effectuée et le polymère formé est fixé sur l'électrode ou sur l'agitateur magnétique.

La membrane enzymatique fixée à la surface

de l'électrode, donne lieu à des courants de base d'origine capacitive élevés et n'autorise des détections de glucose qu'à des concentrations supérieures à 5.10-4 mole 1-

L'immobilisation sur agitateur magnétique permet d'éviter ces courants de base élevés. Toutefois, l'allure des réponses observées (fig. 3b) diffère fortement des courbes ampérométriques classiques (fig. 3a). Aussi devons-nous utiliser les méthodes cinétiques : méthode des tangentes déterminant la vitesse initiale de la réaction ou la mesure de la variation de l'intensité de courant à temps fixé  $(t_1)$ , comme dans le cas d'enzymes en solution. Cette technique autorise des déterminations dans une gamme de concentrations comprises entre 6.10-6 et 1.10<sup>-3</sup> mole 1<sup>-1</sup> en glucose.

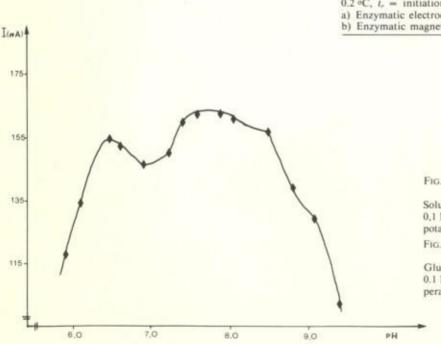
## b) Gel de gélatine

Notre choix s'est porté sur ce mode de fixation d'enzymes à la surface de l'électrode. Les courants capacitifs sont minimes et compatibles avec la détermination en régime stationnaire de concentrations aussi faibles que 5.10-6 mole 1-1 en glucose. De plus, la technique est de manipulation aisée, le temps de stabilisation est court (fig. 3a) et les mesures parfaitement reproductibles.

## C. Choix des facteurs physico-chimiques

## a) Influence du pH

Le tampon le mieux adapté et le plus utilisé pour le dosage du glucose est à base de phosphate. La figure 4 illustre la réponse d'une solution 6.10<sup>-5</sup> M de glucose en fonction du pH. On observe un maximum entre pH 7,3 et 8,4, résultat en accord avec ceux obtenus à l'aide d'autres méthodes d'immobilisation de la glucose oxydase [10-15].



I(nA) 40 AT nA TEMPS 161 I(nA) 200 AT TEMPS (min )

Fig. 3. - Influence du type d'immobilisation sur la forme des courbes ampérométriques .

Solution 7.10-5 M en glucose, tampon phosphate 0,1 M pH 7,40 + 2.10<sup>-2</sup> M hexacyanoferrate (III) de potassium, température : 30,0 ± 0,2 °C, to = début de la réaction.

a) Electrode enzymatique : mesure au point final.

b) Agitateur enzymatique : mesure cinétique.

Fig. 3. - Influence of the immobilization type on the amperometric curves :

Glucose: solution 7.10-5 M, phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 + 2.10<sup>-1</sup> M potassium hexacyanoferrate (III), temperature : 30.0 ± 0.2 °C, to = initiation time.

a) Enzymatic electrode: stationary mode.

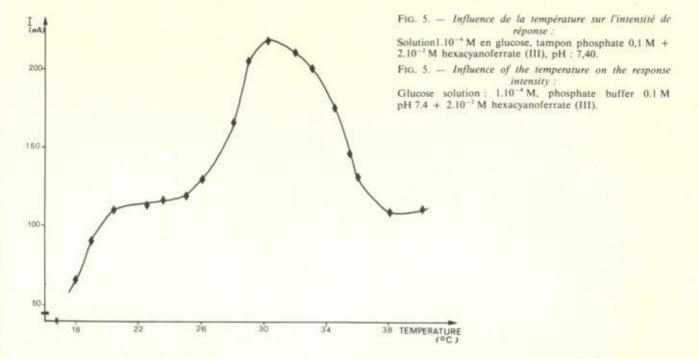
b) Enzymatic magnetic bar stirrer : kinetic mode.

Fig. 4. - Influence du pH sur l'intensité de réponse

Solution 6.10<sup>-3</sup> M en glucose, tampon phosphate 0.1 M + 2.10<sup>-2</sup> M hexacyanoferrate (III) de potassium, température : 30,0 ± 0,2 °C.

Fig. 4. - Influence of the pH on the response intensity

Glucose solution: 6.10-5 M, phosphate buffer 0.1 M + 2.10<sup>-2</sup> M hexacyanoferrate (III), temperature : 30.0 ± 0.2 °C.



## b) Influence de la température

Les résultats repris à la figure 5 dans le cas d'une solution 1.10-4 M en glucose, indiquent une réponse optimale à 30 °C. De plus, ce maximum correspond également à une augmentation favorable de la cinétique de réponse de l'électrode.

## D. Application au dosage du glucose

#### 1) Dosage du glucose en solution aqueuse

L'électrode possède une réponse linéaire pour des concentrations de 5.10-6 M à 2.10-3 M (soit de 0,890 à 360 ppm de glucose) avec des coefficients de régressions linéaires de 0,9995 ± 0,0005 (fig. 6a). Cependant, les coefficients de variations sur les mesures effectuées varient en fonction de la concentration: ainsi ils sont de 5 à 6 % pour des concentrations de 5.10<sup>-6</sup> M à 1.10<sup>-5</sup> M, de 3 à 4 % pour des concentrations de 1.10-5 M à 5.10-5 M alors qu'ils sont toujours inférieurs à 3 % pour les concentrations supérieures, comme le montre le tableau I.

Nous utiliserons donc dans la pratique des dilutions de solutions inconnues permettant l'obtention de concentrations comprises entre 5.10-5 M et 2.10<sup>-3</sup> M, afin d'obtenir des intensités de réponses suffisantes pour minimiser les valeurs des coefficients de corrélations.

 Domaines des concentrations linéaires et des sensibilités respectives selon l'origine de l'enzyme :

a) Electrode enzymatique

b) Electrode en présence d'une susd'Aspergillus pension Niger (500 mg/20 ml).

Tampon phosphate 0,1 M pH 7,40 2.10<sup>-2</sup> M d'hexacyanoferrate (III), température : 30,0 ± 0,2 °C.

Fig. 6. - Linear concentration ranges and respective sensitivities as a fonction of the enzyme origin:

a) Enzymatic electrode.

b) Electrode with an Aspergillus Niger suspension (500 mg 20 ml).

Phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 + 2.10<sup>-2</sup> M hexacyanoferrate temperature: 30.0 ± 0.2 °C.

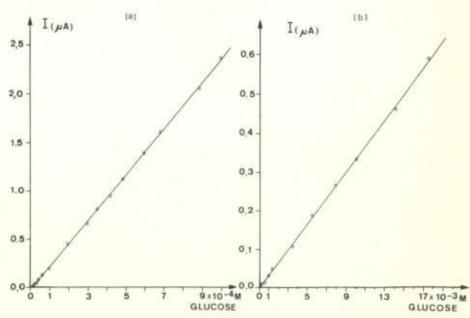


TABLEAU I. — Influence de la concentration de glucose en solution aqueuse sur le coefficient de variation (CV%).

TABLE 1. — Influence of the concentration of glucose in aqueous solution on the variation coefficient (CV%).

Théorique (mg.l <sup>-1</sup> )	Trouvé* (mg.l <sup>-1</sup> )	Ecart-Type (mg.l <sup>-1</sup> )	CV %	% Ecart à la valeur théorique
0,889	0,872	0,055	6,3	- 1,9
1,430	1,445	0,079	5,5	+ 1,0
2,136	2,144	0,086	4,0	+ 0,4
3,53	3,49	0,11	3,2	- 1,1
7,05	7,13	0,22	3,1	+ 1,1
10,56	10,57	0,26	2.5	+ 0.1
14,05	14,13	0,31	2,2	+ 0,6
58,70	58,73	0,90	1,5	+ 0,1
110,2	111,0	2,3	2,1	+ 0,7
279,8	278,3	5,3	1,9	- 0,5

<sup>\*</sup> Moyenne des résultats obtenus sur cinq essais.

Lors d'essais de routine rapide, nous pouvons procéder à la méthode des ajouts dosés, en utilisant un ajout de solution inconnue comprise entre 5.10<sup>-5</sup> et 1.10<sup>-4</sup> M. Le temps de réponse de l'électrode au point final est de 2 à 4 minutes selon les concentrations. La stabilité et sa conservation à long terme sont de plus de trois semaines.

## 2) Dosage du glucose en milieu biologique

Le dosage du glucose sérique et urinaire peut s'effectuer par les mesures ampérométriques rapportées à une droite d'étalonnage journalière, en utilisant des dilutions de ces échantillons biologiques. Le tableau II donne les résultats obtenus pour divers

TABLEAU II. — Dosage du glucose dans divers échantillons biologiques.

TABLE II. — Determination of glucose in several biological samples.

Type d'échantillon	Théorique (g.l <sup>-1</sup> )	Trouvé* (g.l <sup>-1</sup> )	Ecart- Type (g.l <sup>-1</sup> )	CV %	% Ecart à la valeur théorique
A) Echantillons	0,860	0,864	0,023	2,7	+ 0,5
sériques	1,900	1,891	0,046	2,4	- 0,5
B) Echantillons	0,400	0,397	0,013	3,3	- 0,8
urinaires	19,90	19,97	0,49	2,5	+ 0,4

Moyenne des résultats obtenus sur cinq essais.

échantillons biologiques (concentrations dans la cellule de mesure : de 5.10<sup>-5</sup> à 1.10<sup>-4</sup> M en glucose).

Cette analyse peut également se faire selon la méthode des additions standards permettant un dosage ponctuel rapide. Les résultats sont repris dans le tableau III. Le coefficient de régression linéaire sur les quatre points de la droite est de 0,9992.

TABLEAU III. — Dosage du glucose dans un échantillon urinaire par la méthode des additions standards.

TABLE III. — Determination of glucose in an urinary sample by the standard additions method.

Ajouts (mg.1 <sup>-1</sup> )	Théorique (mg.l <sup>-1</sup> )	Trouvé (mg.l <sup>-1</sup> )	% de glucose trouvé
	9,95	9,89	99,4
18,02	27,97	28,80	103,0
36,04	64,01	62,79	98,1
54,06	118,07	119,64	101,3

## Application de la méthode en présence de l'enzyme in vivo : suspensions d'Aspergillus Niger perméabilisés

Afin de vérifier la validité de la méthode en présence d'un grand nombre d'enzymes, nous avons utilisé la glucose oxydase contenue dans le mycelium même pour effectuer le dosage du glucose. L'Aspergillus Niger ATCC 16404 contient en effet en plus de la glucose oxydase des traces de glucanase, de la cellulase, de l'amyloglucosidase, de la lactase, de la pectinase, de la lipase et surtout une catalase très active [2].

La croissance d'Aspergillus Niger est réalisée durant trois jours dans un milieu liquide de Sabouraud dextrose à une température de 22 °C. La structure particulière de ce champignon empêche son immobilisation, tant sur l'électrode que sur l'agitateur. En effet, sous forme condensée, même en présence d'un agent de perméabilisation tel que le diméthylsulfoxyde, nous observons une imperméabilité du mycelium. Nous avons donc dû recourir à l'utilisation de suspensions de 200 à 700 mg de poids humide de champignon dans la cellule d'analyse.

Après sa croissance, l'Aspergillus est perméabilisé par une solution de 40 % de diméthylsulfoxyde, agent chimique déjà utilisé lors de mesures de l'activité catalytique de divers enzymes de levures par Pascual et al. [22, 23].

Cette perméabilisation est nécessaire sous peine d'observer une réponse lente (due au transport actif) et non stoechiométrique. Cette suspension permet le dosage du glucose de 3.10<sup>-4</sup> à 2.10<sup>-2</sup> mole 1<sup>-1</sup> de glucose, avec un coefficient de régression linéaire de 0,9970. Comme le montre la figure 6b, les résultats font apparaître une sensibilité nettement diminuée vis-à-vis de l'électrode enzymatique (fig. 6a). Ainsi cette suspension d'Aspergillus Niger est peu maniable et très instable, mais elle démontre la validité de la méthode en présence de nombreux enzymes, y compris de catalase. Cette méthode pourrait donc être utilisée pour mesurer l'activité enzymatique de la glucose oxydase dans une culture d'Aspergillus avant son isolement et sa purification au niveau industriel, et tout au long de ceux-ci.

#### CONCLUSIONS

L'utilisation d'une électrode enzymatique (glucose oxydase) en présence d'un accepteur d'électrons tel que l'hexacyanoferrate (III) autorise une spécificité et une sensibilité accrues lors du dosage du glucose en milieux biologiques. Ce système n'est pas influencé par le degré de pureté de l'enzyme, de plus le dosage peut s'effectuer à l'aide de l'enzyme d'un milieu aussi complexe qu'une suspension d'Aspergillus Niger perméabilisés.

La présence d'un nouveau type d'électrode indicatrice, performante par rapport aux électrodes classiques telles le platine, l'or, le carbone vitreux, permet d'accroître fortement la sensibilité de la méthode.

Une mise en œuvre aisée, un faible coût, ainsi que la qualité des réponses analytiques obtenues sont les principaux attraits de l'électrode enzymatique proposée.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRAY (D.M.), KEYES (M.H.), WATSON (B.). Anal. Chem., 1977, 49, 1067 A.
- [2] DURAND (G.), MONSAN (P.). Les Enzymes, Production et Utilisation Industrielles. Gauthier-Villars, Bordas, Paris, 1982,
- [3] GUILBAULT (G.G.). Bull. Soc. Chim. Belg., 1975, 84, 679.
  [4] GUILBAULT (G.G.). In Comprehensive Analytical Chemistry (Wilson and Wilson's, G. Svehla). Elsevier, Amsterdam, 1977, 8, 1-70.

- [5] BAIULESCU (G.E.), COSOFRET (V.V.). Application of ion Membrane Electrode in Organic Analysis. Ellis Horwood, Chichester, 1re Edit., 1977, 169-206.
- [6] ELIARD (P.), LAUDET (A.), VIRE (J.-C.), PATRIARCHE (G.J.). -Analusis, 1982, 10, 182.
- [7] VINCKÉ (B.J.), DEVLEESCHOUWER (M.J.), PATRIARCHE (G.J.). - Anal. Lett., 1983, 16, 673.
- [8] VINCKÉ (B.J.), DEVLEESCHOUWER (M.J.), PATRIARCHE (G.J.). - J. Pharm. Belg., 1983, 38, 225.
- [9] NILSSON (H.), AKERLUND (A.), MOSBACK (K.). Biochim. Biophys. Acta, 1973, 320, 529.
- [10] NANJO (M.), GUILBAULT (G.G.). Anal. Chim. Acta, 1974, 73, 367.
- [11] PUNGOR (E.), NAGY (G.), FEHIR (Zs.). J. Electroanal. Chem., 1977, 75, 241.
- [12] ROMETTE (J.L.), FROMENT (B.), THOMAS (D.). Clin. Chim. Acta, 1979, 95, 249.
- [13] GUILBAULT (G.G.), LUBRANO (G.J.). Anal. Chim. Acta, 1973, 64, 439.
- [14] LUBRANO (G.J.), GUILBAULT (G.G.). Anal. Chim. Acta. 1978, 97, 229,
- [15] THEVENOT (D.R.), STERNBERG (R.), COULET (P.R.), LAURANT
- (J.), GAUTHERAN (D.G.). Anal. Chem., 1979, 51, 96. [16] MOR (J.R.), GUARNACCIA (R.). - Anal. Biochem., 1977, 79,
- 319. [17] DURLIAT (H.), COMTAT (M.), MAHENC (J.), BAUDRAS (A.). -
- J. Electroanal. Chem., 1975, 66, 73.
- [18] DURLIAT (H.), COMTAT (M.). Anal. Chem., 1980, 52, 2109.
- [19] KAUFFMANN (J.-M.), LAUDET (A.), PATRIARCHE (G.J.), CHRIS-TIAN (G.D.). - Talanta, 1982, 29, 1077.
- [20] KAUFFMANN (J.-M.), LAUDET (A.), PATRIARCHE (G.J.), CHRIS-TIAN (G.D.). - Anal. Chim. Acta, 1982, 135, 153.
- [21] KAUFFMANN (J.-M.), LAUDET (A.), VIRE (J.-C.), PATRIARCHE (G.J.). — Microchem. J., 1983, 28, 357.
- [22] PASCUAL (C.), HERRERA (L.). Folia Microbiol., 1981, 26,
- [23] PASCUAL (C.), PASCUAL (R.), KOTYK (A.). Anal. Biochem., 1982, 123, 205.
- [24] ADAMS (R.N.). - Electrochemistry at Solid Electrodes. Marcel Dekker, New York, 1969.
- [25] BJELICA (L.), PARSONS (R.), REEVES (R.M.). The Electrochemical Society, Proc. 3<sup>rd</sup> Symposium "Electrode Processes". 1979, 80, 190.
- [26] BJELICA (L.), PARSONS (R.), REEVES (R.M.). Croatica Chem. Acta, 1980, 53, 211.



Remerciements: Nos remerciements vont au F.N.R.S. (Fonds National de la Recherche Scientifique) pour l'aide apportée à l'un d'entre nous (G.J.P.).

Nos remerciements vont également au Professeur M. Van Haelen pour l'aide apportée à l'élaboration des coupes au microtome.