

## PREPARATION D'INVERTASE INSOLUBILISÉE PAR FIXATION SUR BENTONITE

P. MONSAN et G. DURAND

*Laboratoire de génie biochimique, Institut National des Sciences Appliquées, avenue de Rangueil, 31-Toulouse, France*

Received 12 May 1971

Invertase was linked by means of a multi-functional agent, cyanuric chloride to a clay, bentonite. Properties of insolubilized invertase were compared to free invertase and to invertase adsorbed on bentonite. Several enzymes have been insolubilized by coupling to bentonite using the method described in this paper.

### 1. Introduction

De nombreuses enzymes ont été fixées sur divers supports insolubles [1]: polymères d'acides aminés [2], polymères synthétiques [3, 4], membranes au collodion [5], dérivés de la cellulose [6–8], Séphadex [9], verre poreux [10, 11].

L'invertase a déjà été insolubilisée par fixation sur copolymère nitré d'acide métacrylique et de *m*-fluoroanilide d'acide métacrylique [4] ainsi que sur DEAE-cellulose [8].

La recherche d'un support abondant et insensible aux attaques des microorganismes nous a conduit à choisir la bentonite qui est une argile dont les propriétés d'adsorption sont bien connues [12, 13]. On sait en effet que les argiles, dans certaines conditions de pH sont capables d'adsorber les protéines [14]. Malheureusement les enzymes ainsi insolubilisées ne sont pas liées solidement au support de sorte qu'une fraction est libérée pendant que se produit la réaction enzymatique.

C'est pourquoi nous avons utilisé un intermédiaire de fixation, le chlorure de cyanuryle (tri-chloro-2,4,6-triazine-1,3,5) que certains auteurs ont employé pour fixer des enzymes sur cellulose [15, 16].

### 2. Préparation des complexes

100 g de bentonite sont mis en suspension dans 200 ml de dioxane contenant 5 g de chlorure de

cyanuryle (Fluka). On agite pendant 90 min à 20°. Le complexe bentonite–chlorure de cyanuryle (BCC) est séparé par centrifugation et lavé cinq fois par remise en suspension dans du dioxane pur puis séché sous vide. La bentonite fixe 0,68% en poids de chlorure de cyanuryle.

L'invertase (Serva) est mise en solution dans l'eau distillée et on ajoute le complexe BCC. La suspension est agitée pendant une heure à 0°. Le complexe bentonite–chlorure de cyanuryle–invertase (BCCI) ainsi obtenu est lavé trois fois par remise en suspension dans de l'eau distillée afin d'éliminer l'invertase non fixée. Le complexe est ensuite lavé trois fois par une solution de soude pH 10,5 afin d'éliminer l'enzyme éventuellement adsorbée sur la bentonite; la soude est ensuite enlevée par trois lavages à l'eau distillée.

Le complexe bentonite–invertase adsorbée (BI) est obtenu par la même méthode en remplaçant dans la solution d'enzyme, le complexe BCC par de la bentonite non traitée.

L'activité de l'invertase est mesurée par dosage des sucres réducteurs libérés à partir d'une solution de saccharose par la méthode de Somogyi-Nelson et rapportée au glucose. Les conditions d'essai sont définies comme suit: on porte à 40° pendant trente minutes une solution comprenant 5 ml de la solution d'enzyme, 5 ml d'une solution tampon acétate 0,2 M, de pH 5,2 et 10 ml d'une solution de saccharose 0,0585 M. On arrête la réaction en plaçant les tubes au bain marie bouillant pendant cinq minutes. Les essais d'activité des complexes BI et BCCI sont

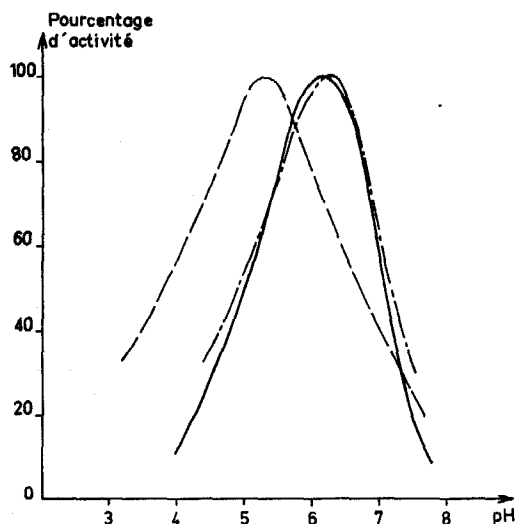


Fig. 1. Effet du pH sur l'activité enzymatique de l'enzyme libre (---) de l'enzyme adsorbée sur bentonite: complexe BI (---), de l'enzyme fixée sur le complexe BCC (—).

effectués en reprenant ces complexes dans 5 ml d'eau distillée et en procédant ensuite comme décrit ci-dessus.

Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui, dans les conditions d'essai, libère  $10^{-6}$  mole d'équivalent glucose par minute.

### 3. Propriétés de complexes

Le tableau 1 montre les variations de l'activité enzymatique au cours de la fixation de l'invertase et des lavages successifs des complexes BCC et bentonite.

L'expérience a été effectuée dans des tubes à centrifuger contenant 20 ml d'une solution d'invertase à 1 g par litre dans l'eau distillée et 500 mg de complexe BCC ou de bentonite.

Ainsi dans nos conditions expérimentales, 500 mg de complexe BCC fixent 6,8% lorsqu'ils sont mis en contact avec 20 mg d'invertase. En tenant compte de la quantité d'enzyme non fixée et de cette enlevée au cours des lavages, l'activité enzymatique représente 13,4% de celle que l'on devrait théoriquement obtenir, par suite de l'inactivation d'une fraction de l'enzyme fixée. En effet, l'enzyme pourrait se fixer, au moins partiellement, par des sites actifs, les rendant ainsi inactifs.

Il est possible d'augmenter la quantité d'enzyme fixée en augmentant la concentration de l'invertase dans la solution que l'on met en contact avec le complexe BCC (tableau 2).

Cette augmentation de la quantité d'enzyme fixée sur le complexe BCC peut être due à la compétition entre les ions  $\text{OH}^-$  et les molécules d'enzyme pour le remplacement des ions  $\text{Cl}^-$ . Il faut toutefois remarquer que l'activité enzymatique du complexe BCCI n'est pas proportionnelle à la quantité d'enzyme mise en contact du complexe BCC.

La quantité maximale fixée est très rapidement atteinte puisque l'on retrouve la même activité du complexe BCCI après des temps de contact allant de 30 à 1710 min.

L'effet du pH sur l'activité enzymatique a été étudié en remplaçant le tampon acétate par du tampon citrate-phosphate à différents pH. Les résultats rapportés dans la figure 1 montrent que l'invertase libre présente un pH optimal à 5,2 tandis que le complexe BI (non lavé à la soude car l'activité serait presque nulle) et le complexe BCCI ont une activité optimale aux environs de pH 6,26.

Tableau 1

Activité enzymatique après fixation sur support et après lavages. Les résultats sont exprimés en pour cent de l'activité de la solution enzymatique avant fixation.

Activité enzymatique	Complexe BCCI	Complexe BI
Dans le surnageant après fixation	41,8	24,5
Dans les eaux de lavages (lavages à l'eau)	5,4	55,7
Dans les eaux de lavages (lavages à la soude)	1,3	10,9
Complexes	6,8	1,2

Tableau 2  
Activité des complexes après contact avec des concentrations variables d'invertase (%).

Quantité invertase (mg)	Complexe BCC				Bentonite brute	
	2	20	100	200	20	200
Après lavages à l'eau	0,74	4,40	8,40	8,40	0,26	7,40
Après lavages à la soude	0,17	0,62	2,90	—	0,15	1,26

Ce déplacement du pH optimal d'environ une unité vers les pH plus élevés est certainement provoqué par la présence, autour des particules de bentonite, d'une zone d'environ 200 Å d'épaisseur [14], zone dans laquelle la concentration en protons est nettement supérieure à celle de la solution.

La fig. 2 montre les variations de l'activité enzymatique en fonction de la température. L'invertase libre et le complexe BI présentent un maximum d'activité aux environs de 45° alors que pour le complexe BCCI, ce maximum s'étend dans la zone comprise entre 40° et 60°. L'invertase est donc protégée contre la dénaturation par la chaleur après sa fixation sur le complexe BCC.

Le complexe BCCI a été conservé pendant 15 jours dans une solution tampon acétate 0,2 M pH 5,2 à 30°. Aucune perte d'activité n'a été enregistrée

au cours de cette période.

Après deux mois de conservation dans la même solution tampon à 20°, le complexe BCCI conserve 70% de son activité initiale, alors que le complexe BI a perdu 70% de celle-ci.

#### 4. Discussion

Les résultats ci-dessus montrent qu'il est possible d'insolubiliser l'invertase par fixation sur la bentonite par l'intermédiaire de chlorure de cyanuryle. Le dérivé ainsi obtenu est caractérisé par une stabilité accrue vis à vis de facteurs de dénaturation tels que la température et le vieillissement.

La méthode d'insolubilisation décrite est largement applicable puisque'elle nous a permis de préparer des complexes avec de nombreuses autres enzymes:  $\beta$ -amylase, cellulase, ribonucléase, trypsine, uréase.

L'étude de l'utilisation continue de ces dérivés tant en lit fixe qu'en réacteur agité et la recherche des causes de la stabilisation des enzymes sont actuellement poursuivies.

#### Références

- [1] G. Kay, *Process Biochem.* (1968) 873.
- [2] A. Bar-Eli et E. Katchalski, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 1690.
- [3] Y. Levin, M. Pecht et E. Katchalski, *Biochemistry* 3 (1964) 1905.
- [4] G. Manecke et G. Gunzel, *Makromol. Chem.* 91 (1966) 136.
- [5] R. Goldman, O. Kedem, I.H. Silman, S.R. Kaplan et E. Katchalski, *Biochemistry* 7 (1968) 486.
- [6] W.E. Hornby, M.D. Lilly et E.M. Crook, *Biochemistry* 98 (1966) 420.
- [7] M.A. Mitz et L.J. Summari, *Nature* 189 (1961) 576.
- [8] H. Suzuki, Y. Osawa et H. Maeda, *Agr. Biol. Chem.* 30 (1966) 807.

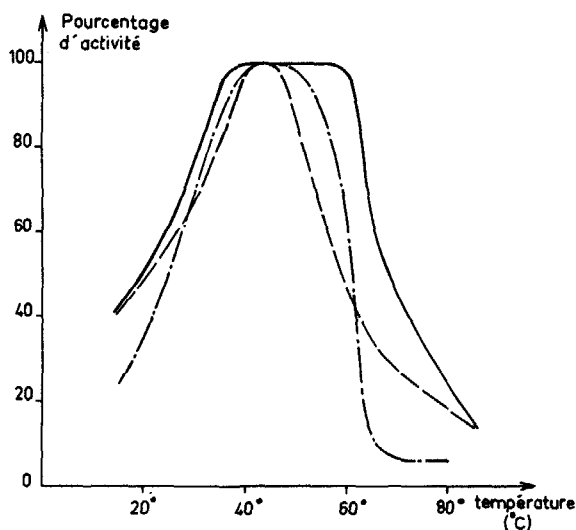


Fig. 2. Effets de la température sur l'activité enzymatique de l'enzyme libre (---) de l'enzyme adsorbée sur bentonite: complexe BI (-.-) de l'enzyme fixée sur le complexe BCC (—).

- [9] T. Tosa, T. Mori et I. Chibata, *Agr. Biol. Chem.* 33 (1969) 1053.
- [10] H.H. Weetall, *Nature* 223 (1969) 959.
- [11] H.H. Weetall et L.S. Hersh, *Biochim. Biophys. Acta* 185 (1969) 464.
- [12] R.E. Grim, in: *Clay mineralogy* (McGraw Hill, New York, 1968) p. 353.
- [13] D.J. Greenland, *Soils Fertilizers* 28 (1965) 415.
- [14] G. Durand, Thèse, (Toulouse, 1966) p. 163.
- [15] R.J.H. Wilson et M.D. Lilly, *Biotech. Bioeng.* 11 (1968) 349.
- [16] B.P. Surinov et S.E. Manoïlov, *Biokhimiya* 31 (1966) 387.