

PREPARATION ET PROPRIETES DE DERIVES DE LA TRYPSINE INSOLUBLES DANS L'EAU

Eric BROWN et André RACOIS

Laboratoire de Chimie Macromoléculaire
Centre Universitaire, Route de Laval, 72 - LE MANS

(Received in France 26 January 1971; received in UK for publication 16 March 1971)

Un certain nombre de combinaisons insolubles trypsine/support macromoléculaire sont actuellement connues (1 à 5). Le support macromoléculaire possède des groupements fonctionnels tels que les groupements diazoïques (1, 2) ou anhydrides d'acide (3 à 5), qui réagissent sur les fonctions $-NH_2$ libres de l'enzyme pour donner des combinaisons insolubles trypsine/support dont l'activité enzymatique varie de 0 à 70 % de celle de la trypsine d'origine.

Afin de préparer d'autres types de trypsine insoluble, nous avons synthétisé de nouveaux polymères hydrophiles comprenant le groupement iodure d'alcoyle susceptible de réagir avec les groupements $-NH_2$ libres de la trypsine pour donner un dérivé insoluble du type Polymère- CH_2-NH -Enzyme, analogue à ceux que nous avons déjà préparés avec l'uréase (6).

Le polyméthacrylate de iodo-4 *n*-butyle utilisé a été décrit récemment (6) et nous avons synthétisé de la même manière divers copolymères statistiques de méthacrylate de iodo-4 *n*-butyle et de méthacrylate de méthyle. On agite pendant 24 h à 2° une suspension de 1 g de polymère broyé et de 50 mg de trypsine lyophilisée dans une solution tampon phosphate (pH = 7,2). On récupère le dérivé insoluble ainsi obtenu par filtration et on le lave à l'eau distillée.

L'activité trypsique des dérivés a été mesurée à pH = 7,8 par titrage à la soude de l'acide libéré par hydrolyse enzymatique du chlorhydrate de N-benzoyl L-arginine méthyl ester (4, 8). Une courbe donnant la masse de substrat hydrolysé en fonction de la masse de trypsine a permis de calculer la masse m_1 (mg) de trypsine équivalente au dérivé insoluble. Après avoir vérifié qu'un séjour de 24 h à 2° en solution tampon (pH = 7,2) ne désactivait pas la trypsine originelle, nous avons calculé la masse m_3 d'enzyme fixée sur le polymère par la différence $m_3 = (50 - m_2)$, où m_2 (mg) représente la masse de trypsine présente dans les filtrats après récupération du dérivé insoluble polymère-trypsine. L'activité relative r de ce dérivé par rapport à la trypsine originelle est donnée par le rapport $r = 100 m_1 / (50 - m_2)$.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-contre (dans la première colonne le symbole 1/x signifie que le polymère considéré a été préparé à partir de x g. de méthacrylate de méthyle par g. de méthacrylate de iodo-4 *n*-butyle) (7).

Dans le cas des deux derniers polymères, un dosage de la trypsine restant en solution a été réalisé par mesure de l'absorption UV à 280 nm (9) et a fourni des résultats proches de ceux énoncés ci-dessus.

Polymère utilisé 1/x	m_1 (mg)	Trypsine non fixée m_2 (mg)	Trypsine fixée m_3 (mg)	Activité relative r (%)
1/0	11,2	14	36	31
1/1	9,1	16	34	26
1/2	8,4	20	30	28
1/3	8	21	29	27
1/5	7,2	24	26	27

Afin de déterminer la quantité approximative de trypsine fixée sur le support par simple physisorption (10, 11), nous avons utilisé un polymère analogue à ceux décrits ci-dessus mais dépourvu de groupements fonctionnels réactifs, le polyméthacrylate de *n*-butyle (12). Nous avons préparé ce polymère de la même façon que ses analogues iodés, afin d'avoir un produit de tacticité et de degré de polymérisation comparables. Ce polymère a été traité par la trypsine en utilisant les quantités et les conditions habituelles, puis lavé plusieurs fois à l'eau distillée. Nous avons alors constaté que 10 % de la trypsine initiale restaient adsorbés sur le polymère et que ni l'enzyme physisorbée, ni l'enzyme présente dans les filtrats n'avaient été dénaturées de façon sensible au cours de l'opération. Ce dernier résultat justifie nos calculs précédents de la masse m_3 (mg) d'enzyme fixée par la différence $m_3 = (50 - m_2)$ mg.

En conclusion, la fixation sur des polyméthacrylates de iodo-4 *n*-butyle de la trypsine par ses groupements basiques réactifs peut être effectuée comme pour l'uréase (6) et fournit des dérivés insolubles dans l'eau. Dans le cas de l'uréase, nous avons constaté que les combinaisons polymère/enzyme obtenues étaient partiellement colloïdales du fait que la masse moléculaire de l'uréase ($M = 480\ 000$) (13) était très supérieure à celle du polymère ($\overline{M}_n = 100\ 000$) (6), et ces combinaisons avaient dû être insolubilisées par réticulation au moyen d'éthylène-diamine. Dans le cas présent, où la trypsine a une masse moléculaire ($M = 25\ 000$) (14, 15) nettement plus faible, les dérivés obtenus sont très insolubles et leur réticulation s'est donc avérée inutile. La quantité de trypsine fixée paraît dépendre assez peu du nombre de groupements iodeure d'alcoyle présents dans les différents copolymères statistiques utilisés, ce qui est intéressant sur le plan économique. En comparant les résultats présents à ceux obtenus avec l'uréase, nous constatons que le taux de fixation de la trypsine sur les polymères est nettement plus élevé que pour l'uréase. Par contre, après fixation, l'uréase s'avère moins désactivée que la trypsine dans les mêmes conditions.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, Nature, 1960, 188, 856.
- (2) M.A. MITZ et L.J. SUMMARRIA, Nature, 1961, 189, 576.
- (3) A.N. GLAZER, A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1962, 237, 1832.
- (4) A. BAR-ELI et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1963, 238, 1689.
- (5) Y. LEVIN, M. PECHT, L. GOLDSTEIN et D. KATCHALSKI, Biochem., 1964, 3 (12), 1905.
- (6) E. BROWN, A. RACOIS et H. GUENIFFEY, Tetrahedron Letters, 1970, (25), 2139.
- (7) E. BROWN et A. RACOIS, Travaux non publiés.
- (8) C.E. McDONALD et A.K. BALLS, J. Biol. Chem., 1957, 229, 69.
- (9) E.W. DAVIE et H. NEVRATH, J. Biol. Chem., 1955, 212, 515.
- (10) H. BRANDENBERGER, Rev. Ferment. Ind. Aliment., 1956, 11, 237.
- (11) A.S. LINDSEY, J. Macromol. Sci. - Revs. Macromol. Chem., 1969, C 3 (1), p. 1.
- (12) S. STRELLA et R. ZAND, J. Polymer Sci., 1957, 25, 103.
- (13) E.S. WEST, W.R. TODD, H.S. MASON et J.T. VAN BRUGGEN, A text-book of biochemistry, Mac Millan, London, 1970, p. 326.
- (14) S. GUINAND et P. JOLIOT, J. Chim. Phys., 1957, 54, 239.
- (15) E.J. DEVELLEZ et D.R. JOHNSON, Comp. Biochem. Physiol., 1968, 24 (2), 661.