

blancs, l'homopolymère, appelé Vanacryl (Rdt : 90%) et les copolymères (ou covanacryls-p, le chiffre p indiquant le nombre de moles de monomère 1 utilisées par mole d'alcool allylique dans la copolymérisation), ces copolymères étant obtenus avec des rendements de 40 à 70 %. Les masses moléculaires moyennes \overline{M}_n observées varient de 24 500 à 54 000 et sont une fonction croissante de p.

Le monomère 1 et les différents polymères qui précèdent ont donné les analyses et les spectres IR et RMN attendus.

Fixation de l'uréase.

On agite pendant 24 heures à 4° une suspension de 100 mg de polymère et 10 mg d'uréase (de SIGMA) dans 5 cm³ d'une solution tampon phosphate 0,2 M à pH 7,5. Les dérivés insolubles obtenus sont filtrés puis lavés plusieurs fois sur verre fritté avec une solution de NaCl, M puis avec de l'eau jusqu'à ce que le dernier filtrat ne présente plus d'activité enzymatique. Les dérivés sont ensuite conservés à 4° en suspension dans l'eau distillée.

Pour mesurer l'activité des combinaisons uréase/support, on agite pendant 5 minutes une suspension de 10 mg de dérivé dans une solution tamponnée d'urée (pH 7,5). Le $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ formé au cours de la réaction est dosé au moyen du réactif de NESSLER (5). Une droite d'éta-lonnage de l'activité enzymatique en fonction de la masse d'enzyme utilisée a été tracée pour l'uréase initiale et a permis de calculer la masse m_1 d'uréase pure ayant la même activité que le dérivé insoluble. La masse m_2 d'uréase non fixée sur le polymère et présente dans les filtrats a été déterminée dans les mêmes conditions que l'uréase initiale, en admettant que l'uréase des filtrats avait conservé son activité originelle. La masse m_3 d'uréase fixée sur le polymère est donnée par la différence $m_3 = (10 - m_2)$ mg. L'activité relative r du dérivé insoluble par rapport à l'uréase de départ est donnée par le rapport $r = m_1 / (10 - m_2)$. Le taux de fixation est défini comme étant le rapport de la masse d'enzyme fixée sur le polymère à la masse d'enzyme utilisée dans la réaction de fixation. Ce taux de fixation est donc le rapport $\frac{m_3}{10} \times 100$.

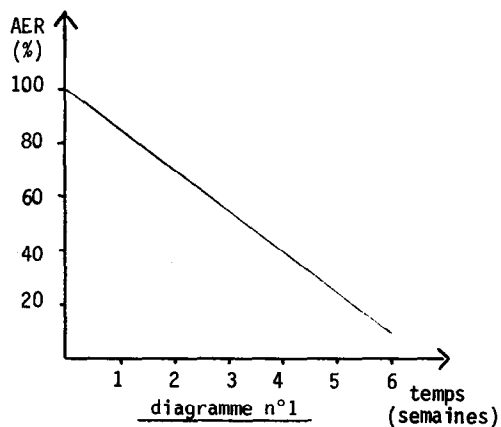
Par physisorption de l'uréase sur un polyméthacrylate de gaïacol (dépourvu par conséquent de groupements fonctionnels réactifs), nous avons constaté que moins de 10 % de l'uréase mise en jeu restait adsorbée et surtout que nous retrouvons au total toute l'activité de l'uréase utilisée, ce qui justifie a posteriori l'hypothèse que nous avons faite pour le calcul précédent de m_2 .

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

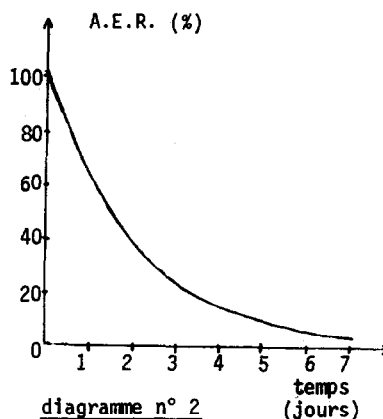
Préparation des dérivés		Caractéristiques des dérivés				
Polymère	temps et température de réaction	m ₁ (mg)	m ₂ (mg)	m ₃ (mg)	activité relative (%)	taux de fixation (%)
Vanacryl	24 h (4°)	2,5	4,3	5,7	44	57
Vanacryl	48 h (4°)	2,5	4,3	5,7	44	57
Vanacryl	48 h (20°)	1,4	5,5	4,5	31	45
Covanacryl-5	24 h (4°)	3,8	2,8	7,2	53	72
Covanacryl-3	24 h (4°)	3,4	3,8	6,2	55	62
Covanacryl-2	24 h (4°)	3,2	4,2	5,8	55	58
Covanacryl-1	24 h (4°)	3	4,5	5,5	54,5	55

Par conséquent, la fixation sur un polyaldéhyde de l'uréase par ses groupements aminés libres peut être effectuée de façon acceptable, avec un temps optimum de réaction de 24 h à 4°. La présence de groupements hydroxyles dans les copolymères augmente le taux de fixation et l'activité résiduelle de l'enzyme fixée. Avec les copolymères, le taux de fixation croît dans le même sens que le nombre de groupements - CHO présents.

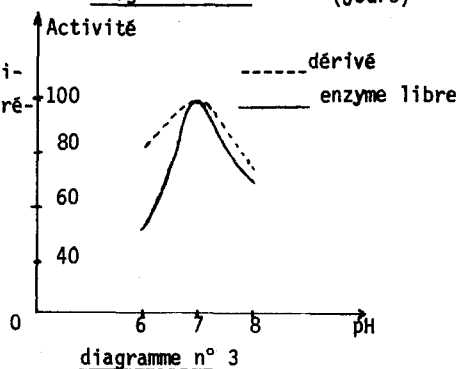
Le diagramme n°1 ci-contre montre que l'activité des dérivés diminue assez rapidement au cours du temps (ces dérivés étant maintenus en suspension dans l'eau). Cette diminution d'activité n'a pu être expliquée de façon satisfaisante.



Dans une colonne thermostatée à 30 ° contenant 100 mg d'une combinaison vanacryl/uréase mélangée à de la célite, nous avons fait percoler, en continu, une solution tamponnée (pH 7,5) d'urée, et nous avons constaté que l'activité du dérivé diminuait au cours du temps de façon plus rapide que dans le cas précédent. Ainsi, au bout de 7 jours, la colonne ne présentait plus que 5 % de son activité enzymatique initiale (diagramme 2). Cette diminution d'activité n'est pas due à une perte d'enzyme car nous n'avons jamais pu déceler de traces d'uréase dans les éluats.



Enfin, nous avons tracé la courbe de l'activité d'un dérivé uréase/covanacryl-2 en fonction du pH. L'activité maximale est observée à pH 7, de même que pour l'uréase pure (9). (diagramme n°3).



BIBLIOGRAPHIE

- (1) E. RIESEL et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1964, 239, (5), 1521.
- (2) E. KATCHALSKI et A. BAR-ELI, Brevet Britannique n° 916931, 1963 ou : J. Biol. Chem., 1963, 238, 1690.
- (3) E. KATCHALSKI et A. BAR-ELI, Brevet Israélien n° 13950, 1960 ou : Chem. Abstr. 1962, 56, 7702 h.
- (4) E. BROWN, A. RACOIS et H. GUENIFFEY, Bull. soc. chim. Fr., 1971, (12), 4341.
- (5) E. BROWN et A. RACOIS, Bull. soc. chim. Fr., 1971, (12), 4351 et 4357.
- (6) I.A. ARBUZOVA, L.I. MEDVEDEVA et S.A. PLOTKINA, Zhur. Obsheei.Khim., 1956, 26, 1127.
ou : Chem. Abstr., 1956, 50, 16 694 F.
- (7) E.C. CHAPIN et R.F. SMITH, Brevet américain n° 2817651, 1957, ou Chem. Abstr., 1958, 52, 5888 a.
- (8) P.K. SENGUPTA, A.R. MUKHERJEE et P. GHOSH, J. Macromol. Chem., 1966, I (3), 481.
- (9) W.N. FISHBEIN, J. Biol. Chem., 1969, 244 (5), 1188.