

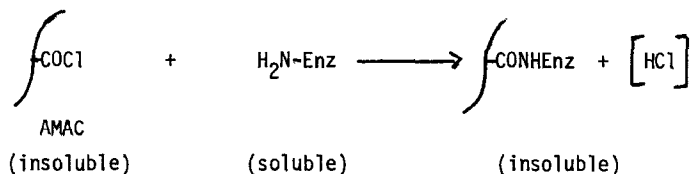
LES "AMAC" ET LEUR EMPLOI DANS LA PRÉPARATION DE DÉRIVES INSOLUBLES
DE LA CHYMOTRYPSINE

Eric BROWN et Michel PAULOUIN

Laboratoire de Synthèse Organique, Faculté des Sciences, Route de
Laval - BP 535 - 72017 - LE MANS Cédex

(Received in France 3 February 1975; received in UK for publication 12 June 1975)

Les AMAC sont obtenus par copolymérisation radicalaire de l'acrylamide (AM) et du chlorure d'acryloyle (AC). Ces polymères hydrophiles sont probablement réticulés car ils sont insolubles dans l'eau où ils gonflent en formant des gels. Les AMAC possèdent en proportions variables des groupements réactifs chlorure d'acide et sont susceptibles d'insolubiliser les enzymes selon la réaction de fixation probable :



Le greffage de chymotrypsine- α sur les divers polymères a été réalisé en solution tampon borax 0,1 M, à pH 8, pendant 15 h à 2°, en utilisant 5 mg d'enzyme pour 50 mg de polymère. Le dérivé insoluble obtenu est infiltrable, et doit être séparé par centrifugation. Il est lavé avec une solution de NaCl, M, ajustée à pH 8, puis avec de l'eau. Selon les cas, ce dérivé est conservé à l'état sec (après lyophilisation) ou en suspension aqueuse à pH 8.

L'activité chymotrypsique des dérivés insolubles a été mesurée avec un pH-stat (Radio-mètre) à pH 8, par titrage à la saide 0,1 N de l'acide carboxylique libéré par hydrolyse enzymatique de l'ester éthylique de l'Acétyl Tyrosine (ATEE) 0,015 M. Une courbe étalon a permis de calculer la masse m_1 d'enzyme non fixée sur le polymère, par mesure de l'activité chymotrypsique du filtrat de la réaction de fixation, dans les mêmes conditions que la chymotrypsine originelle. Nous avons calculé la masse m_2 d'enzyme fixée par différence entre la masse totale mise en oeuvre (5 mg) et la masse non fixée présente dans les filtrats. L'activité enzymatique du dérivé insoluble a été évaluée par rapport à celle de la chymotrypsine originelle, et dans les mêmes conditions que pour cette dernière. La fixation de la chymotrypsine- α a été effectuée en présence ou non d'un inhibiteur compétitif de cette enzyme, l'acide phényl-3 propionique.

RESULTATS

Nous avons fixé l'enzyme sur les polymères AMAC-1, AMAC-2 et AMAC-3, les indices 1, 2 et 3 représentant le nombre de moles d'acrylamide utilisées par mole de chlorure d'acryloyle dans la préparation de chaque polymère. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'AMAC-1, car c'est le plus riche en groupements chlorures d'acide (il comporte environ 3 motifs d'acrylamide par motif de chlorure d'acryloyle). La fixation de chymotrypsine varie de 0,9 mg à

1,30 mg pour 50 mg de copolymère. Le pourcentage d'activité résiduelle spécifique varie de 60 à 85 %. Avant d'être mis en présence de l'enzyme, le support est humidifié pendant une heure en solution tampon pH 8. En présence d'inhibiteur, dont le rôle est de protéger le site actif de la chymotrypsine au cours de la réaction avec le polymère, le taux de fixation de l'enzyme sur le support est légèrement inférieur mais l'activité résiduelle est plus élevée.

Dans le tableau ci-dessous, m_3 (mg) représente la masse d'enzyme native ayant même activité que le dérivé insoluble considéré ; $100 m_2/5 = \tau(\%)$ représente le taux de fixation ; $100 m_3/m_2 = \text{AER}(\%)$ représente l'activité enzymatique résiduelle spécifique et $(m_2/5) \text{AER} = \text{AT}(\%)$ représente l'activité totale du dérivé insoluble par rapport à celle de l'enzyme initialement mise en oeuvre.

Polymère	Inhibiteur	m_1 (mg)	m_2 (mg)	m_3 (mg)	τ (%)	AER (%)	AT (%)
AMAC-1	non	3,70	1,30	0,87	26	66,9	17,4
AMAC-2	non	3,90	1,10	0,76	22	68,2	15,2
AMAC-3	non	4,02	0,98	0,56	19,6	57,1	11,2
AMAC-1	oui	3,82	1,18	0,98	23,6	83	19,6
AMAC-2	oui	4,09	0,91	0,80	18,2	88	16
AMAC-3	oui	4,12	0,88	0,66	17,6	75	13,2

En faisant réagir l'enzyme sur le polymère sans humidification préalable de ce dernier, on fixe nettement plus de chymotrypsine- α (3,5 mg pour 50 mg de polymère), mais l'activité résiduelle spécifique est plus faible, si bien que globalement les résultats sont identiques.

Etude de la stabilité de l'enzyme immobilisée au cours du temps, sur une période totale de 10 semaines.

Cette étude a été faite sur le copolymère conservé en suspension dans une solution aqueuse à pH 8 et sur le copolymère conservé à 2°, après lyophilisation pendant 12 h dans un bain de glace-sel. Dans le tableau ci-dessous, l'activité de l'enzyme immobilisée a été prise arbitrairement égale à 100 au temps $t = 0$.

Temps (en semaines)		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Activité de l'enzyme immobilisée	Lyophilisée	100	96	93	91	89	87	85	84	84	83	81
	en suspension	100	90	82	79	76,5	74	71	69	68	67	65

Par conséquent la chymotrypsine immobilisée sur l'AMAC se conserve mieux à l'état lyophilisé qu'en suspension dans une solution tampon pH 8 (1 à 4).

- 1.- G. MANECKE, G. GRÜNZEL et H.J. FORSTER, *J. Polymer Sci.*, 1970, 30 (c) 607.
- 2.- M.A. MITZ et L.J. SUMMARI, *Nature*, 1961, 189, 576.
- 3.- R. AXEN et J. PORATH, *Nature*, 1966, 210, 367.
- 4.- J. GRYSZKIEWICZ, *Folia Biologica*, 1971, 19, 119.