

R

## Inmovilización de enzima fosfolipasa A<sub>2</sub>

Por **Beatriz Maroto y Celso Camusso**

Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Córdoba  
C.C. 5000 Córdoba, Rep. Argentina.  
E-mail: bmaroto@agro.uncor.edu

### RESUMEN

#### Inmovilización de enzima fosfolipasa A<sub>2</sub>

Se investigaron varios soportes para la inmovilización de fosfolipasa A<sub>2</sub> (Lecitase 100 S-NOVO), en un sistema que podría encontrar aplicaciones industriales tales como en la hidrólisis selectiva de Lecitina de soja para obtener lisofosfolípidos (lecitinas modificadas) de gran importancia en las industrias farmacéuticas y de la panificación.

Se obtuvo adsorción de enzima sobre Alumina, Silica gel, Amberlita IRA-400S, Dowex y Sephadex A-25 (los resultados indican entre un 15 y 30% de adsorción de enzima).

La reacción de inmovilización fue efectuada a temperatura ambiente con agitación magnética suave de tal manera que el soporte, 50 mg, y la enzima fueron mantenidos en un volumen total de 5 ml de buffer Tris-ClH (pH 8,65). Se efectuaron las inmovilizaciones con varias relaciones enzima-soporte y se determinó el porcentaje de adsorción con respecto al pH, la temperatura y el tiempo.

Se comparó la actividad de la enzima inmovilizada con la actividad de la enzima soluble para la hidrólisis de lecitina de soja pura en polvo.

**PALABRAS-CLAVE:** Fosfolipasa A<sub>2</sub> - Inmovilización - Soporte.

### SUMMARY

#### Phospholipase A<sub>2</sub> enzyme immobilization

A series of several supports were tested for phospholipase A<sub>2</sub> enzyme (Lecitase 100 S-NOVO) immobilization. This system would find a number of industrial applications such as the selective hydrolysis of soybean lecithin to obtain lysophospholipids (modified lecithins) of great importance in pharmaceuticals and bread making.

Successful results have been obtained from the immobilization of Phospholipase A<sub>2</sub> on Alumina, Silica gel, Amberlite IRA-400S, Dowex and Sephadex A-25 via adsorption (the results were in the range 15-30% of enzyme adsorption).

The immobilization reaction was carried out at ambient temperature, with slow magnetic agitation such that the enzyme and 50 mg support were present in the total reaction volume of 5 ml in Tris-ClH buffer (pH 8.65). Several enzyme/supports ratio and the adsorption percentage with respect to pH and temperature and time were investigated.

We have compared the behaviour of the phospholipase A<sub>2</sub> in soluble form and immobilized form toward pure powder soybean lecithin as substrate.

**KEY-WORDS:** Immobilization - Phospholipase A<sub>2</sub> - Support.

## 1. INTRODUCCIÓN

La inmovilización de una enzima presupone su anclaje a un soporte inorgánico de modo que pueda

ser usada en forma continua. En procesos que utilizan enzimas en solución, las enzimas conviven con el producto final y por lo tanto deben ser eliminadas, en cambio, en procesos con enzimas inmovilizadas éstas son retenidas dentro del reactor.

Las enzimas inmovilizadas pueden retener su actividad por mayor tiempo que aquellas en solución (Tosa, 1973), a la vez que una enzima puede ser fijada cerca de otras enzimas participantes de una secuencia catalítica, incrementando la eficiencia de la conversión.

Estas características hacen a las enzimas inmovilizadas atractivas si se quiere procesar continuamente una gran cantidad de sustrato o si las enzimas involucradas son costosas. Por otra parte, la capacidad para fijar una enzima en espacios pre-determinados y bien definidos proporciona oportunidades para aplicaciones originales de las enzimas inmovilizadas.

Las ventajas del uso de enzimas inmovilizadas se puede resumir como sigue:

1. Posibilidad de uso múltiple o repetitivo de una carga de enzimas.
2. Disponibilidad de frenar la reacción rápidamente por eliminación de la enzima de la solución de reacción.
3. En muchos casos, la enzima es estabilizada por enlaces covalentes.
4. La solución procesada no queda contaminada con las enzimas.
5. Larga vida media de la enzima con velocidades de decaimiento predecibles.

Cada uno de estos puntos contribuye a la creciente utilización de la tecnología de enzimas inmovilizadas.

Además de las ventajas económicas que pueden lograrse por la inmovilización de una enzima, se puede ejercer un control adicional sobre el grado de conversión de sustrato a productos. Cuando en una reacción se emplean enzimas solubles, la reacción se puede detener con la sola destrucción de la enzima o cambiando alguna de las condiciones del medio (pH, concentración de sal).

Cuando la enzima está inmovilizada, el grado de reacción se puede modificar alterando las velocidades de flujo de sustrato a través de enzima inmovilizada

o removiendo la enzima de la solución. Estos controles se pueden ejercer rápidamente. Por otra parte, la enzima inmovilizada puede ser más precisa y rápidamente controlada que la enzima en solución.

Así por ejemplo, la hidrólisis de Lecitina de Soja, una mezcla de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, puede llevarse a cabo mediante el uso de enzima Fosfolipasa A<sub>2</sub> en la cual se libera al ácido graso de la posición C-2 y se obtiene un producto enriquecido en lisolecitinas, con aplicaciones en la industria farmacéutica y de la panificación. La reacción que ocurre se muestra en fig. 1.

Este artículo describe el uso de distintos materiales como soportes para una Fosfolipasa A<sub>2</sub> de origen comercial (Lecitase 100-S-Novo). La inmovilización de esta enzima fue realizada por adsorción física. La afinidad del soporte para la enzima fue también estudiada evaluando la actividad enzimática a diferentes tiempos de incubación de la misma. La Fosfolipasa inmovilizada puede ser utilizada como un catalizador para la liberación de ácidos grasos de Fosfolípidos, y su actividad comparada con la de la enzima soluble.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Materiales

#### Enzima

La Enzima empleada fue una preparación comercial de Fosfolipasa A<sub>2</sub> (fosfatido-2-acil-hidrolasa E.C. 3.1.1.4) denominada Lecitase 100-S de 11000 UI/ml manufacturada por NOVO-NORDISK (1989) y obtenida a partir de páncreas de cerdo. Esta enzima actúa estereoespecíficamente sobre los 3sn-fosfoglicéridos rompiendo la unión éster del ácido graso y glicerol en la posición del C-2 (ver fig. 1).

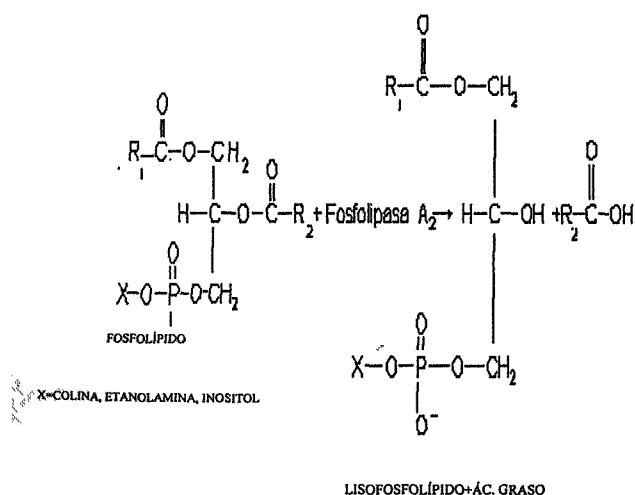


Figura 1  
Reacción de hidrólisis de una lecitina catalizada por Fosfolipasa A<sub>2</sub>

La enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> es de bajo peso molecular (kDa=14), con alto grado de enlaces por puente disulfuro y con disposición esférica, todo lo cual contribuye a definir su alta estabilidad frente al calor y a los agentes desnaturizantes (De Hass y col., 1968).

#### Soporte

Para la inmovilización de la enzima se ensayaron los siguientes soportes:

1. *DEAE Sephadex A-25* (Dietilaminoetilsephadex) (Sigma-USA) de 40-125  $\mu$ m.
2. *Sílica gel 60 70/270 mesh* (Macherey, Nagel Co).
3. *Sílica gel > 100 mesh* (Macherey, Nagel Co).
4. *Sílica gel 60 80/100 mesh* (Macherey, Nagel Co).
5. *Alúmina 70/230* (Macherey, Nagel Co).
6. *Dowex 1* (Fluka, AG): Son resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas con trimetilbenzilamonio como grupo catiónico, producido por polimerización cruzada con un 8% de divinilbenceno. Son esferas de 16-100 mesh.
7. *Dowex 21-K* (Fluka, AG): similar al anterior pero con un porcentaje no definido de divinilbenceno. Son esferas de 16-30 mesh.
8. *Dowex 50W* (Fluka, AG): Es una resina de intercambio catiónica fuertemente ácida producida por polimerización cruzada con 8% de divinilbenceno. El grupo activo es ácido sulfónico y son esferas de 0,3-0,04 mm de diámetro.
9. *Dowex 16/40 mesh* (Fluka, AG).
10. *Amberlita IRA-400S* (BDH Chemicals Ltd): Es un copolímero de estireno y divinilbenceno con propiedades de intercambiador de aniones fuertemente básico, con funcionalidad de amonio cuaternario:  
 $\delta_{\text{aparente}} = 0,70 \text{ g/ml}$   
tamaño = 0,4-0,5 mm
11. *Amberlita IRC-50AR 16-50 mesh* (Carlo Erba): Es un copolímero de ácido metaacrílico y divinilbenceno. Es una resina de intercambio catiónico débilmente ácida con funcionalismo de ácido carboxílico:  
 $\delta_{\text{aparente}} = 0,69 \text{ g/ml}$   
tamaño = 0,33-0,50 mm
12. *Tamiz Molecular 5A, de 2 mm* (Merck).
13. *Tamiz Molecular 10A, de 2 mm* (Merck).
14. *Tamiz Molecular 4A, de 2 mm* (Merck).
15. *Tamiz Molecular 3A, de 2 mm* (Merck).
16. *Chromosorb P/AW DMCS 80-100 mesh* (Merck): A base de tierra sílica (tierra de diatomeas) con superficie específica [ $\text{m}^2/\text{g}$ ] que disminuye en el orden P-A-W-G. El tipo P (de «pink» debido a su ligera coloración rosada) muestra la máxima capacidad de impregna-

ción con fases estacionarias utilizadas en cromatografía gaseosa (hasta el 30%).

AW-DMCS: material lavado con ácido y tratado con diclorodimetilsilano. Es de superficie dura y no se rompe con el manipuleo.

17. *Piedra Pómez 80-100 mesh.*
18. *Perlita.*
19. *Perlas de vidrio TMS-silanizado 140/270 mesh (Sigma).*

#### *Reactivos*

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

- Buffer Tris-HCl pH 7,55; 8,00; 8,45 y 8,65 [Tabelle per il Laboratorio-Carlo Erba]. Se controlaron utilizando un pHmetro BM 201 Biometric con electrodo de vidrio combinado, sensibilidad 0,05 unidades de pH.

#### *Sustrato*

El sustrato, *lecitina de soja pura en polvo* fue obtenido a partir de las gomas crudas secas que constituyen un subproducto de la industria aceitera (Maroto y col., 1992).

## **2.2. Metodologías**

### *Cuantificación de Fosfolipasa A<sub>2</sub>*

La concentración de Fosfolipasa A<sub>2</sub> en solución fue evaluada mediante mediciones de absorción de radiación ultravioleta utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. Spectronic 21 Bausch & Lomb.

Se determinó la longitud de onda de máxima absorbancia en tres soluciones de Fosfolipasa A<sub>2</sub>:

185 UI/ml, 277,5 UI/ml y 370 UI/ml. Se realizó un barrido de longitudes de onda entre 270 y 320 nm.

La curva de calibración Absorbancia vs. concentración de Fosfolipasa A<sub>2</sub> se determinó para valores de concentración entre 20 y 200 UI/ml.

### *Técnica de Inmovilización*

Entre los distintos métodos de inmovilización posibles se escogió el de adsorción (Kennedy y White, 1985; Reimerdes, 1989; Sardar y col., 1997).

El procedimiento seguido en la etapa de inmovilización fue el siguiente:

A una solución enzimática preparada con 5 ml de buffer Tris/HCl de pH 8,65 + 50  $\mu$ l de fosfolipasa A<sub>2</sub> se la puso en contacto con 50 mg de soporte y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 90 min. Se centrifugó 2 min. a 1500 rpm. Para cada ensayo de inmovilización se evaluó la concentración de enzima midiendo la Absorbancia de la solución a

280 nm, y luego se leyó la concentración correspondiente en la curva de calibración.

La cantidad de Fosfolipasa inmovilizada, resultó de la diferencia entre las concentraciones en la solución, antes y después de ser puesta en contacto con el soporte. El sólido fue lavado con 5 ml de buffer Tris-HCl y centrifugado nuevamente. El líquido se descartó y el soporte más la enzima inmovilizada se empleó en la reacción de hidrólisis.

Este procedimiento se repitió para cada uno de los soportes.

### *Determinación del pH Óptimo*

Con el fin de optimizar la inmovilización, y dentro del rango de pH recomendado por la bibliografía para máxima actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>, se realizaron determinaciones a los siguientes valores de pH : 7,55; 8,00; 8,45 y 8,65.

### *Determinación del tiempo de inmovilización*

Se evaluaron los siguientes tiempos de inmovilización: 30, 60, 90 y 120 minutos.

Los ensayos se llevaron a cabo poniendo en contacto 5 ml de una solución de 111 UI/ml de Fosfolipasa A<sub>2</sub> en buffer Tris-HCl pH 8,65 con 50 mg de soporte y manteniendo una agitación suave a temperatura ambiente. La solución enzimática fue cuantificada antes y después de la inmovilización. Este procedimiento se repitió para cada uno de los tiempos evaluados.

### *Cálculo del rendimiento de inmovilización*

Se realizaron ensayos de inmovilización a pH 8,65, agitando suavemente durante 90 min soluciones de Fosfolipasa A<sub>2</sub> en buffer Tris-HCl cuya concentración de enzima variaba entre 20-200 UI/ml (equivale a 10-90  $\mu$ lE/5ml buffer) con 50 mg de soporte. En cada ensayo se evaluó la cantidad de enzima adsorbida en UI/mg de soporte.

### *Reacción de hidrólisis utilizando enzima soluble*

En un recipiente provisto de agitación magnética y termostataado a 48°C se colocaron 20 ml de buffer Tris-HCl pH 8,65, 180 mg de Lecitina Pura y solución de CaCl<sub>2</sub> para hacer la concentración de Ca<sup>++</sup> = 6 mM.

A la suspensión se le agregó 5  $\mu$ l de enzima y se mantuvo la agitación durante toda la experiencia.

En cada alícuota de 2 ml extraída en función del tiempo, se detuvo la reacción de hidrólisis disminuyendo el pH hasta 2 utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Los ácidos grasos liberados fueron extraídos y valorados por titulación (Dole y Meitnertz, 1960).

### Reacción de hidrólisis utilizando enzima inmovilizada

En un sistema similar al antes descrito se repitió la experiencia utilizando como fuente de enzima la preparación inmovilizada sobre DEAE-Sephadex o sobre Alúmina. Se extrajeron las muestras y se valoraron los ácidos grasos liberados como se indicó antes.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Enzima Fosfolipasa A<sub>2</sub> presenta un espectro de absorción en la región del UV cercano con absorción característica a 210-220 y 260-280 nm, como resultado de las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los anillos aromáticos de los aminoácidos triptofano, tirosina y fenilalanina (Rao, 1970).

La relación de Absorbancias  $A_{280\text{nm}}/A_{250\text{nm}}$  determinada fue 1,80. La literatura (De Hass y col., 1968) indica para  $A_{280\text{nm}}/A_{260\text{nm}}=1,72$  y para  $A_{280\text{nm}}/A_{253\text{nm}}=1,97$ .

La curva de calibración (Absorbancia vs. concentración de enzima) resulta una línea recta en el intervalo estudiado: 20-200 UI/ml Fosfolipasa A<sub>2</sub>. En este trabajo, se midió la Absorbancia a 280 nm de los grupos aromáticos de la cadena proteica para el seguimiento del proceso de inmovilización.

Otros autores utilizaron también este procedimiento. Hertzberg y col. (1992) midieron la liberación de Lipasa confinada en perlas de alginato midiendo la Absorción de la solución acuosa a 280 nm.

En el procedimiento de inmovilización de Fosfolipasa A<sub>2</sub> sobre Agarosa se efectúa el seguimiento determinando la Absorbancia a 220nm (Lombardo y Dennis, 1965).

Las figuras 2-a/2-e muestran los resultados de inmovilización sobre distintos soportes de acuerdo al procedimiento indicado.

Todas las experiencias de inmovilización se realizaron a pH 8,65 ya que la bibliografía cita el intervalo de pH entre 8 y 9 como adecuado para las reacciones de hidrólisis enzimática, ya sea que la Fosfolipasa A<sub>2</sub> se encuentre libre (NOVO-NORDISK, 1989) o inmovilizada (Lombardo y Dennis, 1965).

De los soportes enumerados y para los cuales no se indican resultados de inmovilización la razón se debió a alguno de los siguientes factores:

- a) No se detectó adsorción de enzima en las condiciones experimentales descritas. Tal fue el caso cuando se ensayaron los soportes Chromosorb, Dowex 50W, tamiz molecular y Amberlite IRC-50.
- b) El soporte produce una turbidez que hace impracticable la lectura espectrofotométrica. Fue el caso de perlita, piedra pómez y perlas de vidrio silanizado.

Debe remarcarse que las dos resinas de intercambio catiónico utilizadas (Dowex 50W y Amberlite

IRC-50) no rindieron ningún porcentaje de adsorción de enzima.

La fig. 3 de selección de pH realizada para el soporte DEAE-Sephadex muestra que se logra la mayor adsorción de enzima precisamente en el intervalo de pH 8-9.

Este resultado debe considerarse muy importante pues se logra el mayor porcentaje de adsorción al mismo intervalo de pH para el cual la Enzima muestra la mayor actividad en reacciones de hidrólisis (Bagi y col., 1997).

Este hecho resulta en una ventaja ya que se disminuyen los fenómenos de desorción que normalmente se producen con enzimas adsorbidas y en condiciones de proceso.

De acuerdo a la fig. 4 se determinó que el tiempo de inmovilización no puede ser menor de 90 min.

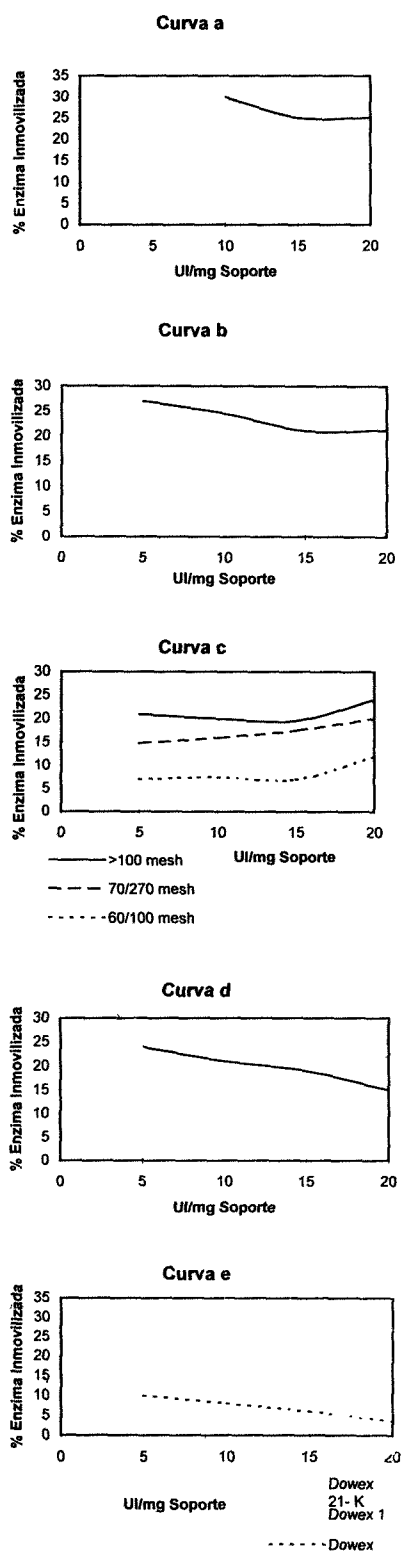
Los soportes ensayados y que resultaron efectivos en distinto grado para la inmovilización fueron los siguientes: alúmina (fig. 2a), Amberlite IRA-400s (fig. 2b), Sílica gel de distintas granulometrías (fig. 2c), DEAE-Sephadex A25 (fig. 2d) y Dowex (fig. 2e).

Se observó que excepto para el caso de sílica gel de mayor granulometría (60-100 mesh) (fig. 2c) y para Dowex (fig. 2e) todos los resultados que muestran el porcentaje de enzima inmovilizada son similares y se ubicaron en una franja que va desde el 15% al 30%, por lo que la elección de alguno de los soportes como el más adecuado para los ensayos subsiguientes resultaría de otras consideraciones distintas a las que se indican en fig. 2a/e.

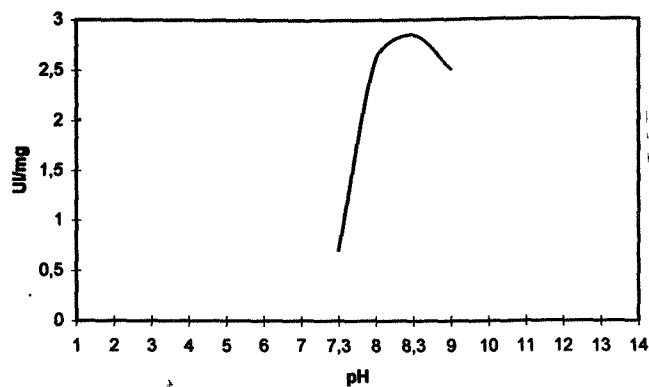
No ocurrió desorción significativa de la enzima en buffer pH 8,65 como se puede observar en la fig. 5 y esta situación es similar a la descrita por Hoq y col. (1985) durante la adsorción de lipasa proveniente de *Cándida cylindracea* sobre films de polipropileno microporoso. Esto indicaría que la adsorción física de Fosfolipasa A<sub>2</sub> sobre Sephadex por ejemplo, es un proceso cuasiirreversible y en ese sentido se adecua a la hipótesis que formulan Malcata y col. (1992), que proponen que la molécula de proteína-enzima contacta con la superficie del soporte en un sitio determinado al comienzo del proceso de adsorción y luego comienza un plegado de la misma llegando a una situación donde la proteína queda ligada por varios sitios de unión.

De esta manera, si se produce la ruptura de uno de tales enlaces, es poco probable que se efectúe simultáneamente en todos y la enzima se desprenda (Bohnert y Horbett, 1988), proceso este que fue bien estudiado junto con el reemplazo de una proteína adsorbida, por otra de mayor energía libre de adsorción que compite con la primera por los sitios de unión sobre el soporte (Norde y col., 1986; van der Padt y col., 1990).

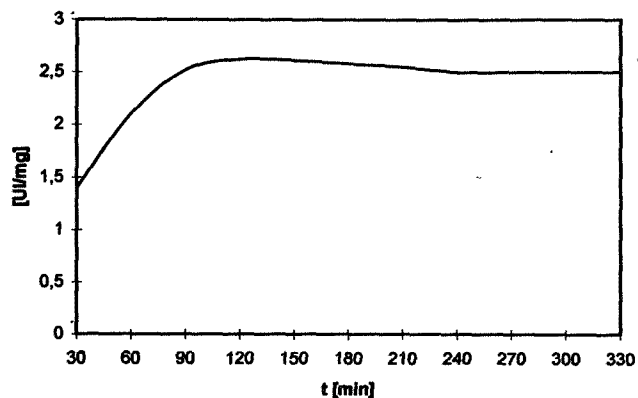
La fig. 6 muestra los resultados comparativos entre dos reacciones de hidrólisis efectuadas bajo las



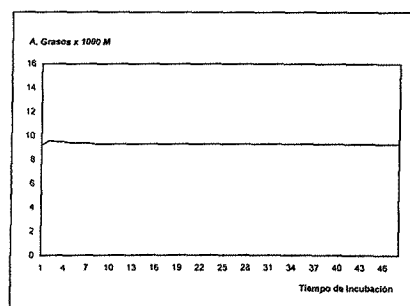
**Figura 2**  
 Porcentaje de Enzima Fosfolipasa A<sub>2</sub> (Lecitasa 100 S) inmovilizada en distintos soportes: a - Alumina, b - Amberlita IRA-400s, c - Silica Gel, d - DEAE - Sephadex, e - Dowex. Solvente: Buffer Tris-CIH pH 8,65



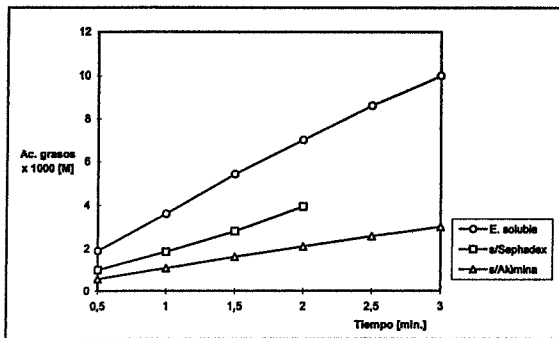
**Figura 3**  
 Influencia de pH sobre la Inmovilización de Fosfolipasa A<sub>2</sub> (Lecitasa 100S)  
 Soporte: DEAE - Sephadex Solvente: Buffer Tris-CIH



**Figura 4**  
 Influencia del tiempo sobre la Inmovilización de Fosfolipasa A<sub>2</sub> (Lecitasa 100S)  
 Soporte: DEAE - Sephadex, Solvente: Buffer Tris-CIH - pH 8.65



**Figura 5**  
 Efecto del tiempo de incubación de la Enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex para la reacción de hidrólisis  
 Solvente: Buffer Tris-CIH pH 8,65  
 Sustrato: lecitina de soja pura en polvo 0,019 M.  
 Tiempo de reacción: 10 min.



Tiempo [min]	Acidos grasos x 1000 M		
	E. soluble	E. inmovilizada	
		s/Sephadex	s/Alúmina
0,5	1,9	1	0,57
1	3,6	1,85	1,08
1,5	5,4	2,8	1,62
2	7	3,93	2,1
2,5	8,6		2,57
3	10		3

Figura 6

Progreso de la reacción de hidrólisis en función del tiempo para los sistemas

- a) Sustrato + enzima soluble  
 b) Sustrato + enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex  
 c) Sustrato + enzima inmovilizada sobre Alúmina  
 Solvente: Buffer Tris-ClH pH 8,65  
 Sustrato: lecitina de soja pura en polvo; 0,0127 M.

condiciones: sustrato + enzima soluble, (Maroto y col., 1999) y sustrato + enzima inmovilizada en DEAE Sephadex y Alúmina.

La determinación de los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada para la reacción de hidrólisis de los fosfolípidos de la lecitina de soja utilizando DEAE-Sephadex A-25 y alúmina como soportes se presentará en otro trabajo. La elección de ellos entre todos los soportes que resultaron efectivos para la inmovilización se efectuó en consideración a las excelentes propiedades mecánicas (rigidez y durabilidad), teniendo en cuenta que las reacciones de hidrólisis se realizarían en un reactor de tanque agitado. Por otra parte, tanto el DEAE-Sephadex como la alúmina han sido empleados a escala industrial (Chibata y col. 1976).

La utilización de 50 µl de Enzima en la técnica de inmovilización resultó de los ensayos de rendimiento de inmovilización realizados según las condiciones indicadas y cuyos resultados se muestran en las tablas I para inmovilización sobre DEAE-Sephadex y II para inmovilización sobre alúmina.

Se observa en ambos casos que la cantidad de enzima adsorbida por unidad de masa de soporte (expresada en mg), va aumentando conforme se incrementa la concentración de enzima de la solución hasta que la cantidad de enzima agregada llega a 50 µl (corresponde a 111 UI/ml de solución). A partir de aquí, un incremento en la concentración de enzima

no ocasiona un aumento en la cantidad de enzima adsorbida, por lo cual se considera que el soporte se encuentra en estado de «saturación».

Tabla I

#### Rendimiento de la inmovilización de Fosfolipasa A<sub>2</sub> (lecitasa 100S) sobre DEAE-Sephadex

Concentración de fosfolipasa A <sub>2</sub> [UI/ml]	Enzima adsorbida por mg de soporte [UI/mg]
22,2	0,3
44,4	0,7
66,6	1,35
88,8	2,22
111,0	2,65
133,2	2,63
155,4	2,60
177,6	2,56
199,8	2,60

Solvente: Buffer Tris-ClH pH 8,65

Tabla II

#### Rendimiento de la inmovilización de Fosfolipasa A<sub>2</sub> (lecitasa 100S) sobre Alúmina

Concentración de fosfolipasa A <sub>2</sub> [UI/ml]	Enzima adsorbida por mg de soporte [UI/mg]
22,2	0,3
44,4	0,8
66,6	1,21
88,8	2,02
111,0	2,62
133,2	2,60
155,4	2,56
177,6	2,60
199,8	2,60

Solvente: Buffer Tris-ClH pH 8,65

## 4. CONCLUSIONES

- Se seleccionó y se puso a punto un procedimiento para el seguimiento de la adsorción de enzima Fosfolipasa A<sub>2</sub> sobre el soporte lo que permitió realizar en una forma sencilla las determinaciones para la elección del pH óptimo de adsorción (entre 8 y 9) de tiempo mínimo de inmovilización (90 minutos) para el soporte y la metodología de trabajo descrita.
- Se ensayaron distintos soportes resultando efectivos para la inmovilización: alúmina, Amberlita IRA-400 S, Sílica Gel, Sephadex y Dowex. Se presentaron problemas de turbidez incompatibles con las determinaciones espectrofotométricas o no se detectó adsorción de enzima en los siguientes casos: Chromosorb, Dowex 50W, tamiz molecular, Amberlita

IRC-50, perlita, piedra pómez y perlas de vidrio silanizado.

- Los porcentajes de enzima inmovilizada (entre 15 y 30%) fueron similares para todos los soportes que resultaron efectivos. Sílica Gel 60-100 mesh y Dowex presentaron menores índices de adsorción.
- Se seleccionó DEAE-Sephadex y alúmina como los soportes más adecuados para la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada en reacción de hidrólisis de los fosfolípidos de la Lecitina de Soja en consideración al buen porcentaje de inmovilización y excelentes propiedades mecánicas.
- Si se compara el comportamiento de la enzima soluble y la enzima inmovilizada en la reacción de hidrólisis, se ve que en la segunda se manifiesta una disminución de la actividad enzimática. Entre otros motivos esto sucede porque:
  - a) las enzimas pueden estar en una configuración diferente cuando se encuentran inmovilizadas y en consecuencia, con sus constantes cinéticas,  $K_m$  y  $V$ , modificadas.
  - b) En un soporte, la interacción entre la enzima y el sustrato tiene lugar con un entorno distinto al existente en solución. Este efecto también modifica las constantes.
  - c) Habrá partición del sustrato entre el soporte y la solución tal que la concentración del mismo en la vecindad de la enzima puede ser diferente de la que existe en solución.
  - d) La reacción en el soporte sólido puede ser en alguna medida controlada por difusión.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Novo-Nordisk por proveer la enzima Fosfolipasa  $A_2$ . También a Conicor, Secyt-UNC y Conicet por el apoyo económico recibido.

## BIBLIOGRAFÍA

- K. Bagi, L.M. Simon y B. Szajani.—«Immobilization and Characterization of Porcine Lipase». *Enzyme and Microbial Technol.* **20**, 7 (1997).
- J.L. Bohnert y T.A. Horbett.—«Changes in Adsorbed Fibrinogen and Albumin Interactions with Polymers Indicated by Decreases in Detergent Elutability». *J. Coll. Interf. Sci.* **111**, 363 (1988).
- I. Chibata and T. Tosa en—«Immobilized Enzyme Principles», edited by L.B. Wingard, E. Katchalski-Katzir y L. Goldstein, Academic Press, NY, p. 329 (1976).
- G.H. De Hass, W. Nieuwenhuizen y L.L. Van Deenen.—«Purification and Properties of Phospholipase A from Porcine Pancreas». *Biochim. Biophys. Acta* **159**, 103 (1968).
- V. Dole y H. Meitnertz.—«Microdetermination of Long-chain Fatty Acids in Plasma and Tissues». *J. Biol. Chem.* **235**, 2595 (1960).
- S. Hertzberg, L. Kvittingen, T. Anthonsen y G. Skjak-Braek.—«Alginate as Immobilization Matrix and Stabilizing Agent in a Two-Phase Liquid System: Application in Lipase-Catalysed Reactions». *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 42-47 (1992).
- M.M. Hoq, H. Tagami, T. Yamane and S. Shimizu.—«Bioreactor for Enzymatic Reaction of Fat and Fatty Acid Derivatives. Part II. Some Characteristics of Continuous Glycerides Synthesis by Lipase in a Microporous Hydrophobic Membrane Bioreactor». *Agric. Biol. Chem.* **49**, 335 (1985).
- J.F. Kennedy, C.A. White.—«Principles of immobilization of Enzymes» in Handbook of Enzyme Biotechnology, A. Wiseman Ed., Wiley & Sons (1985).
- D. Lombardo y E.A. Dennis.—«Immobilized Phospholipase  $A_2$  from Cobra Venon». *J. Biol. Chem.* **260**, (30) 16114-21 (1965).
- F.X. Malcata, H.S. García, C.G. Hill y C.H. Amundson.—«Hydrolysis of Butteroil by Immobilized Lipase Using a Hollow-Fiber Reactor. Part I-Lipase Adsorption Studies». *Biotech. and Bioeng.* **39**, 647 (1992).
- B. Maroto, C. Camusso y R. Madoery.—«Purificación de Lecitina de Soja. I: Selección de Equipamiento y Determinación de Condiciones Operativas II: Obtención de Diagrama de Equilibrio». *Grasas y Aceites* **43** (1) 6-10 (1992).
- B. Maroto, M. Minchiotti y C. Camusso.—«Estudio Cinético de la Hidrólisis Enzimática de Lecitina de Soja Pura En Polvo». En Prensa, Información Tecnológica, Chile (1999).
- W. Norde, F. Mac Ritchie, G. Nowicka y J. Lyklema.—«Protein Adsorption at Solid-Liquid Interfaces: Reversibility and Conformation Aspects». *J. Coll. Interf. Sci.* **112**, 447 (1986).
- NOVO NORDISK—Lecitase—Hoja Técnica (1989).
- C.N. Rao.—«Espectroscopía Ultravioleta y Visible». Ed. Alhambra S.A. p. 280 (1970).
- E.N. Reimerdes.—«Development of an Enzymes Reactor for food chemistry» in Enzymes as Catalysis in Organic Synthesis, M.P. Schneider Ed., Reidel Pub. Co. (1989).
- M. Sardar, R. Agarwal, A. Kumar y M.N. Gupta.—«Noncovalent immobilization of enteric polymer Eudragit S-100». *Enzyme and Microbial Technol.* **20**, 5 (1997).
- Tablette per il Laboratorio—Carlos Erba.
- T. Tosa et al.—«Continuous Production of L-Aspartic acid by Immobilized Aspartase». *Biotech Bioeng.* **15**, 68 (1973).
- A. van der Padt, M.J. Edema, J.J. W. Sewalt and K. van't Riet.—«Enzymatic Acylglycerol Synthesis in a Membrane Bioreactor». *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, 347 (1990).

Recibido: Octubre 1998  
Aceptado: Mayo 1999