

## Evaluación de efectos difusionales sobre la cinética de hidrólisis de lecitina de soja con fosfolipasa A<sub>2</sub>

Por B. Maroto<sup>(1)</sup>, C. Camusso<sup>(1)</sup> y N. Zaritzky<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, c.c. 509, 5000-Córdoba, Argentina. e-mail: bmaroto@agro.uncor.edu

<sup>(2)</sup> Facultad de Ingeniería UNLP y CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata 47 y 116, 1900-La Plata, Bs. As. Argentina.

### RESUMEN

#### Evaluación de efectos difusionales sobre la cinética de hidrólisis de lecitina de soja con fosfolipasa A<sub>2</sub>.

La Fosfolipasa A<sub>2</sub>, soluble o inmovilizada, libera un mol de ácido graso de la posición C-2 de los fosfolípidos de la lecitina de soja para producir lisolecitinas. Cuando se utiliza la enzima en su forma inmovilizada, la actividad enzimática decrece debido al fenómeno de transporte de sustrato y de producto. Se evaluaron los efectos de difusión comparando los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis de lecitina de soja catalizada por fosfolipasa A<sub>2</sub> inmovilizada sobre alúmina o sobre DEAE-Sephadex, frente a los de enzima soluble. La disminución de la velocidad de reacción fue cuantificada en presencia de efectos difusionales y se calcularon los factores de eficiencia. Se determinaron los parámetros de Michaelis-Menten:  $K_M = 8.2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  y  $5.36 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  y  $V_{\max} = 7.7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  y  $9.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  para la enzima inmovilizada sobre alúmina y sobre DEAE-Sephadex, respectivamente. El factor de eficiencia fue 0.277 para alúmina y 0.376 para DEAE-Sephadex.

**PALABRAS-CLAVE:** Efectos difusionales - Factor de efectividad - Fosfolipasa A<sub>2</sub> inmovilizada - Lecitina de soja - Transporte de masa.

### SUMMARY

#### Evaluation of diffusional effects on kinetics of soybean lecithin hydrolysis using A<sub>2</sub> phospholipase .

Soluble or immobilized A<sub>2</sub> phospholipase liberates one mole of fatty acid of the C-2 position in soybean lecithin phospholipids to product lysolecithins. When using the enzyme in its immobilized form the enzymatic activity decreases due to substrate and product transport phenomenon. By comparison of the kinetic parameters of the hydrolysis reaction catalized by A<sub>2</sub> phospholipase immobilized on alumina or on DEAE-Sephadex against those of the soluble enzyme, for soybean lecithin hydrolysis reaction, the diffusive effects were evaluated. The decrease of the reaction rate was quantified in presence of diffusive effects and the effectiveness factors were calculated. The Michaelis-Menten kinetic parameters were determined:  $K_M = 8.2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  and  $5.36 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  and  $V_{\max} = 7.7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  and  $9.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  for the enzyme immobilized on alumina and on DEAE-Sephadex, respectively. The effectiveness factors were 0.277 for alumina and 0.376 for DEAE-Sephadex.

**KEY-WORDS:** Diffusional effects - Effectiveness factor - Immobilized A<sub>2</sub> phospholipase - Mass transport - Soybean lecithin.

### 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas inmovilizadas están generalmente en la superficie interna de los soportes porosos o

confinadas en matrices. Las propiedades catalíticas de estas partículas, que contienen enzimas inmovilizadas, dependen de la conjunción de dos factores: i) transporte de sustrato y producto y ii) actividad catalítica de la enzima (Bailey y Ollis, 1986).

En estos sistemas, el sustrato debe ser transportado desde el seno del líquido a la superficie del catalizador y si la mezcla está en reposo, el transporte se produce por difusión molecular. Normalmente, el mezclado o flujo de la solución introduce contribuciones de transporte convectivo. Si no existe enzima ocluida en el interior de los poros de la partícula de soporte o si el sustrato no penetra en el interior de los mismos, sólo se está en presencia de un fenómeno de transporte de masa externo. Por el contrario, si la enzima está localizada en el interior de la partícula soporte y el sustrato se debe movilizar desde la superficie al interior para que la reacción pueda ocurrir, el fenómeno es de transporte de masa interno (Abu-reesh, 1997).

Generalmente, la velocidad de reacción medida para enzimas inmovilizadas es menor que la correspondiente en ausencia de limitaciones a la difusión. El cálculo de la velocidad de desaparición de sustrato requiere la evaluación de su perfil de concentración, ya que se establecen gradientes de la misma entre el seno de la mezcla y los sitios activos de la molécula de enzima inmovilizada. El efecto observado es la disminución de la actividad. En el seno de la solución, la concentración de sustrato y otras variables de proceso pueden ser determinados por los métodos analíticos corrientes. Sin embargo, frecuentemente resulta imposible efectuar mediciones en los fluidos de la interfase ya que las diferencias de concentración tienen lugar a distancias extremadamente pequeñas (Goldstein, 1976).

Como la reacción enzimática ocurre a una velocidad determinada por la concentración de sustrato, y la velocidad de reacción local varía en función de la posición considerada, la velocidad total de consumo de sustrato es la suma de todas las velocidades de consumo de sustrato en el catalizador (Bailey y Ollis, 1986). En el estado estacionario, la velocidad de re-

acción es igual a la velocidad de transporte de sustrato al catalizador.

El presente trabajo utiliza un método analítico para la descripción y evaluación de estos procesos en un sistema compuesto por un reactor de lecho fijo de partículas soporte y material de relleno, diseñado para la hidrólisis enzimática de fosfolípidos con fosfolipasa A<sub>2</sub>. Con los factores de efectividad interno y externo es posible evaluar y cuantificar la disminución de la velocidad de reacción debido a la resistencia por difusión, tanto dentro del poro como en la interfase, calculando el factor de efectividad promedio (Engasser, 1978). Mediante este cálculo se estimaron los parámetros cinéticos intrínsecos para enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> inmovilizada sobre Alúmina y DEAE-Sephadex (B. Maroto y C. Camusso, 2000 y 2001).

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Materiales

**Enzima.** La enzima empleada fue una preparación comercial de fosfolipasa A<sub>2</sub> (fosfátido-2-acil-hidrolasa E.C.3.1.1.4) denominada Lecitasa 100-S de 11000 UI/ml, obtenida por NOVO Nordisk a partir de páncreas de cerdo. Esta enzima actúa estereoespecíficamente sobre la posición del C-2. La enzima Fosfolipasa A<sub>2</sub> es de bajo peso molecular, 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 los agentes desnaturantes (De Hass y col.; 1968).

**Soportes.** Para la inmovilización de la enzima se ensayaron diferentes soportes. La determinación de parámetros cinéticos para enzima inmovilizada se realizó sobre los soportes seleccionados (B. Maroto y C. Camusso, 2000):

- DEAE-Sephadex A-25 (dietilaminoetilsephadex) (Sigma USA): perlas de 40-125 µm.
- Alúmina 70/230 (Macherey, Nagel Co.).

**Reactivos.** Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

**Sustrato.** El sustrato, lecitina de soja pura en polvo, fue obtenido en nuestro laboratorio a partir de las gomas crudas secas por extracción con acetona en un sistema de agitación-extracción (Madoery y col., 1987; Maroto y col., 1990 y 1991 y Camusso y Maroto, 1995) y el producto se secó al vacío a 60 °C. La composición y características físico-químicas se han detallado ya en un trabajo previo (Maroto y col., 1991).

### 2.2. Métodos analíticos y de reacción

**Reacción de hidrólisis utilizando enzima soluble.** En un recipiente provisto de agitación magnética y termostatizado a 48 °C se colocaron 20 ml de

buffer Tris-HCl pH 8,65; lecitina pura y solución de CaCl<sub>2</sub> para lograr una concentración de Ca<sup>++</sup> 6mM. A la suspensión se le agregó 5 µl de enzima y se mantuvo la agitación durante toda la experiencia. En cada alícuota de 2ml 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). Las cantidades de lecitina utilizadas como sustrato fueron 90, 180, 270 y 360 mg (B. Maroto y col., 1999).

**Reacción de hidrólisis utilizando enzima inmovilizada.** La técnica de inmovilización fue por adsorción poniendo en contacto 5 ml de buffer Tris-HCl pH 8,65 y 50 µl de Fosfolipasa A<sub>2</sub> con 50 mg de soporte y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se centrifugó 2 minutos a 1500 rpm. El líquido se descartó y la enzima inmovilizada se empleó en la reacción de hidrólisis (B. Maroto y C. Camusso, 2000). En un sistema similar al antes descrito, se repitió la experiencia de hidrólisis 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 (B. Maroto y col., 2001).

**Extracción y determinación de ácidos grasos.** Cada alícuota de reacción fue tratada con 10 ml de solvente de extracción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N - hexano - isopropanol; 0,1:1:4). Se agitó nuevamente y se permitió la separación entre las fases por centrifugación. El sobrenadante fue titulado con NaOH 10<sup>-3</sup> N frente a 1 ml de azul de timol 0,01% como indicador (Dole y Meitnertz, 1960).

### 2.3. Métodos de cálculo

**Cálculo de parámetros cinéticos para fosfolipasa A<sub>2</sub> soluble.** Se efectuaron las reacciones de hidrólisis enzimáticas tratando de describir la cinética de la reacción por una ecuación cinética de primer orden u orden cero, para lo cual se empleó análisis integral. El procedimiento utilizado fue desarrollado y descrito por B. Maroto y col. (1999).

**Cálculo de parámetros cinéticos para fosfolipasa A<sub>2</sub> inmovilizada.** Debido a los gradientes de concentración de sustrato descritos, en la vecindad de la enzima enlazada y los poros de la partícula soporte, la velocidad de reacción (v) es menor que en ausencia de efectos difusionales (V). Para cuantificar esta disminución se define el factor de efectividad como:

$$\eta = v/V \quad \text{ecuación 1}$$

Las contribuciones a esta disminución de la actividad, respecto de los gradientes de concentración externos e internos, se pueden separar definiendo

un factor de efectividad externo ( $\eta_e$ ) y otro factor de efectividad interno ( $\eta_i$ ), tal que:

$$\eta = \eta_e \cdot \eta_i \quad \text{ecuación 2}$$

Los valores de estos factores se pueden calcular para parámetros de transporte conocidos ( $K_s$  y  $D_{es}$ ) y constantes cinéticas intrínsecas ( $K_m$  y  $V_m$ ).

#### Cálculo de parámetros de transporte

Transporte de masa externo: para evaluar la importancia de la difusión externa es necesario estimar gráficamente el factor de efectividad externo ( $\eta_e$ ) según la Fig.1, a partir de la cual se puede calcular la relación entre la actividad observada ( $V$ ) y la velocidad máxima de transporte de sustrato externo  $A_p \cdot K_s \cdot S_0$  y determinar el factor de eficiencia externo ( $\eta_e$ ) para una concentración normalizada del seno de la solución,  $S_0/K_m$ . El valor intrínseco de  $K_m$  de la enzima enlazada puede ser tomado, como una primera aproximación, igual al  $K_m$  de la enzima soluble (Engasser, 1978). Para calcular el término  $A_p \cdot K_s \cdot S_0$ , se requieren conocer las variables listadas en la tabla I.

Se supone que la enzima está sólo fijada a la superficie externa de la partícula soporte y en consecuencia sólo se deberá considerar transporte de masa desde el seno de la solución hacia la superficie del soporte.

El transporte de sustrato por difusión molecular y convección turbulenta está expresado por el coeficiente de transferencia de masa externo  $K_s$  y puede calcularse para partículas esféricas en solución (Brian y Hales, 1969):

$$(K_s \cdot dp / D_{so})^2 = 4 + 1,21 (dp \cdot U / D_{so})^{2/3} \quad \text{ecuación 3}$$

donde

$$U = \frac{g \cdot dp^2 \cdot \Delta \rho}{2} 18 \mu \quad \text{ecuación 4}$$

En el estado estacionario, el sustrato no se acumula en la interfase ya que la velocidad de aporte de

sustrato por transferencia de masa debe ser exactamente contrabalanceada por la velocidad de consumo de sustrato en la interfase. Igualando entonces la ecuación de Nernst (que relaciona el movimiento de  $N$  moles de sustrato por unidad de tiempo y área desde la solución a la interfase) con la ecuación de velocidad para una cinética de Michaelis-Menten (B. Maroto y col., 1999 y 2000), se obtiene:

$$A_p k_s (S_0 - s) = v = \frac{V_s}{(K_m + s)} \quad \text{ecuación 5}$$

la cual puede reescribirse en términos de Lineweaver y Burk (1934).

A partir de esta ecuación Engasser (1978) construyó el diagrama representado en la Fig. 1, para evaluar el coeficiente de eficiencia externo. De las ecuaciones 3 y 4 se estima el valor de  $K_s$ , considerando  $D_{so}$  como la difusividad del sustrato en el seno de la solución, el cual se estima a partir de la correlación Wilke -Chang para pequeñas moléculas en solventes de bajo peso molecular (Liley y Gambill, 1982):

$$\frac{(D_{so} \cdot \mu)}{T} = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{(X \cdot M)^{0,5}}{V_b^{0,6}} \quad \text{ecuación 6}$$

Transporte de masa interno: el factor de efectividad no puede ser evaluado analíticamente cuando la velocidad tiene la forma no lineal descrita por la ecuación de Michaelis-Menten. Se comienza planteando un balance de masa para el estado estacionario para una partícula esférica de catalizador poroso de radio  $R$  (Fig. 2).

Definiendo la difusividad efectiva debido a la porosidad del medio (el mismo es granular, no homogéneo) como:

$$N_s = D_{es} \frac{ds}{dr} \quad \text{ecuación 7}$$

Tabla I

#### Variables y parámetros necesarios para determinar la magnitud de fenómenos de difusión

Efectos de difusión externos	Efectos de difusión internos y externos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad Enzimática</li> <li>• Concentración de sustrato en el seno de la solución, <math>S_0</math></li> <li>• Área superficial externa <math>A_p</math></li> <li>• Coeficiente de transporte externo del sustrato, <math>k_s</math></li> <li>• Constante de Michaelis para enzima enlazada, <math>K_m</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actividad Enzimática</li> <li>• Concentración de sustrato en el seno de la solución, <math>S_0</math></li> <li>• Área superficial externa <math>A_p</math></li> <li>• Coeficiente de transporte externo del sustrato, <math>k_s</math></li> <li>• Constante de Michaelis para enzima enlazada, <math>K_m</math></li> <li>• Radio de la partícula, <math>R</math></li> <li>• Volumen medio del poro, <math>v_p</math></li> <li>• Difusividad interna del sustrato, <math>D_{es}</math></li> </ul>

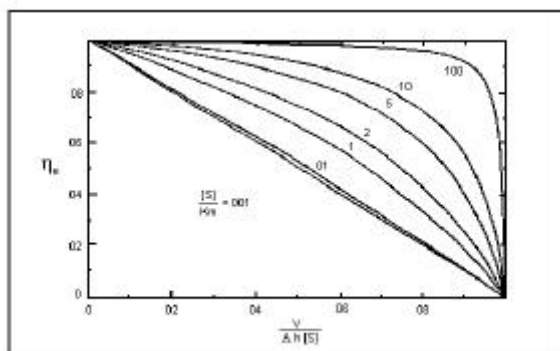


Figura 1  
Diagrama para la evaluación del factor de eficiencia externo con una cinética de Michaelis Menten (transcrito de S. M. Engasser, 1978).

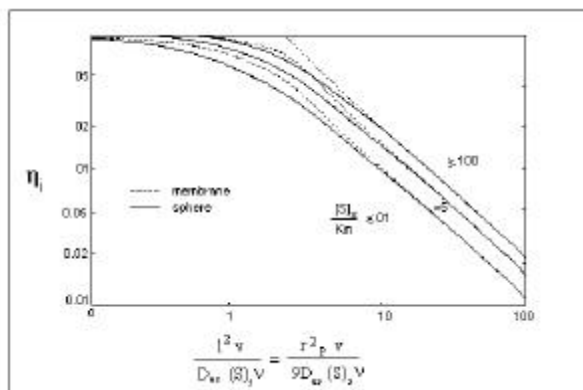


Figura 3  
Diagrama para la evaluación del factor de eficiencia interno con cinética de Michaelis-Menten (transcrito de S. M. Engasser , 1978).

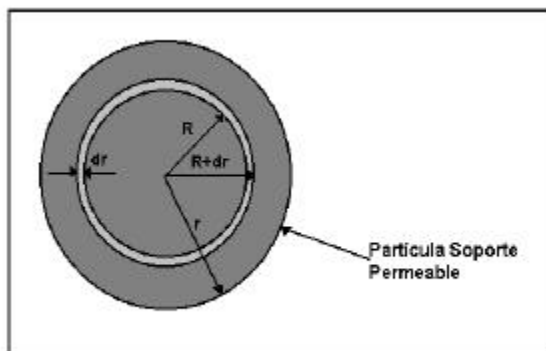


Figura 2  
Partícula esférica de un catalizador poroso, en la que tiene lugar la difusión a través del espesor dr.

se escribe el balance de masa tomando  $\lim dr \rightarrow 0$  según:

$$- Des \cdot \left( \frac{d^2s}{dr^2} + 2 \frac{ds}{rdr} \right) = v \quad \text{ecuación 8}$$

Resolviendo numéricamente esta ecuación, Bailey y Ollis (1986) construyeron un diagrama para la resolución gráfica del factor de eficiencia interno para cinéticas de Michaelis-Menten (Fig. 3). En la tabla I se listan los parámetros necesarios para estimar este factor.

Asumiendo en primera instancia que la concentración de sustrato en la interfase de la superficie externa del soporte es igual a la concentración del sustrato  $S_0$  en el medio líquido que baña la partícula, la velocidad volumétrica promedio de utilización de sustrato  $v_0$  es proporcional al flujo de sustrato difusivo en el soporte y se obtiene de la ecuación 8 como sigue:

$$v_0 = A_p/v_p \left( Des \cdot ds/dr \right) |_{r=R} \quad \text{ecuación 9}$$

donde  $V_p$  y  $A_p$  representan el volumen de la partícula y el área superficial externa, respectivamente. El coeficiente de difusión efectivo para el sustrato  $D_{es}$  puede ser escrito como:

$$D_{es} = D_{s0} \cdot \varepsilon_p / \tau \quad \text{ecuación 10}$$

donde  $\varepsilon_p$  es el parámetro de porosidad, cuyo valor generalmente oscila entre 0,3 y 0,8 (Fromet y Bischoff, 1979) y  $\tau$  es el factor de tortuosidad que se asume en el rango de 1,4 y 7 (Fromet y Bischoff, 1979; Bailey y Ollis, 1986). El valor de  $D_{es}$  resulta entre 1/2 y 1/5 de  $D_{s0}$  (Engasser, 1978).

Para calcular el valor de la abscisa de la Fig. 3, se recalcula la concentración de sustrato en la superficie externa de la partícula como una función del transporte difusivo externo utilizando la ecuación 5 descrita anteriormente. De esta manera, se determina el factor de efectividad interno para una partícula esférica a valores normalizados de sustrato en la superficie,  $s/K_m$  (Fig. 3).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

El principal propósito de este estudio fue puntualizar la influencia que el proceso de transporte de masa puede tener sobre la relación entre la actividad catalítica aparente y el medio ambiente del catalizador. Las conclusiones que se alcanzan acerca de la respuesta de la enzima inmovilizada sólo son válidas para la formulación dada del catalizador y debe tenerse bien presente que cualquier cambio en la composición del sustrato, cambio en el tamaño de la partícula, en el diámetro de los poros o cambio en la cantidad de enzima adsorbida sobre la partícula o en su distribución, alterará la respuesta del catalizador en lo referente a los valores determinados previamente.

Con los datos indicados en la tabla II y utilizando los procedimientos analíticos y gráficos descritos en

Tabla II  
**Cálculo del coeficiente de transporte externo**  
 (a- Lange, M. A., 1969; b- Liley, P. E. y Gambill, W. R., 1982).

	SOPORTE	
	DEAE-Sephadex	Alúmina
g		981 cm s <sup>-2</sup>
dp	8 · 10 <sup>-3</sup> cm	10,5 · 10 <sup>-3</sup> cm
Δρ		0,25 g cm <sup>-3</sup>
μ (50 °C)		0,549 g cm <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> (a)
Vb		710 / 0,96 = 740
M		18
T		323 K
X		1,9 (b)
D <sub>so</sub> (calculado)		4,83 · 10 <sup>-6</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
U (calculado)		1,59 · 10 <sup>-3</sup> cm s <sup>-1</sup>

Tabla III  
**Determinación de la concentración de sustrato (s) en la superficie catalítica**

v <sup>*</sup> [mol.l <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ]	s <sub>o</sub> <sup>*</sup> [mol.l <sup>-1</sup> ]	s [mol.l <sup>-1</sup> ]
1,62 · 10 <sup>-5</sup>	0,025	0,0244
1,877 · 10 <sup>-5</sup>	0,019	0,0183
1,254 · 10 <sup>-5</sup>	0,0127	0,0122
0,626 · 10 <sup>-5</sup>	0,00634	0,0061

a) para Alúmina (A<sub>p</sub> = 3,46 · 10<sup>-4</sup> cm<sup>2</sup>).

v <sup>*</sup> [mol.l <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ]	s <sub>o</sub> <sup>*</sup> [mol.l <sup>-1</sup> ]	s [mol.l <sup>-1</sup> ]
3,58 · 10 <sup>-5</sup>	0,025	0,018
3,355 · 10 <sup>-5</sup>	0,019	0,0171
2,243 · 10 <sup>-5</sup>	0,0127	0,0114
1,155 · 10 <sup>-5</sup>	0,00634	0,0057

b) para DEAE-Sephadex (A<sub>p</sub> = 2,0 · 10<sup>-4</sup> cm<sup>2</sup>).

\* valores determinados en experiencias previas (Maroto y col., 2001).

la sección anterior resultaron los valores de coeficiente de transporte externo (K<sub>s</sub>) de 1,52 · 10<sup>-3</sup> y 1,30 · 10<sup>-3</sup> cm · s<sup>-1</sup> para enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex y sobre Alúmina, respectivamente. Consecuentemente obtenemos:

K<sub>s</sub> · A<sub>p</sub> = 0,0182 l · min<sup>-1</sup> para la enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex y

K<sub>s</sub> · A<sub>p</sub> = 0,027 l · min<sup>-1</sup> para la enzima inmovilizada sobre Alúmina.

De la primera igualdad de la ecuación 5 se obtienen los valores de la concentración de sustrato en la superficie catalítica. Los resultados se resumen en la tabla III, así como también los valores de velocidad utilizados en el cálculo (v), que fueron obtenidos en trabajos anteriores (B. Maroto y col., 1999 y 2000).

Reescribiendo la segunda igualdad se obtiene la figura 4, que representan la gráfica de Lineweaver-Burk. Los parámetros cinéticos obtenidos para fosfo-

lipasa A2 inmovilizada sobre Alúmina y DEAE-Sephadex, libre de efectos difusionales externos se resumen en la tabla IV y se comparan con los obtenidos para la enzima soluble (B. Maroto y col., 1999).

El valor de K<sub>m</sub> para la enzima soluble es similar a los valores obtenidos para la enzima inmovilizada indicados más arriba para Alúmina y DEAE-Sephadex. Barman (1969) obtuvo valores del mismo orden para K<sub>m</sub> y V para enzima soluble.

La determinación del verdadero valor de K<sub>m</sub> juega un importante papel en el modelo de difusión-reacción ya que es una característica del sitio enzimático. La determinación de su valor, por lo tanto, constituye una parte integral del estudio comparativo de una propiedad enzimática en solución y en fase insoluble (Bunting y Laidler, 1972; Kobayashi y Moo-Young, 1973).

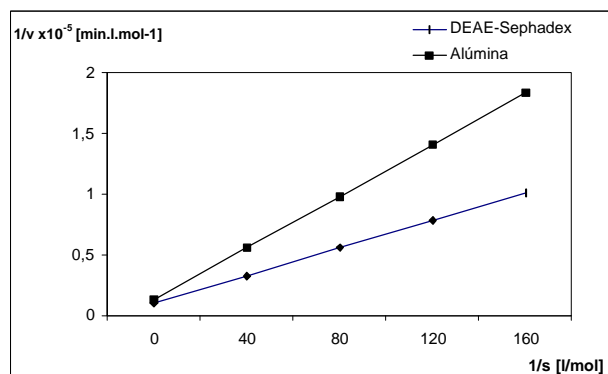


Figura 4

Gráfico de Lineweaver-Burk para la enzima inmovilizada.

Estimación de parámetros lineales para Alúmina:

Pendiente ( $K_m/V$ ) = 1067,22

Ordenada al origen ( $1/V$ ) = 12971

Coefficiente de correlación = 0,995

Estimación de parámetros lineales para DEAE-Sephadex:

Pendiente ( $K_m/V$ ) = 564,27

Ordenada al origen ( $1/V$ ) = 10527,25

Coefficiente de correlación = 0,986

La evaluación de los factores de efectividad externa e interna se resume en la Tabla V y fue realizada de acuerdo al procedimiento indicado en la sección anterior.

El fenómeno de difusión externa, que constituye un factor de gran relevancia según se observa en la Tabla V, puede ser llevado a una magnitud despreciable merced a un buen agitado de la solución y entonces, el fenómeno de difusión interna, de naturaleza más compleja debe recibir una consideración más importante, particularmente cuando el fenómeno está acoplado a una reacción química.

Luego de conocido el factor de eficiencia =  $v / V$  (ecuación 1) para Alúmina y para DEAE-Sephadex, se procedió al cálculo de la velocidad  $V$  en ausencia de fenómenos difusionales:

$V_{\text{Alúmina}}$	$6,78 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
$V_{\text{DEAE-Sephadex}}$	$8,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

Puede observarse que los valores de  $V_{\text{Alúmina}}$  y  $V_{\text{DEAE-Sephadex}}$  obtenidos a partir del cálculo del factor de efectividad están en el mismo orden que los obtenidos gráficamente mediante la metodología de Lineweaver-Burk.

La suma de los efectos descritos sobre los parámetros cinéticos (Tabla VII) hacen que el valor de  $V$  esté disminuido en la enzima inmovilizada, con respecto a la enzima soluble.

#### 4. CONCLUSIONES

La solución Michaeliana es sólo válida para un medio isotrópico, homogéneo y suficientemente agitado. En un sistema heterogéneo, la cinética promedio puede no ser hiperbólica o Michaeliana (Segel, 1993).

Aunque el resultado no deja de ser un valor teórico y debido a la relativa complejidad matemática del problema, son muy pocas las referencias bibliográficas en las que se realiza un tratamiento cuantitativo del efecto combinado de la disminución de sustrato y la acumulación de producto en

Tabla IV

#### Resumen de parámetros cinéticos para Fosfolipasa A<sub>2</sub>

	$K_m$ [mol/l]	$V$ [mol.l <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
<b>Enzima soluble (Maroto y col., 1999)</b>	$9,34 \times 10^{-2}$	$5,24 \times 10^{-2}$
<b>Enzima inmovilizada</b> s/Alúmina	$8,2 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-5}$
<b>(Maroto y col., 2001)</b> s/DEAE-Sephadex	$5,36 \times 10^{-2}$	$9,5 \times 10^{-5}$

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo  
Valores experimentales obtenidos en la fig. 4.

Tabla V

#### Factores de efectividad externo, interno y global para Fosfolipasa A<sub>2</sub> inmovilizada sobre Alúmina y DEAE-Sephadex

	Alúmina	DEAE-Sephadex
$\eta_e$	0,99	0,99
$\eta_i$	0,28	0,38
$\eta$	0,277	0,376

el microentorno y su repercusión en el comportamiento cinético de enzima inmovilizada (Moo-Young y Kobayashi, 1972; Ramachandran, 1975; Guisan y col., 1981).

Los resultados están en concordancia con las previsiones teóricas (Thomas y col., 1972), aún con las limitaciones del error experimental.

Se puede concluir de acuerdo a los datos experimentales que la inmovilización altera las propiedades intrínsecas en la enzima. La inmovilización altera la forma de la ecuación que describe los efec-

tos de los parámetros de reacción sobre la actividad intrínseca de la enzima.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Novo Nordisk por proveer la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub>. También a Conicor, Secyt-UNC y Conicet por el apoyo económico recibido.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abureesh, I.M. (1997). Predicting the performance of immobilized enzyme reactors using reversible Michaelis-Menten kinetics. *Bioprocess Eng.*, **17**, 3.
- Bailey, J.E., Ollis, D. F. (1986). Design and Analysis of Biological Reactors in *Biochemical Engineering Fundamentals*. Mc Graw-Hill Chemical Engineering Series, 1<sup>st</sup> Mc Graw-Hill, Inc (USA).
- Barman, T.E. (1969). Enzyme Handbook. Vol. II. Springer-Verlag, Berlín.
- Brian, P.L.T., Hales, H. B., y Sherwood, T. K. (1969). Transport of heat and mass between liquids and spherical particles in an agitated tank. *J. Am. Inst. Chem. Eng.*, **15**, 727.
- Bunting, P.S., y Laidler, K. J. (1972). Kinetic studies on solid supported -galactosidase. *Biochemistry*, **11**, 4477.
- Camusso, C., y Maroto, B. (1995). Hydrophobic interactions in the purification of soybean lecithin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 163.
- De Hass, G.H., Nieuwenhuizeny, W., y van Deenen, L. L. (1968). Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 103.
- Dole, V., y Meitnertz, H. (1960). Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2595.
- Engasser, J.M. (1978). A fast evaluation of diffusion effects on bound enzyme activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 301.
- Froment, G.F., y Bischoff, K. B. (1979). Chemical Reactor Analysis and Design. John Wiley & Sons, USA.
- Guisan, J.M., Melo, F.V., y Ballesteros, A.Q. (1981). *Applied Biochem. Biotechnol.*, **6**, 37.
- Goldstein, L. (1976). Kinetic behavior of immobilized enzyme systems. *Meth. Enzymol.*, **44**, .
- Kobayashi, T., y Moo-Young, M. (1973). Kinetics and mass transfer behavior of immobilized invertase on ion-exchange resin on beads. *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 47.
- Lange, N.A. (1969). Handbook of Chemistry, 10<sup>th</sup> Ed. Mc Graw Hill, Inc. (USA).
- Liley, P.E., y Gambill, W. R. (1982). Chemical Engineer's Handbook. R. H. Perry y C. H. Chilton, Eds. Mc Graw-Hill, Inc (USA).
- Linerweaver, H., y Burk, D. J. (1934). Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658.
- Madoery, R., Abril, A., Cabrol, R., Camusso, C., y Maroto, B. (1987). Purificación de lecitina de soja. I. Obtención de lecitina pura en polvo. II: Obtención de fosfatidilcolina pura. *La Alimentación Latinoamericana*, **163**, 60.
- Maroto, B., Camusso, C., y Madoery, R. (1990). Optimización del proceso de purificación de lecitina de Soja. I: Diseño del equipo agitador. II: Cinética de la Extracción. *La Alimentación Latinoamericana*, **183**, 63.
- Maroto, B., Camusso, C., y Madoery, R. (1991). Purificación de lecitina de soja. I: Selección de equipamiento y determinación de condiciones operativas. II: Obtención del diagrama de equilibrio. *Grasas y Aceites*, **43**, 6.
- Maroto, B., Minchiotti, M. y Camusso, C. (1999). Estudio cinético de la hidrólisis enzimática de lecitina de soja pura en polvo. *Información Tecnológica*, **10**, 107.
- Maroto, B., y Camusso, C. (2000). Inmovilización de enzima fosfolipasa A<sub>2</sub>. *Grasas y Aceites*, **51**, 150.
- Maroto, B., Zaritzky, N., y Camusso, C. (2001). Estudio cinético de la reacción de hidrólisis de lecitina de soja pura en polvo con fosfolipasa A<sub>2</sub> inmovilizada. *Grasas y Aceites*, **52**, 33.
- Moo-Young, M., y Kobayashi, T. (1972). Effectiveness factors for immobilized enzyme reactions. *Can. J. Chem. Eng.*, **50**, 162.
- Ramachandran, P. A. (1975). *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 211.
- Segel, I. H. (1993). Enzymes Kinetics-Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzymes Systems. J. Wiley & Sons, NY.
- Thomas, D., Broun, G., y Sélégnny, E. (1972). Non enzymatic model membranes: Diffusion-reaction kinetics and phenomena. *Biochemie*, **54**, 229.

Recibido: Diciembre 2002  
Aceptado: Agosto 2003