

Estudio cinético de la reacción de hidrólisis de lecitina de soja pura en polvo con fosfolipasa A₂ inmovilizada

Por B. Maroto^{1*}, C. Camusso¹ y N. Zaritzky²

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba
C.C. 509 - 5000 - Córdoba, Rep. Argentina. e-mail: bmaroto@agro.uncor.edu

² Depto de Ingeniería Química, 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

Estudio cinético de la reacción de hidrólisis de lecitina de soja pura en polvo con fosfolipasa A₂ inmovilizada.

La enzima fosfolipasa A₂ inmovilizada promueve la reacción hidrolítica de lecitina de soja pura en polvo liberando un mol de ácido graso de la posición C-2. El principal propósito de este trabajo fue determinar los parámetros cinéticos de la reacción cuando la enzima fue adsorbida sobre alúmina o sobre DEAE-sephadex.

Las mejores condiciones para la reacción son: temperatura 45-48°C; concentración de iones Ca 6mM y pH 8,65.

Las concentraciones de sustrato ensayadas fueron 6,3; 12,7; 19 y 25 mM trabajando en un reactor tipo batch y con la enzima inmovilizada. El tiempo de incubación no modificó la actividad enzimática.

La actividad hidrolítica de fosfolipasa A₂ adsorbida sobre alúmina o sobre sephadex fue menor que la de la enzima soluble porque las propiedades intrínsecas de la enzima se modificaron con la inmovilización. Para concentraciones de sustrato entre 6 y 19 mM las constantes de velocidad para cinética de 1er orden fueron $k = 9,88 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para enzima inmovilizada sobre alúmina y $k = 1,766 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ para enzima inmovilizada sobre DEAE-sephadex.

Para los mismos soportes, pero a mayores concentraciones de sustrato (25mM) las constantes de velocidad para cinética de orden cero fueron $k = 1,62 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (alúmina) y $k = 3,58 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (DEAE-sephadex).

PALABRAS-CLAVE: Enzima inmovilizada – Fosfolipasa A₂ - Hidrólisis enzimática - Lecitina de soja.

SUMMARY

Kinetic study of soybean pure powder lecithin hydrolysis using immobilized phospholipase A₂.

Immobilized A₂ phospholipase enzyme promotes the hydrolytic reaction of pure powder soybean lecithin releasing a mole of fatty acid from C-2 position.

The main purpose of this paper was to determine the kinetic parameters of this reaction when the enzyme was adsorbed on alumina or DEAE-sephadex.

The best conditions for the reaction were: temperature: 45-48°C, Ca ions concentration: 6mM, pH: 8,65.

Tested conditions for substrate concentration were: 6,3; 12,7; 19 and 25 mM working in a batch type reactor and with the immobilized enzyme. The incubating time did not change the enzymatic activity.

The hydrolytic activity of alumina or DEAE-sephadex adsorbed A₂ phospholipase enzyme was lower than of the soluble enzyme because the intrinsic properties are modified by immobilization. For substrate concentrations ranging between 6 and 19 mM first order kinetic velocity constants were $k = 9,88 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ and $k = 1,766 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ for alumina and DEAE-sephadex respectively. For the same supports but at higher substrate concentration (25mM) the zero order kinetic velocity constants were $k = 1,62 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (alumina) and $k = 3,58 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (DEAE-sephadex).

KEY-WORDS: A₂ Phospholipase enzyme - Enzymatic hydrolysis - Immobilized enzymes - Soybean lecithin.

1. INTRODUCCIÓN

La investigación básica y aplicada dirigida a la manufactura a escala industrial de productos derivados de lípidos se ha apoyado en el excedente de grasas y aceites de los países más desarrollados (Boyce, 1984; Ishida, 1984; Neidleman et al., 1984; Nawar, 1993; Smith, 1985).

Se ha investigado bastante la posibilidad técnica y económica de la ruptura enzimática de grasas en condiciones suaves (Linfied et al., 1984; Stein, 1982; Werdelmann, 1974).

Así, por ejemplo, la hidrólisis de lecitina de soja, una mezcla de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol (Madoery *et al.* 1990) puede llevarse a cabo mediante enzima fosfolipasa A₂ que 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 (Maroto et al., 1995). Estos compuestos presentan en su estructura grupos hidrófilos y grupos lipófilos y, precisamente, esta circunstancia les confiere propiedades fisicoquímicas particulares, siendo posible su utilización como emulsionantes, humectantes y como agentes tensioactivos en general. La reacción que ocurre se muestra en fig. 1.

El uso de lipasas inmovilizadas para la modificación de grasas y aceites es actualmente un tema en expansión y existen características que hacen a es-

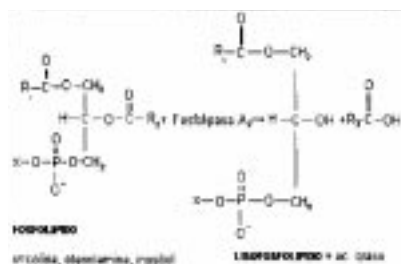


Figura 1
Reacción de hidrólisis de una lecitina catalizada por Fosfolipasa A₂.

tas enzimas; inmovilizadas particularmente adecuadas para el procesamiento industrial de grasas y aceites. Esta tecnología facilita el desarrollo de procesos comerciales continuos a gran escala los cuales tienen una más alta eficacia por unidad de volumen de reactor y una correspondiente mayor velocidad de retorno de los costos de inversión. (Malcata et al., 1990).

Dentro de los tipos de reactores enzimáticos se han estudiado bastante los que utilizan enzimas adsorbidas iónicamente (Chibata y Tosa, 1976). La inmovilización por adsorción tiene la ventaja de permitir recargar fácilmente el soporte con enzima libre cuando la capacidad de conversión de sustrato en el reactor disminuye por debajo del nivel tolerable. Para desarrollar un proceso continuo para la obtención de lisolecitinas, aplicable a escala industrial, se estudió previamente el comportamiento de fosfolipasa A₂ en la hidrólisis de lecitina de soja en el sistema sustrato+enzima soluble (Maroto et al., en prensa), determinándose, posteriormente, las condiciones de inmovilización de Fosfolipasa A₂ en un soporte inerte (Maroto y Camusso, en prensa).

El objetivo del presente trabajo es estudiar la hidrólisis de lecitina de soja pura en polvo mediante el uso de la enzima fosfolipasa A₂ inmovilizada por adsorción sobre DEAE-sephadex y sobre alúmina. Para ello se han estudiado los efectos de la temperatura de reacción, concentración de iones Ca, tiempo de incubación y concentración de sustrato, en un reactor tipo batch, sobre las constantes cinéticas de la reacción y se comparará el rendimiento de la reacción de hidrólisis entre sustrato+enzima soluble con el sistema sustrato+enzima inmovilizada.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales

Enzima fosfolipasa A₂ soluble

Se empleó fosfolipasa A₂ de 11000 UI/ml (Lecitase 100-S NOVO)

Enzima fosfolipasa A₂ inmovilizada

- Sobre DEAE-sephadex A-25 (dietilaminoetil-sephadex) perlas de 40-125µm Sigma.
- Sobre alúmina 70/230 mesh -Macherey Nagel Co.

La adsorción de la enzima se efectuó según el siguiente procedimiento: 50 mg de soporte (alúmina sephadex) se pusieron en contacto con una solución preparada con 5 ml de buffer Tris-HCl pH 8,65 y 50 µl de enzima soluble. Se mantuvo una agitación suave a temperatura ambiente durante 90 min. La enzima inmovilizada se separó por centrifugación a 1500 rpm por 2 min. El sólido se lavó con 5 ml de buffer, se centrifugó nuevamente y quedó listo para su uso.

La cantidad de enzima adsorbida se evaluó por determinación espectrofotométrica a 280 nm (Maroto y Camusso, en prensa).

Sustrato

El sustrato, lecitina de soja pura en polvo, se obtuvo a partir de las gomas crudas secas que constituyen un subproducto de la industria aceitera. (Madoery et al., 1987; Camusso y Maroto, 1995).

2.2. Metodologías

Reacción de hidrólisis utilizando enzima soluble

En un recipiente provisto de agitación magnética y termostaticado a 48°C se coloca 20 ml de buffer Tris-HCl pH 8,65, 180 mg de lecitina pura y solución de CaCl₂ para llevar la concentración de Ca⁺⁺ a 6 mM.

A la suspensión se le agrega 5µl de enzima (55 UI) y se mantiene en agitación durante toda la experiencia.

Periódicamente se extraen alícuotas de 2 ml a las que se les detiene la reacción de hidrólisis disminuyendo el pH hasta 2 utilizando H₂SO₄ 1N. Los ácidos grasos liberados se extraen y se determinan por valoración (Dole y Meitnertz, 1960).

Reacción de hidrólisis utilizando enzima inmovilizada

La experiencia se repitió en un sistema similar al anterior utilizando como fuente de enzima la preparación inmovilizada sobre DEAE-sephadex o sobre alúmina. Se empleó una cantidad de preparación que contenía adsorbida la misma cantidad de enzima que la ensayada para enzima soluble. Las cantidades de lecitina utilizadas como sustrato fueron 90, 180, 270 y 360 mg.

Las muestras se extraen y los ácidos grasos liberados se determinan como se indicó anteriormente.

Extracción y determinación de ácidos grasos

Cada alícuota de reacción de hidrólisis se trata con 10 ml de solvente de extracción (H₂SO₄ 1N - hexano - isopropanol : 0,1:1:4), se agita vigorosamente, se deja reposar y se agrega 4 ml de agua y 6 ml de hexano. Se agita nuevamente y las fases se separan por centrifugación.

El sobrenadante fue valorado con Na(OH) 10⁻³ N, usando 1 ml de azul de timol 0,01% como indicador (Dole y Meitnertz, 1960).

Cálculo de parámetros cinéticos

Las reacciones de hidrólisis enzimática se han descrito mediante una ecuación cinética sencilla de primer orden u orden cero, para lo cual se emplea análisis integral.

La reacción se representa como S → P siendo s₀ la concentración de sustrato al inicio de la reacción y P la de producto a cada tiempo.

Cuando t = 0

$$\begin{aligned} S &= s_0 \\ P &= 0 \end{aligned}$$

A cada tiempo

$$S = s_0 - P$$

a) Para cinética de primer orden:

La velocidad de formación de producto P, o de desaparición de sustrato S, es:

$$\ln\left(\frac{s_0 - P}{s_0}\right) = -k \cdot t$$

b) Para reacciones de orden cero, lo cual ocurre a concentraciones altas de sustrato, la velocidad de formación de producto P, o de desaparición de sustrato S, es:

$$s_0 - P = -k \cdot t$$

La representación de los valores de ln [(s₀ - P) / s₀] o de S frente al tiempo, (para cinética de primer orden y orden cero respectivamente), permite obtener a partir de las pendientes de las curvas, las constantes de velocidad k correspondientes.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro del rango de pH para el cual la actividad de la enzima empleada es máxima (Novo-Nordisk, 1989), se adoptó el valor 8,65 para el cual la inmovilización sobre el soporte inerte resultó óptima (Maroto y Camusso, en prensa).

El efecto de la concentración de iones calcio sobre la reacción de hidrólisis se resume en la fig. 2. La enzima requiere de dichos iones para su activación y la concentración de iones calcio más adecuada está alrededor de 6 mM, que coincide con lo indicado en bibliografía (Novo-Nordisk, 1989). Para mantener la

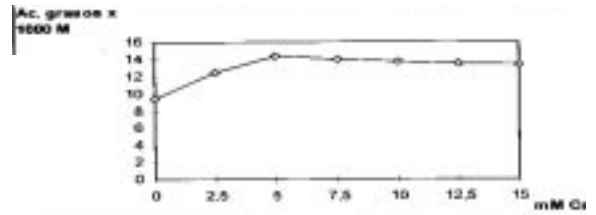


Figura 2

Estudio de la concentración de iones calcio sobre la reacción de hidrólisis con enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex para un sustrato de lecitina de soja pura en polvo (0,0127 M)

actividad hidrolítica, la concentración de iones Ca debe mantenerse constante a lo largo de la reacción ya que éstos son consumidos por los ácidos grasos liberados.

El tiempo de incubación no tiene efecto sobre la actividad de la enzima inmovilizada sobre DEAE-sephadex o sobre alúmina.

Al aumentar la temperatura, se incrementa la velocidad de las reacciones enzimáticas, pero también incrementa la velocidad de inactivación de la enzima. Estos dos factores tienen efectos opuestos en la velocidad de la reacción enzimática. En la fig. 3 se puede observar que la temperatura óptima para el progreso de la reacción fue 50°C.

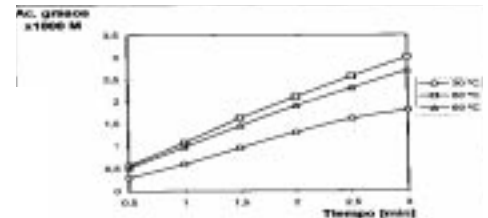


Figura 3

Efecto de la temperatura sobre la reacción de hidrólisis con enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex para un sustrato de lecitina de soja pura en polvo (0,0127 M).

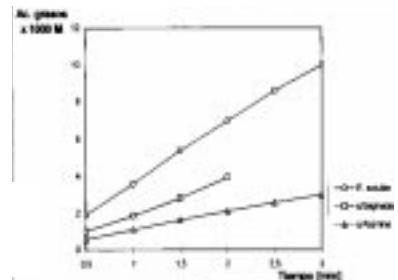


Figura 4

Reacción de hidrólisis en función del tiempo para un sustrato de lecitina de soja pura en polvo (0,0127 M) con distintas formas de utilización de la enzima: soluble o inmovilizada sobre DEAE-sephadex o alúmina

La figura 4 muestra los resultados comparativos entre las reacciones de hidrólisis efectuadas bajo las condiciones experimentales antes descritas, utilizando sustrato+enzima soluble, en un caso, y sustrato+enzima inmovilizada sobre alúmina o sobre sephadex, en el otro.

Si se comparan ambos comportamientos, se ve que en la segunda se manifiesta un descenso de la actividad enzimática, fenómeno éste que ya ha sido descrito de una manera general y para el cual se indicaron cuatro razones principales por las cuales la cinética de las enzimas inmovilizadas difiere de la cinética de las enzimas en solución (Bunting y Laidler 1972):

- a) las enzimas pueden estar en una configuración diferente cuando se encuentran inmovilizadas y en consecuencia, con sus constantes cinéticas 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) podría existir 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.

La representación de los datos para la reacción de hidrólisis con enzima soluble bajo la forma de $\ln[(s_0 - P)/s_0]$ vs. tiempo (para cinética de primer orden), permite determinar la constante de velocidad $k = 0,547 \text{ min}^{-1}$ ($r^2=0,99$).

Las figuras 5 y 6 muestran el efecto de la variación de la concentración de producto sobre el progreso de la reacción de hidrólisis utilizando enzima inmovilizada sobre sephadex y sobre alúmina, respectivamente. En estas figuras se observó que, a concentración de enzima constante, las curvas son lineales al comienzo de la reacción.

Para las menores concentraciones iniciales de sustrato: $6,34 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $12,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ y $19 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, y trabajando con enzima inmovilizada sobre ambos so-

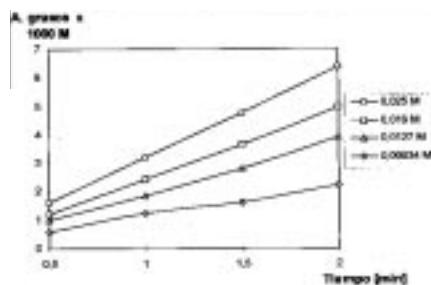


Figura 5

Reacción de hidrólisis con enzima inmovilizada sobre DEAE-sephadex para un sustrato de lecitina de soja pura en polvo.

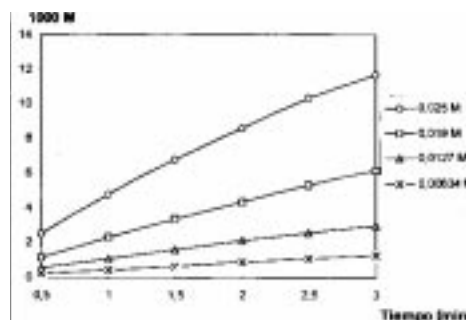


Figura 6

Reacción de hidrólisis con enzima inmovilizada sobre alúmina para un sustrato de lecitina de soja pura en polvo.

portes, las gráficas de $\ln[(s_0 - P)/s_0]$ vs. tiempo (para cinética de primer orden) ajustaron a una recta de pendiente $k = 9,88 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para alúmina y $k = 1,766 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ para DEAE-sephadex ($r^2=0,99$).

En cambio, cuando la concentración inicial de sustrato fue más alta ($25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), la mayor permitida por solubilidad, y se graficó S vs. tiempo, los datos ajustaron a una recta de pendiente $k = 1,62 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para alúmina y $k = 3,58 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para DEAE-sephadex siguiendo una cinética de orden cero ($r^2=0,99$). En la tabla I se resumen los valores obtenidos de las constantes de velocidad.

Si la reacción enzimática procede más allá de las etapas iniciales su velocidad decae. Esto se observa sobre curvas experimentales que muestran el progreso de la transformación enzimática del sustrato con el tiempo, tal es el caso por ejemplo de la hidrólisis progresiva del aceite de oliva con lipasa fungal sobre un período de 40 hs (Fukumoto *et al.*, 1963).

Tabla I
Constantes de velocidad específica para enzima soluble e inmovilizada sobre alúmina y DEAE-sephadex

		Constante de velocidad (k)
Enzima inmovilizada sobre Alúmina	Primer orden	$9,88 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$
	Orden cero	$1,62 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
Enzima inmovilizada sobre Sephadex	Primer orden	$1,766 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$
	Orden cero	$3,58 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
Enzima soluble	Primer orden	$5,47 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$

4. CONCLUSIONES

Las mejores condiciones para la reacción utilizando la enzima inmovilizada sobre DEAE-sephadex y sobre alúmina son: temperatura de trabajo de 45-48°C, concentración de iones calcio de 6mM y pH 8,65. El tiempo de incubación no disminuye la actividad.

La actividad hidrolítica de la enzima fosfolipasa A₂ adsorbida sobre DEAE-sephadex o sobre alúmina, frente a lecitina de soja pura en polvo, es menor que la de la enzima solubilizada. La inmovilización parece modificar las propiedades intrínsecas de la enzima.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Secyt-UNC, Conicor y Conicet por el apoyo económico recibido y a Novo-Nordisk por proveer la enzima fosfolipasa A₂.

BIBLIOGRAFÍA

- Boyce, C. O. L. (1984). Developing a new Industrial Enzyme Application: a strategy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**(11), 1750-3.
- Bunting, P.S. y Laidler, K.J. (1972). Kinetic Studies on Solid Supported β -galactosidase. *Biochemistry*, **11**, 4477-83.
- Camusso, C y Maroto, B (1995). Hydrophobic Interactions in the Purification of Soybean Lecithin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72**, (5) 163-5.
- Chibata, I. y Tosa, T. (1976). Immobilized Enzyme Principles edited by L. B. Wingard, E. Katchalski-Katzir y L. Goldstein, p 329, Academic Press, NY.
- Dole, V. y Meitnertz, H (1960). Microdetermination of Long-chain Fatty Acids in Plasma and Tissues. *J. Biol. Chem.* **235**, 2595 -9.
- Fukumoto, J., Iwai, M. y Tsujisaka, Y (1963). Purification and Crystallization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**, 353-61.
- Ishida, S. (1984).—Hydrolysis of Fats and Oils for Lipase. *Yushi* **37**, 47-52.
- Linfield, W.M., O'Brien, J., Serota, S. y Barauskas, R.A.(1984). Lipid-Lipase Interactions. I: Fat Splitting with Lipase from *Candida rugosa*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**(6), 1067-71.
- 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**, 60-3.
- Madoery, R., Zorrilla, C. y Camusso, C (1990). Lecitina Enriquecida en Ácido Lisofosfatídico. I: Procedimiento; II: Método para la Obtención de Ácido Lisofosfatídico. *Grasas y Aceites*. **41**, 307-12.
- Malcata, F.X, Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G., Amundson, C.H. (1990). Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils-A Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, (12) 890-910.
- Maroto, B., Camusso, C., Minchiotti, M. y Valdez, R. (1995). Modified Soybean Lecithin: Fractionation, Emulsifying Properties and Cookie Quality. *Proceed of 6th Latin American Congress and Exhibit on Fats and Oils Processing*. Campinas, Brasil, 269-71.
- Maroto, B., Minchiotti, M. y Camusso, C. (1999). Estudio cinético de la hidrólisis enzimática de Lecitina de Soja Pura en Polvo. *Información Tecnológica*, En Prensa.
- Maroto, B. y Camusso, C (2000). Inmovilización de Enzima Fosfolipasa A₂. *Grasas y Aceites* **51**(3) 150-156.
- Nawar, W.W.(1993) en Química de los Alimentos. O. R. Fennema. 157-74. Ed. Acribia. España.
- S. L. Neidleman, S.L., Geigert, J. y DeWitt, S.K. (1984). Further aspects of Wax ester biosynthesis by *Acinetobacter* sp HO1-N. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**(11) 1747-50.
- Novo-Nordisk (1989). Lecitase - Hoja Técnica.
- Smith, H.V. (1985). Oleochemicals in the Plastic Industry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62** (2), 351-5.
- Stein, W (1982). Fatty chemical and Petrochemical raw Materials - Contrast or Complement? *Fette Seifen Anstrichm.* **84**(2), 45-54.
- Werdelmann, B.W (1974). Fat and Oil Chemistry. A Vital Obligation. *Fette Seifen Anstrichm.* **76**(1) 1-8.

Recibido: Septiembre 1999
Aceptado: Febrero 2000