

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LIPOXIGENASA DE SOJA EN MICELAS
DIRECTAS Y MIXTAS
CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Analía V. Medina^{1,2}, Lucrecia L. Chaillou², Mónica A. Nazareno^{1,2}

(1) Laboratorio de Antioxidantes y Procesos Oxidativos. Instituto de Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Sgo. del Estero.

(2) INQUINOA-CONICET

Avda. Belgrano (S) 1912. C.P. 4200. Santiago del Estero, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Las lipoxigenasas (LOX), enzimas ampliamente distribuidas en el reino vegetal, son dioxigenasas, que catalizan la oxidación de ácidos grasos insaturados, que contienen el sistema 1,4-*cis,cis*-pentadieno, a sus hidroperóxidos conjugados. En vegetales, sus sustratos específicos son los ácidos linoleico y linolénico [1].

Debido a que en la matriz alimentaria estas enzimas y sus sustratos se encuentran en diferentes microfases, el estudio de su actividad *in vitro* puede llevarse cabo en sistemas micelares puros o mixtos [2].

Existen antecedentes sobre la actividad de LOX en micelas directas de Tween 20 [3]; sin embargo, es escasa la información sobre micelas mixtas [4] y no se ha informado su actividad en micelas directas de AOT.

En este trabajo se estudió la actividad enzimática de LOX extraída de porotos de soja en micelas directas y mixtas, constituidas por mezclas de surfactantes aniónicos y no iónicos, se determinaron las condiciones óptimas para su acción catalítica y los parámetros cinéticos.

METODOLOGIA

Aislamiento de LOX de soja

Se trituraron porotos de soja con 50 ml de agua ultra pura; se precipitaron compuestos fenólicos y proteínas de almacenamiento. La mezcla se centrifugó a 12.000 g por 10 min, utilizándose el sobrenadante para las determinaciones de actividad [5].

Actividad enzimática

La actividad catalítica se determinó en función de la formación de hidroperóxidos conjugados resultantes de la oxidación de ácido linoleico (AL), midiendo para ello la absorbancia, a 234 nm en 10 ciclos cada 20 s. Una unidad de actividad se define como la cantidad que causa un incremento en absorbancia de 0,001 UA/min a 25 °C en un volumen de 3 ml para 1 cm de paso óptico.

Actividad enzimática de LOX en micelas directas

Se utilizaron Tween 20 (1,2 a 13 mM) y AOT (0,5 a 25 mM) como surfactantes. Se emplearon soluciones buffer de pH comprendidos entre 6 y 11. La concentración de sustrato fue 0,42 y 1,23 mM para micelas de Tween 20 y de AOT, respectivamente.

Para micelas mixtas, se mantuvo fija la concentración de AOT en 1 mM y se varió la concentración de Tween 20 entre 0,5 y 600 µM, siendo 1,23 mM la concentración de AL.

Parámetros cinéticos

Los datos se ajustaron al modelo de Michaelis–Menten, a partir del cual se determinaron los parámetros cinéticos.

Las determinaciones se realizaron por duplicado a 25 °C

RESULTADOS

En la Fig.1 se observa una notable dependencia de la actividad de LOX, en micelas directas puras, con la naturaleza del surfactante y su concentración. Los valores obtenidos para micelas de Tween 20 son marcadamente superiores a los de AOT. A bajas concentraciones de surfactante (1 a 6 mM), se determinaron valores elevados de actividad, a continuación la actividad catalítica disminuye con el incremento de la concentración del surfactante. La máxima actividad se obtuvo para 3 mM de Tween 20 y 1 mM de AOT.

El valor de pH óptimo de la LOX de soja fue 9 en micelas puras de Tween 20 y en micelas mixtas. En micelas de AOT, las determinaciones se hicieron hasta pH 8 puesto que valores superiores producen la hidrólisis del surfactante.

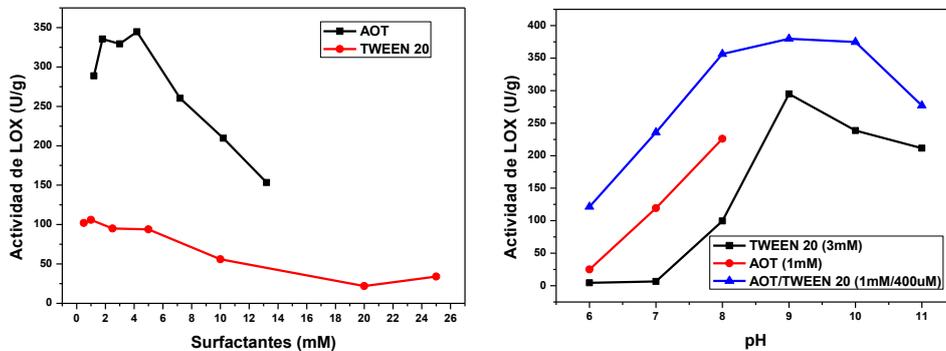


Fig.1. Efecto de la concentración de surfactante y del pH sobre la actividad de LOX.

En el caso de micelas mixtas, la presencia del cosurfactante produjo un incremento de la actividad de LOX en comparación con las micelas de AOT puro. El máximo valor de actividad observado fue 433 U/g para el sistema mixto AOT (1mM)/Tween 20 (400 μ M).

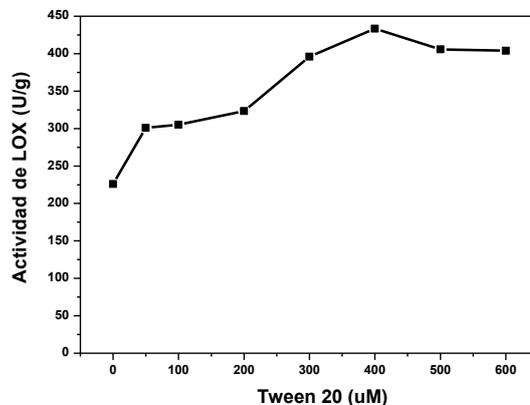


Fig.2. Efecto de la concentración del cosurfactante sobre la actividad de LOX

En la Tabla 1 se presentan los parámetros cinéticos de la enzima ajustada al modelo de Michaelis-Menten.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de LOX en micelas directas y mixta

Sistema Micelar	Parámetros		
	K_m [μM]	$V_{\text{máx}}$ [$\mu\text{M}/\text{min}$]	$V_{\text{máx}}/K_m$
Tween 20	202 \pm 104	76 \pm 12	0,4
AOT	1022 \pm 309	76 \pm 12	0,1
AOT/Tween 20	1192 \pm 225	149 \pm 17	0,1

Los valores de velocidad máxima en micelas directas son similares, mientras que los de K_m difieren, indicando que, para el mismo sustrato, el tipo de surfactante afecta la afinidad de la enzima. En el sistema mixto, la presencia del cosurfactante no modifica sustancialmente la afinidad, mientras que la velocidad máxima aumenta notablemente. La mayor afinidad se encontró en micelas de surfactante no iónico.

CONCLUSION

La actividad catalítica de LOX en micelas directas puras de Tween 20 fue mayor que en sistemas micelares de AOT puro y mixtos. Esta actividad es notablemente dependiente de la concentración de sustrato, el pH, la concentración del surfactante y cosurfactante. La adición de cosurfactantes en micelas directas de AOT aumentó la acción catalítica. En micelas de Tween 20 la enzima presenta mayor afinidad por el sustrato que en micelas de AOT y mixtas, lo que evidencia que los surfactantes aniónicos afectan negativamente la capacidad catalítica y/o estabilidad de LOX. La presencia de Tween 20 en micelas mixtas mejora la actividad. Estos resultados evidencian el efecto de la estructura y naturaleza del microambiente molecular en la actividad enzimática.

REFERENCIAS

- [1] Robinson, D. S.; Zecai, W.; Claire, D.; Rod, C. (1995). *Food Chem.*, 54, 33–43.
- [2] Ono, T.; Goto, M. (2006). *Biochem. Eng. J.*, 28, 156–160.
- [3] Schilstra, M. J.; Veldink, G.A.; Vliegthart, J. F. G. (1994). *Lipids*, 29, 225–231.
- [4] Prima-Hartley, V.; Gray, D. A.; Taylor, A. (2000). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3190–3197.
- [5] Fukushige, H.; Wang, C.; Simpson, T. D.; Gardner, H. W.; Hildebrand, D. F. (2005). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5691–5694.