

Desarrollo de un Equipo Sencillo para la Realización Simultánea de Reacciones Enzimáticas en Sistemas de Dos Fases

NESTOR O. CAFFINI, MARIA C. ARRIBERE* y NORA S. PRIOLO

Laboratorio de Botánica Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Casilla de Correo 711, 1900 La Plata, Argentina

RESUMEN. Se describe un equipo sencillo y económico que permite la realización simultánea de reacciones termostalizadas en sistemas de dos fases, especialmente apto para la determinación de actividad de enzimas cuyos sustratos no sean hidrosolubles.

SUMMARY. "Development of a Simple Equipment for Multiple Determinations of Enzyme Activity in Two-phase Systems". A simple and low-cost equipment to perform multiple thermostalized reactions in a two-phase system, specially designed for activity determination of enzymes whose substrates are not water-soluble, is described.

La determinación de la actividad de enzimas cuyos sustratos habitualmente no son solubles en agua, como ocurre en el caso de las lipasas, plantea problemas metodológicos que pueden resolverse a través de dos mecanismos alternativos: a) la dispersión del sustrato (corrientemente triglicéridos puros o aceites naturales) en una solución de goma arábica u otro agente viscosante y/o emulgente y b) la formación de un sistema de dos fases, en el que la fase acuosa contiene la lipasa y la fase solvente orgánico el sustrato disuelto. En este último caso la fase orgánica cumple con la doble función de disolver el sustrato y también los ácidos grasos que constituyen uno de los productos de la lipólisis, por lo que debe

asegurarse que ambas fases (acuosa y orgánica) estén en estrecho contacto.

Esto último se logra usualmente con un agitador magnético y una cuba de doble camisa con circulación de agua para termostatar el sistema, lo que de todos modos sólo permite la realización de una única experiencia por vez, que debe ser reproducida en tantas oportunidades como sea necesario para obtener valores confiables. El número de determinaciones simultáneas depende esencialmente de la cantidad de agitadores magnéticos disponibles, pero sin embargo ello *no asegura que todos los ensayos sean estrictamente equivalentes entre sí*, porque resulta prácticamente imposible obtener la misma velocidad de agitación en todas las

* Becaria del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires.

PALABRAS CLAVE: Sistema de Dos Fases; Sistemas Heterogéneos; Lipasas; Diseño de Equipos; Actividad Enzimática.

KEY WORDS: Two-phase system; Heterogeneous Systems; Lipases; Equipment Design; Enzyme Activity.

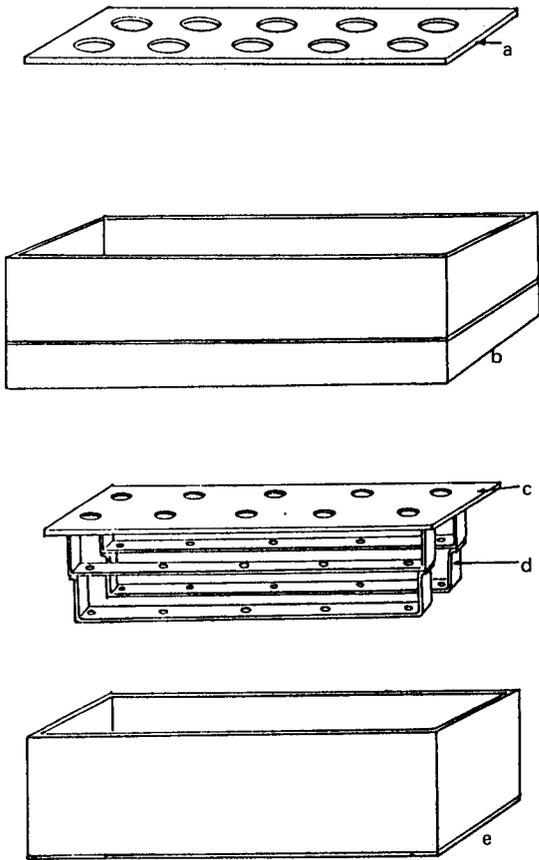


Figura 1. Detalle de las partes que componen el gabinete (ver explicación en el texto).

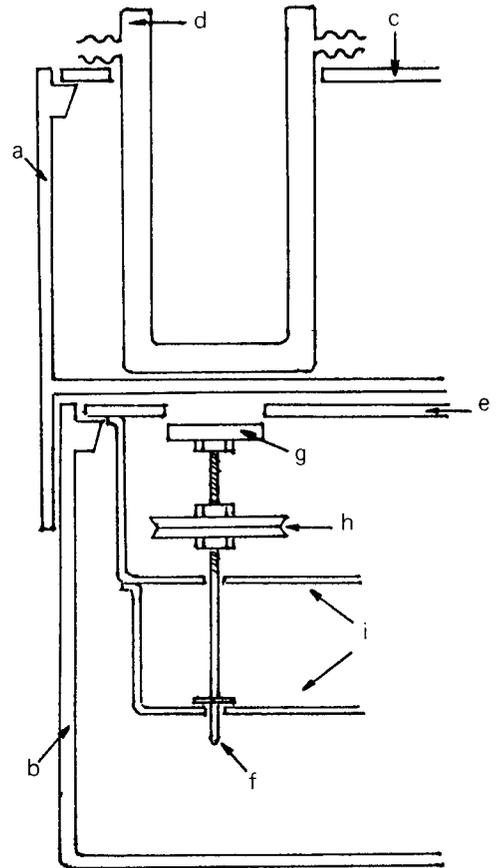


Figura 2. Corte del equipo. a: pieza superior; b: pieza inferior; c: placa perforada para mantener las cubas en posición; d: cuba de reacción de doble pared; e: placa perforada donde se fija el soporte de los agitadores; f: eje del agitador; g: imán; h: polea; i: planchuelas que funcionan como bujes y soporte de agitadores.

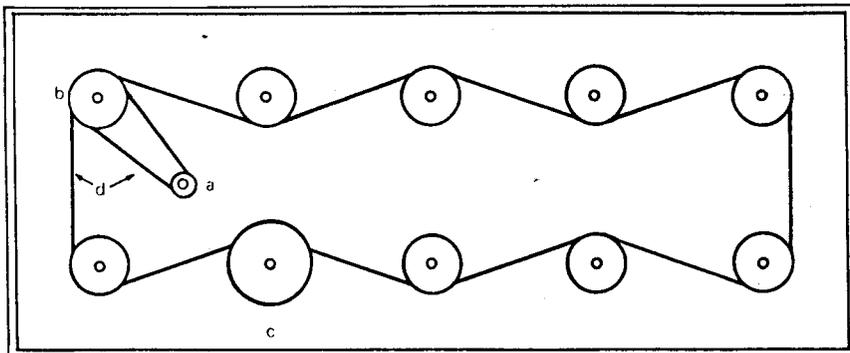


Figura 3. Vista superior de la distribución de los agitadores. a: eje y polea del motor; b: polea doble; c: generador de pulsos; d: correas.

experiencias, de lo cual depende el grado de contacto entre ambas fases.

El equipo que se describe permite la realización de diez determinaciones simultáneas con una velocidad de agitación regulable, reproducible, constante e igual en todas las cubas de reacción. La unión de todas las cubas entre sí por medio de tubos de goma asegura la termostatación de las mismas, pero si se dispone de más de un baño de circulación externa pueden realizarse determinaciones a distintas temperaturas.

El gabinete (Figura 1) está realizado totalmente en acrílico de 3,2 mm de espesor y consta básicamente de dos piezas ensamblables. La inferior (e) es una caja de 20 x 50 cm de base y 10 cm de alto y está destinada a albergar los diez agitadores y el sistema electrónico de mando y control. En la parte superior (b) la base está desplazada hacia arriba para que obre al mismo tiempo de tapa de aquélla y de soporte de las cubas de reacción. Dos planchas perforadas de acrílico completan el gabinete: una de ellas (c) cubre el dispositivo electrónico-mecánico y en su cara inferior se fijan las planchuelas (d) que actúan como sostén de los agitadores, en tanto que la otra (a) está destinada a mantener la posición de las cubas de reacción.

La Figura 2 representa un corte del equipo, donde se puede apreciar la manera en que se disponen las piezas que integran el gabinete, las cubas de reacción y los agitadores. Cada agitador está constituido por un eje de acero de 2,2 mm de diámetro y 50 mm de longitud, con los primeros 20

mm roscados, un imán de 32 x 10 x 3 mm y una polea de duraluminio de 41 mm de diámetro. El imán está soldado a una arandela plana y ésta a su vez a una tuerca que permite su unión al extremo superior del eje. Un par de tuercas con arandelas planas facilitan la fijación de la polea sobre el eje en la posición deseada. Los agitadores se mantienen en posición de funcionamiento gracias a la existencia de dos planchuelas de bronce fosforoso que actúan como bujes y sostén de los ejes.

El conjunto de agitadores se acciona a través de un único motor universal (del tipo de los que poseen los grabadores de cinta abierta), controlado por un sistema de regulación electrónica. El movimiento se multiplica en una primera polea doble (Figura 3), desde donde se distribuye a las nueve poleas restantes mediante una correa de 2 mm de espesor y 117 cm de largo.

Sobre una de las poleas está fijado un generador de pulsos conectado a un frecuencímetro compuesto por un sensor y un display digital que indica el número de revoluciones por minuto. Un regulador a transistores permite seleccionar la velocidad de agitación y una llave interruptora general desconecta el sistema para facilitar la toma de muestras.

AGRADECIMIENTOS. Al Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires por el apoyo (estímulo científico) otorgado al proyecto "Lipasas de semillas". Al Sr. Rolando Diego Natalucci, por el diseño y armado de los agitadores y del circuito de mando y control.