

**OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE INMOVILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS
ARILSULFATASA Y FOSFATASA ÁCIDA PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOFERTILIZANTES ENZIMÁTICOS.**

**FRANCISCA CAROLINA PIZARRO ESPINA
INGENIERO AGRÓNOMO**

RESUMEN

Las aplicaciones industriales de enzimas requieren de la inmovilización de estas biomoléculas para mantener su actividad por largo tiempo. Así, aplicaciones de enzimas para procesos de mineralización selectivos también requieren de la selección de materiales para su uso potencial como soporte enzimático. Con este objetivo se estudió el efecto de la inmovilización de fosfatasa ácida (FA) y arilsulfatasa (AS), enzimas que mineralizan nutrientes del suelo en alofán y dos zeolitas (Z1; Z2). Este proceso de inmovilización tiene como producto un complejo insoluble (CI) y dos residuos (sobrenadante (SN); agua de lavado (AL)). Inicialmente se inmovilizó AS en alofán (A) y dos tipos de zeolita (Z1 y Z2) a una relación enzima:soporte (E:S) de 1:1200. Los resultados indicaron que la mayor parte de la actividad AS se obtuvo de las fracciones SN y AL. Además, de los tres soportes evaluados AS presenta una mayor actividad en A. Debido a que la relación 1:1200 presentó un efecto negativo para la actividad enzimática, entonces para definir la mejor relación E:S se prepararon complejos con relaciones 1:60, 1:200 y 1:600. Los resultados mostraron para todas las relaciones E:S una actividad inferior a la actividad de la enzima libre. Sin embargo, nuevamente se observa una mayor actividad en AS inmovilizada en alofán en comparación con la enzima inmovilizada en zeolita. Por otro lado, las sumatorias de las actividades de CI, SN y AL son mayores para las relaciones 1:60 y 1:200. Además, el mayor contenido de proteína en el CI fue obtenido para las relaciones 1:60 y 1:200, por lo que la relación E:S se encuentra en este rango. Finalmente se evaluó el efecto que presenta el pH y fuerza iónica en la actividad AS libre e inmovilizada en A (relación 1:100). La mayor actividad AS inmovilizada se obtuvo en buffer 0,2M y 0,01M en pH 7,3. El porcentaje de actividad total (CI*SN*AL) de la enzima inmovilizada bajo las condiciones de buffer 0,2M y pH 7,3 fue cercana a 195% en comparación con la enzima libre (100%). Por el contrario con un buffer 0,2M y pH 8,5 la actividad de la AS inmovilizada fue cercana a 0. La cantidad de proteína de

las fracciones SN+ AL, muestra que con un buffer 0,2M y pH 7,3 se retiene un 80% de proteína en el CI. En relación a la actividad FA, se evaluaron la temperatura y la centrifugación durante el proceso de inmovilización en alofán y dos zeolitas. Los resultados indican que una vez centrifugado el CI de los 3 soportes estudiados, se pierde entre un 10-50% de la actividad obtenida sin centrifugar. Además, una vez centrifugado el CI presenta una mayor actividad a 30°C para todos los soportes. Por otro lado el CI sin centrifugar presenta una mayor actividad a 20°C. Al caracterizar tanto el alofán como las zeolitas a través de microscopía (TEM) se observó que todos los soportes presentaron un tamaño de poro cercano a 50nm, el cuál es adecuado para la inmovilización de biomoléculas.

Palabras clave: Inmovilización enzimática, fosfatasa ácida, arilsulfatasa, TEM, biofertilizante.

ABSTRACT

Industrial applications of enzymes require immobilization of these biomolecules to maintain their activity for long. Thus, applications of enzymes for selective mineralization processes also require the selection of materials for potential use as enzyme supports. To this end we studied the effect of immobilization of acid phosphatase (FA) and arylsulfatase (AS), enzymes that mineralize nutrients from soil in allophane and two zeolites (Z1, Z2). This immobilization process has as product an insoluble complex (IC) and two residues (supernatant (SN) wash water (AL)). Initially is immobilized in allophane AS (A) and two types of zeolite (Z1 and Z2) at an ratio enzyme:support (E: S) 1:1200. The results indicated that the majority of AS activity was obtained from the SN and AL fractions. The results indicate that the most of AS activity was obtained from the SN and AL fractions. Because the ratio 1:1200 presented a negative effect on enzyme activity, then to define the best ratio E: S were prepared complexes with ratios of 1:60, 1:200 and 1:600. The results showed that for all the relations E: S activity lower than the free enzyme activity. However, again there was greater activity in AS compared allophane immobilized with the enzyme immobilized on zeolite. On the other hand, the sum of CI activities, SN and AL are greater in 1:60 and 1:200 relations. In addition, higher protein content in the IC was obtained with 1:60 and 1:200 relations, so that the E: S is in this range. Finally, was evaluated the effect presented by the pH and ionic strength on the free and immobilized AS activity in A (ratio 1:100). The highest activity was obtained immobilized AS buffer 0.2 M and 0.01 M at pH 7.3. The percentage of total activity (CI * SN * AL) of the immobilized enzyme under conditions of 0.2 M buffer pH 7.3 was close to 195% compared to the free enzyme (100%). By contrast with a 0.2 M buffer pH 8.5 and the activity of the immobilized AS was close to 0. The amount of protein fractions SN + AL, shows that with 0.2 M buffer pH 7.3 and retained 80% of protein in the IC. In relation to the FA activity, we evaluated the temperature and centrifugation during immobilization in allophane and two zeolites. The results indicate that spin when the CI of the 3 media studied, a staggering 10-50% of the activity obtained without spin. In addition, once the IC has a spin greater activity at 30 ° C for all media. On

the other without centrifuge IC presents a higher activity at 20 ° C. By characterizing both the allophane as zeolites through microscopy (TEM) showed that all media had a pore size close to 50nm, which is suitable for the immobilization of biomolecules.

Keywords: enzyme immobilization, acid phosphatase, arylsulfatase, TEM, biofertilizer