

INDICE

Índice General	Páginas
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. Generalidades	4
2.1.1. Las Enzimas	4
2.1.2. Actividad enzimática en el suelo	4
2.1.3. Enzima Arilsulfatasa	5
2.1.4. Inmovilización de Enzimas	6
2.1.5. Descripción de la arcilla Alofán	9
2.1.6. Descripción de la Zeolita	10
2.1.7. El azufre en el suelo	13
2.1.8. El azufre en la planta	15
3. MATERIALES Y METODOS	18
3.1 Materiales	18
3.1.1. Enzima Arilsulfatasa	18
3.1.2. P-Nitrofenilsulfato (p-NFS)	18
3.1.3. Alofán	18
3.1.4. Zeolita	19
3.1.5. Equipo y Reactivo	19
3.1.6. Buffer Acetato de Sodio	19

3.2	Metodología	20
3.2.1	Formación complejo	20
3.2.2	Determinación de actividad enzimática	22
3.2.3	Relaciones iniciales peso/peso	22
3.2.4	Definición de relación peso/peso	23
3.2.5	Determinación Cinética enzimática	25
3.2.6	Influencia del pH en la actividad enzimática variando el pH del buffer en la formación de complejos.	25
3.2.7	Influencia del pH en la actividad enzimática variando el pH de la formación de complejos y en la solución del sustrato	25
4.	RESULTADO Y DISCUSIÓN	27
4.1	Relaciones iniciales peso/peso	27
4.2	Definición de relación peso/peso	30
4.3	Cinética enzimática	36
4.4	Influencia del pH en la actividad enzimática variando el pH del buffer en la formación de complejos	38
4.5	Influencia del pH en la actividad enzimática variando el pH de la formación de complejos y en la solución del sustrato	40
5.	CONCLUSIÓN	43
6.	BIBLIOGRAFIA	44

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Requerimientos de azufre de algunos cultivos de interés agrícola	16
Cuadro 2. Relaciones iniciales peso/peso (1:10, 1:100; 1:1000) para la relación arilsulfatasa : alofan.	22
Cuadro 3. Relaciones iniciales peso/peso (1:10, 1:100; 1:1000) para la relación arilsulfatasa : zeolita.	23
Cuadro 4. Relaciones definitivas peso/peso (1:20, 1:40; 1:60) para la relación arilsulfatasa : alofan.	24
Cuadro 5. Relaciones definitivas peso/peso (1:20, 1:40; 1:60) para la relación arilsulfatasa : zeolita.	24
Cuadro 6. Actividad relativa de las distintas fracciones, utilizando el soporte alofan.	27
Cuadro 7. Actividad relativa de las distintas fracciones, utilizando el soporte zeolita.	30
Cuadro 8. Actividad enzimática ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$) del complejo insoluble (CI), sobrenadante (SN) y agua de lavado (AL), correspondientes a los complejos Arilsulfatasa-Zeolita en distintas relaciones, 1:10; 1:100; 1:1000.	30
Cuadro 9. Actividad relativa de las distintas fracciones, utilizando soporte alofan.	31
Cuadro 10. Actividad relativa de las distintas fracciones, utilizando soporte zeolita.	34
Cuadro 11. Actividad enzimática ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$) del complejo insoluble (CI), sobrenadante (SN) y agua de lavado (AL), correspondientes a los complejos Arilsulfatasa-Zeolita en distintas razones de concentración enzima – mineral, (1:20; 1:40; 1:60).	35
Cuadro 12. Parámetros cinéticos (k_m y $V_{\text{máx.}}$) de la arilsulfatasa libre e inmovilizada.	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de inmovilización: A: Adsorción a soporte poroso o sólido, B: unión covalente a soporte poroso o sólido, C: Atrapamiento en matriz porosa polimérica, D: Confinamiento en membrana semipermeable.	8
Figura 2. Molécula de a) imogolita y b) Alofan, caracterizado por los componentes principales de Si, Al y O.	10
Figura 3. Cuboctaedros unidos, forman la estructura de la zeolita.	12
Figura 4. Interacción entre proteínas y zeolita bajo diferentes condiciones de pH.	12
Figura 5. Ciclo del azufre, con sus distintas reacciones de los compuestos azufrados	16
Figura 6. Esquema del proceso de formación de los complejos arcilla-enzima.	21
Figura 7. Actividad específica de la arilsulfatasa libre e inmovilizada en arcilla alofánica. relación 1:10, relación 1:100; relación 1:1000.	28
Figura 8. Actividad específica de la arilsulfatasa libre y sobrenadante del complejo insoluble arilsulfatasa : alofán. relación 1:10, relación 1:100; relación 1:1000.	28
Figura 9. Actividad específica de la arilsulfatasa libre T4 y Agua de Lavado del complejo insoluble arilsulfatasa : alofán. relación 1:10, relación 1:100, relación 1:1000.	29
Figura 10. Actividad específica de la arilsulfatasa libre e inmovilizada en arcilla alofánica. relación 1:20, relación 1:40; relación 1:60.	32
Figura 11. Actividad específica de la arilsulfatasa libre y sobrenadante del complejo insoluble Arilsulfatasa : Alofán. relación 1:20, relación 1:40; relación 1:60.	33
Figura 12. Actividad específica de la arilsulfatasa libre y Agua de Lavado del complejo insoluble Arilsulfatasa : alofán. De las relaciones 1:20, 1:40; 1:60.	33
Figura 13. Actividad de la arilsulfatasa libre v/s concentraciones de p-NPS.	37
Figura 14. Actividad de la arilsulfatasa inmovilizada en alofán v/s concentraciones de p-NPS.	38

Figura 15. Actividad de la enzima arilsulfatasa inmovilizada en alofán v/s distintos pH de Buffer Acetato de Na utilizados en la formación de complejos enzima : arcilla.	39
Figura 16. Actividad de la enzima arilsulfatasa libre v/s distintos pH de Buffer Acetato de Na utilizados en la formación de complejos enzima : arcilla.	40
Figura 17. Actividad de la enzima arilsulfatasa inmovilizada en alofán v/s distintos pH de Buffer Acetato de Na, utilizados en la formación de complejos enzima : arcilla y la determinación de la actividad enzimática.	41
Figura 18. Actividad de la enzima arilsulfatasa libre v/s distintos pH de Buffer Acetato de Na utilizados en la determinación de la actividad Enzimática.	42