



INGENIERÍA DE SOLVENTES PARA LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EMPLEANDO PEROXIDASAS

Berenice Trujillo Martínez, Rafael Vázquez Duhalt, Marcela Ayala Aceves. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001. C.P. 62210. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. Fax (+777)3172388. beniche@ibt.unam.mx

Palabras clave: ingeniería de solventes, peroxidasa, coeficiente de actividad termodinámica

Introducción. La peroxidasa versátil (VP) de *Bjerkandera adusta* presenta actividad de lignino y manganeso peroxidasa y es capaz de oxidar compuestos aromáticos en presencia de solventes orgánicos (1). La partición desfavorable del sustrato hacia la enzima es uno de los problemas relacionados con la catálisis en solventes orgánicos (2). La ingeniería de solventes permite seleccionar el solvente apropiado mediante una serie de criterios que toman en cuenta las propiedades tanto del solvente como del sustrato (3). En este trabajo se emplea el coeficiente de actividad termodinámica (3) con el fin de seleccionar el solvente más adecuado para la oxidación de compuestos orgánicos empleando a la VP.

Metodología. Se estimaron los coeficientes de actividad termodinámica (γ_S) mediante la relación $\gamma_S=1/SV_m$ (1), empleando un sustrato modelo: 9-metilantraceno (9MA) en solventes miscibles en agua: dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo (ACN) y tert-butanol (t-BUT), calculando la solubilidad del sustrato (S) en mezclas de solvente-agua. Se evaluó la estabilidad y actividad específica de la enzima en presencia de cada solvente orgánico. Todos los experimentos se hicieron al menos por triplicado.

Resultados y discusión. La relación entre la eficiencia catalítica de la enzima y el coeficiente de actividad termodinámica del sustrato (γ_S) en dos solventes (A y B) diferentes es (3):

$$\frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_A}{\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_B} = \frac{\gamma_{SA}}{\gamma_{SB}}$$

Dicha ecuación indica que es posible predecir en qué solvente se favorecería la actividad de la enzima, conociendo γ_S . El cuadro 1 contiene los coeficientes de actividad termodinámica (γ_S) calculados a partir de la solubilidad de 9-MA en los solventes DMSO, ACN y t-BUT a concentraciones diferentes, desde 0 a 100%.

Cuadro 1. Coeficiente de actividad termodinámica para 9MA

% Solvente	ACN	ln γ DMSO	t-BUT
0	17.22	17.22	17.22
20	13.27	13.35	13.40
50	8.65	10.52	7.84
100	3.97	1.11	5.38

Los resultados indican que el DMSO es el solvente más adecuado, debido a que un valor mayor de γ_S indicaría una partición más favorable. Para determinar el efecto de la concentración del solvente sobre la estabilidad de la VP, se midieron las constantes de inactivación en presencia de 50% v/v de cada solvente (Cuadro 2). De este cuadro, se puede inferir que para DMSO, el valor de actividad específica depende únicamente de la partición del sustrato hacia la enzima y no del efecto del solvente, como el caso del ACN y t-BUT. Tanto el γ_S como la $k_{inactivación}$ demostraron que el DMSO es un buen solvente para llevar a cabo la oxidación de 9MA. Al medir la actividad de la enzima en las diferentes mezclas, se observa que en DMSO, la actividad es mayor que en t-BUT (2.3 veces) y ACN (2.8 veces).

Cuadro 2. Constante de inactivación y actividad específica de VP con 9-MA

50% Solvente	*Actividad residual (%)	$k_{inactivación}$ (min^{-1})	Actividad específica c/9MA (min^{-1})
DMSO	96.6	-6.0E-5	71.3
t-BUT	86.6	-1.4E-3	30.7
ACN	15.1	-5.6E-2	25.1

* 1 hr de incubación en la mezcla con 50% solvente

Conclusiones. La estimación del γ_S es una herramienta útil para la selección de un solvente adecuado para las peroxidases. Basándonos en el γ_S , la estabilidad y la actividad específica, el solvente DMSO resultó ser el conveniente para llevar a cabo la oxidación de 9MA, con una actividad mayor a la reportada en 1 y 2.

Agradecimiento. Al proyecto Conacyt 56718 y a la Biol. Rosa Román por su apoyo técnico.

Bibliografía.

- (1) Wang, Y, Vázquez-Duhalt, R, Pickard, M. A. (2003). Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Can J Microbiol.* 49:675-682
- (2) Ryu, K, Dordick J. S. (1992). How do organic solvents affect peroxidase structure and function? *Biochem.* 31:2588-2598
- (3) Schmitke, J. L, Wescott, C. R, Klibanov, A. M. (1996). The mechanistic dissection of the plunge in enzymatic activity upon transition from water to anhydrous solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3360-3365