

OXIDACION DEL DIBENZOTIOFENO MEDIANTE LA ENZIMA LACASA, UTILIZANDO EL ABTS COMO MEDIADOR, EN UN SISTEMA AGUA-ACETONITRILLO

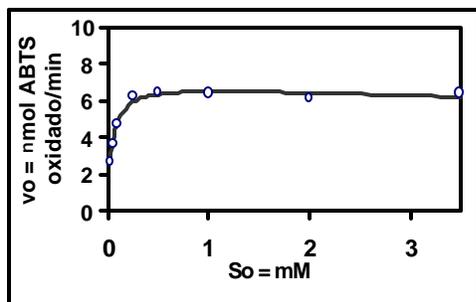
Francisco Villaseñor*, Octavio Loera, Jorge Soriano y Gustavo Viniegra. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina C.P. 09340. Mexico, D.F., Fax 58044712, vini@xanum.uam.mx. (*) Con licencia del Instituto Tecnológico de Celaya. fvo@xanum.uam.mx,

Palabras clave: lacasa, dibenzotiofeno, oxidación.

Introducción. Entre los principales compuestos contaminantes que están presentes en los combustibles fósiles se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el dibenzotiofeno (DBT) que contiene azufre y por ello es deseable eliminarlo del combustible. Por ejemplo: mediante su oxidación por la enzima lacasa (EC 1.10.3.2) utilizando mediadores tales como el 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT) y el ácido 2,2' azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ó ABTS. Majcherczyk y col. (1998) lograron oxidar acenaftileno, antraceno, benzo[a]pireno, acenafteno, naftaleno y fluoreno con 1-HBT¹. Collins y col (1996) utilizaron el ABTS para oxidar antraceno y benzo[a]pireno². Bressler y col. (2000) realizaron la oxidación del DBT catalizada por lacasa utilizando una mezcla de 1HBT y ABTS³. El objetivo del presente trabajo fue oxidar el DBT mediante la enzima lacasa, en un sistema agua-acetonitrilo y un solo mediador.

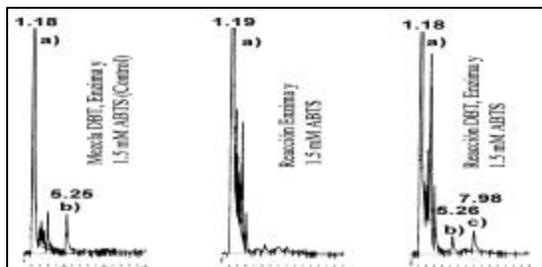
Metodología. Se usó la enzima lacasa purificada de la preparación DeniLite II S (Novo). La determinación de la actividad enzimática del ABTS se realizó por espectrofotometría. La oxidación del DBT se efectuó con la enzima lacasa (4 U/mL) y el mediador ABTS (1.5 mM) con 15% acetonitrilo y 25 µM de DBT usando un amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5, temperatura 40° C⁴. Se analizaron los productos por la cromatografía líquida (HPLC) ⁴.

Resultados y Discusión. En la **Gráfica 1** se presenta la cinética de oxidación del ABTS por la enzima lacasa. Los parámetros cinéticos fueron: $K_M = 0.037$ mM $V_{max} = 6.63$ nmol/min, con 7.04×10^{-6} mg/mL de proteína y $k_{cat} = 1330$ mol ABTS/mol E s.



Gráfica 1- Velocidad de oxidación de ABTS vs concentración de ABTS inicial.

En la **Gráfica 2** se muestran los cromatogramas de la reacción del DBT con la enzima lacasa utilizando el mediador ABTS. Durante el transcurso de la reacción, la concentración del DBT disminuyó y se generaron productos que tuvieron tiempos de retención mayores que los del DBT



Gráfica 2.- Cromatografía líquida (HPLC) de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa y ABTS. Los picos identificados corresponden a: a) ABTS, b) DBT y c) productos de reacción del DBT.

en la columna C₁₈ de fase reversa y por lo tanto fueron menos polares que éste. Esto sugiere que pueden ser polímeros derivados del DBT y quizás del ABTS, ya que la lacasa genera radicales libres que pueden polimerizar. El máximo avance de la reacción fue la desaparición completa del DBT después de 72 h de incubación.

Conclusiones. A diferencia de Bressler y col. (2000) que lograron oxidar solo el 60 % del DBT. Aquí se logró oxidar totalmente 25 µM de DBT utilizando únicamente el mediador ABTS. Por tanto sería posible usar esta reacción para eliminar el DBT de los combustibles si se optimizaran las condiciones del proceso.

Agradecimiento. Se agradece al CONACyT (beca número de registro 91901). Se agradece al IMP (proyecto Fies IMP-3287)

Bibliografía:

1. Majcherczyk, A., Johannes, C. And Hüttermann, A. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb Technol.* **22**:335-341.
2. Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A. and Dobson, A.D.W. (1996). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microb.* **62**(12):4563-4567.
3. Bressler, D.C., Fedorak, P.M., Pickard, M.A. (2000). Oxidation of carbazole, Nethylcarbazole, fluorene, and dibenzo dibenzothiophene by the laccase of *Corioliopsis gallica*. *Biotechnol. Lett.* **14**(22): 1119-112
4. Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R. And Vazquez-Duhalt. (1999). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioliopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl Environ Microbiol.* **65**(9):3805-3809.