

## EL ABTS<sup>•+</sup> AGENTE OXIDANTE DE DIVERSOS COMPUESTOS QUÍMICOS Y SU MECANISMO DE RECICLADO ENTRE LA LACASA Y EL SUSTRATO

### THE ABTS<sup>•+</sup> AN OXIDANT AGENT OF DIFFERENT CHEMICAL COMPOUNDS AND ITS RECYCLING PROCESS BETWEEN LACCASE AND SUBSTRATE

M. Solís-Oba<sup>1\*</sup>, E. Bárzana<sup>2</sup>, M. García-Garibay<sup>3</sup> y G. Viniegra-González<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, CP. 90700, México.

<sup>2</sup> Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F., México.

<sup>3</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, México D.F., México.

Recibido 2 de Junio 2007; Aceptado 31 de Octubre 2007

#### Resumen

La lacasa comercial obtenida de *Myceliophthora termophila* y expresada sobre *Aspergillus oryzae* se empleó para producir un cation radical estable y muy activo del mediador químico ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) con el fin de probar la factibilidad de emplearlo como un intermediario para la oxidación de una variedad de compuestos aromáticos en ausencia de la enzima. Se demostró que el catión radical ABTS<sup>•+</sup> por si mismo oxidó al azul índigo, ácido tánico, ácido gálico, azul brillante G, azul de Coomassie, naranja 7 y p-cresol. La reacción de oxidación reveló cambios importantes en sus espectros de absorción en la región del espectro visible. Se demostró también que la oxidación de estos compuestos por la mezcla de lacasa y ABTS se puede efectuar de forma cíclica, de tal forma que la velocidad de reacción fue 94 veces mayor para el índigo, 17 veces mayor para el azul brillante G, 34 veces mayor para el naranja 7 y 5 veces mayor para el p-cresol, comparado con usar el mediador o la lacasa en forma individual. Estos resultados muestran la factibilidad de un esquema de reciclado para la oxidación final de una variedad de compuestos orgánicos en los cuales la enzima no este directamente en contacto con el mismo y que se efectúe a través del mediador ABTS<sup>•+</sup>.

*Palabras clave:* ABTS, reciclado, oxidación, colorantes, lacasa.

#### Abstract

The commercial enzyme laccase cloned from *Myceliophthora termophila* and expressed in *Aspergillus oryzae* was used to produce an active, stable and oxidized form of the chemical mediator ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) in order to test the feasibility of using the monocation ABTS<sup>•+</sup> as a recyclable intermediate for the oxidation of a variety of aromatic chemicals in the absence of the enzyme. It was shown that ABTS<sup>•+</sup>, by itself, oxidized, indigo blue, tannic and galic acids, brilliant blue G, Coomassie blue, orange 7 and p-cresol. Oxidation was assessed by important changes in their visible absorption spectra. It was also shown that oxidation of these compounds by a mixture of ABTS and laccase can be done in a cyclic manner, such a way the oxidation rate was 94 times higher for indigo, 17 times for brilliant blue G, 34 times for orange 7 and 5 times higher for p-cresol compared with using the mediator or the laccase alone. Those results show the feasibility of a recycling scheme for the final oxidation of a wide variety of aromatic compounds in which the enzyme is not directly in contact with the compound but through the intermediate ABTS<sup>•+</sup>.

*Keywords:* ABTS, recycling, oxidation, dyes, laccation.

#### 1. Introducción

Las enzimas son los catalizadores naturales, todas las funciones vitales de los seres vivos se realizan con un complejo sistema enzimático. Las enzimas tienen varias ventajas sobre los catalizadores químicos: son baratas, las enzimas y

sus productos de reacción son biodegradables, operan a temperatura y presión moderadas y algunas enzimas son selectivas para un solo tipo de reacción, entre otras. Sin embargo, algunos disolventes, cambios bruscos de pH y de temperatura las pueden desnaturalizar, perdiendo así su actividad (Thurston, 1994). De entre las enzimas que más se ha estudiado

\* Autor para la correspondencia: E-mail: msolis@ipn.mx  
Tel. 57 29 63 00 ext 87810, Fax 57 29 63 00 ext 87826

su aplicación industrial están las lacasas, peroxidadas y manganoso peroxidadas. La lacasa es una oxidasa multicobre (EC 1.10.3.1) que reduce el oxígeno, formando dos moléculas de agua y simultáneamente oxida a varios compuestos aromáticos mediante la abstracción de cuatro electrones (Bourbonnais y col., 1997); cataliza la oxidación de sustancias orgánicas e inorgánicas (Xu, 1996), entre ellas están los mono-, di- y polifenoles y aminas aromáticas. Se cree que participa también en la biosíntesis de la lignina, pero el mecanismo se desconoce (Lonergan y col., 1997). Las lacasas corresponden a las fenol oxidasas, sin embargo, en años recientes se ha extendido su uso a la oxidación de sustratos no fenólicos, mediante la presencia de compuestos co-oxidantes denominados mediadores (Bourbonnais y Paice, 1990). Según Johannes y Majcherczyk (2000a) todos los radicales que se obtienen de la oxidación con la lacasa podrían actuar como mediadores. La elección del mediador juega un papel muy importante en la efectividad del sistema enzima-mediador. Se han descrito más de 100 mediadores y se ha probado su aplicación en muchos campos, como es en la oxidación de hidrocarburos poli-aromáticos y en la decoloración de colorantes textiles, entre otros. Su desventaja es su alto precio y posible toxicidad (Johannes y Majcherczyk, 2000b). La lacasa en presencia de ciertos mediadores se ha empleado para oxidar hidrocarburos policíclicos aromáticos, fenólicos clorados, dioxinas, pesticidas, explosivos, lignina y colorantes (Rodríguez y col., 1999). El ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico) (ABTS), es el mediador de la lacasa más estudiado debido a su alta estabilidad y a que su química redox es conocida. Sin embargo, el mecanismo por el cual interactúa con la lacasa se desconoce (Collins y col., 1998). A pesar de la importancia que tiene el uso de los mediadores, se sabe poco acerca de su mecanismo de reacción. Algunas teorías han sido planteadas, pero falta ampliar los conocimientos de su forma de acción para aumentar y mejorar su aplicación a campos todavía no desarrollados. Potthast y col. (1996) explican que el ABTS transfiere un electrón a la enzima para activarla, de tal forma que actúa como un co-oxidante más que como un mediador electrónico del sustrato, por lo que debe haber un mecanismo para su reciclamiento regresando a su forma reducida y quedando así disponible para un subsecuente ciclo catalítico. Bourbonnais y Paice (1990) reportaron que el sistema ABTS/lacasa pueden oxidar al alcohol veratrílico y la rotenona, mientras que el  $ABTS^{+\bullet}$  por sí solo no puede. Collins y col. (1998) indican que la lacasa/ABTS oxida el antraceno pero el  $ABTS^{+\bullet}$  en ausencia de la enzima no hace.

En el presente trabajo se inmovilizó la lacasa para preparar el  $ABTS^{+\bullet}$ . Un aspecto importante en el presente fue demostrar que el  $ABTS^{+\bullet}$  es un agente oxidante por sí mismo de diferentes tipos de compuestos, y además interactúa con la lacasa,

reciclándose varias veces entre la enzima y el sustrato, de tal forma que una pequeña cantidad de ABTS oxida una cantidad apreciable del sustrato, a una velocidad mayor si en el medio de reacción hay lacasa. Este estudio puede ser considerado como la base experimental para construir reactores empacados con la enzima inmovilizada y el uso de mediadores para una variedad de usos industriales, como en la oxidación de colorantes, de compuestos fenólicos y de taninos; conjuntamente, las reacciones de oxidación empleando el ABTS previamente oxidado, se pueden realizar en presencia de disolventes que desnaturalizan a la lacasa, como es el acetonitrilo.

## 2. Materiales y métodos.

### 2.1. Reactivos

Todos los reactivos y colorantes indicados en esta sección se adquirieron en Sigma-Adrich con pureza grado reactivo.

### 2.2. Lacasa

La lacasa (E.C.1.10.3.2) fue una donación de Novozymes México, en forma del producto comercial Deni Lite II S; este contiene lacasa (EC.1.10.3.2) producida por fermentación sumergida de un *Aspergillus* genéticamente modificado (Novo Nordisk, 1999). El producto contiene además ácido fenotiazin-10 sulfónico como mediador y un surfactante no iónico en amortiguador (Greca y col., 2001).

#### 2.2.1. Purificación de la Lacasa

Para eliminar el mediador y el amortiguador, se hizo el siguiente proceso de purificación de la lacasa: Se disolvieron 15 g de Deni Lite II S en 150 mL de agua destilada y se mantuvieron en agitación continua por 2 h. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 20 minutos a 10 °C usando una centrifuga Beckman J2-HS. El sobrenadante se filtró primero con papel filtro Whatman No. 1 y posteriormente con filtro millipore de 0.45 µm. 150 mL del filtrado se agregaron a 500 mL de acetona a 5°C, la mezcla se dejó en baño de hielo por 3 horas. Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm a -10 °C por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se recolectó la enzima precipitada. El precipitado se lavó tres veces con acetona a 0 °C, se colocó en una caja petri de 5 cm de diámetro y se dejó en desecador por 1 día para eliminar la acetona remanente. Se disolvieron 3 g de la enzima purificada en 10 mL de amortiguador de pH de acetatos 0.1 M a pH 5 y se almacenó en refrigeración a 8 °C para su uso posterior.

### 2.2.2 Determinación de la actividad enzimática

Se determinó la actividad de la lacasa espectrofotométricamente con un espectrofotómetro UV-visible Beckman DU 640. Se empleó ABTS como sustrato y se midió el incremento de la absorbancia a 414 nm, usando un coeficiente de extinción molar de  $36\ 000\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  (Li y col., 1998). Una unidad de lacasa (U) es la cantidad de enzima necesaria para producir  $1\ \mu\text{mol}$  de ABTS oxidado en un minuto.

### 2.2.3 Estabilidad de la Lacasa en presencia de disolventes

La lacasa purificada y disuelta en amortiguador de pH de acetatos  $0.1\ \text{M}$  a pH 5 se mezcló con 10, 20, 30, 40, 50 y 60 % en volumen de etanol y de acetonitrilo, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y se le determinó su actividad como se indicó en la sección 2.2.2.

### 2.3. Inmovilización de la Lacasa

Una vez purificada la enzima, se inmovilizó según Ho y Liao (1983): Se mezclaron 5 g de sílica gel con 50 mL de solución de 2% de NaOH, se calentaron por 2 horas a  $80 - 90\ ^\circ\text{C}$ , manteniendo agitación suave, la sílica tratada se decantó y lavó con agua destilada. Posteriormente se le adicionaron 50 mL de  $\text{HNO}_3$  al 20 %, y se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación constante; la sílica se decantó y lavó con agua destilada. A continuación ésta se hizo reaccionar con 50 mL de 3 aminopropiltrióxido al 4%, por 2 horas a  $80 - 90\ ^\circ\text{C}$  con agitación suave, se decantó y lavó la sílica con agua destilada. Se agregaron 25 mL de glutaraldehído al 0.3% y se mantuvo por 3 horas con agitación suave a  $60 - 70\ ^\circ\text{C}$ , nuevamente se decantó y lavó la sílica con agua destilada. Finalmente, se adicionaron 50 mL de la enzima purificada disuelta en amortiguador acetatos a pH 5 y se dejó toda la noche en contacto con la sílica, al día siguiente se decantó y lavó con agua destilada y se almacenó en refrigeración a  $8\ ^\circ\text{C}$  para su uso posterior.

### 2.4. Producción de ABTS<sup>•+</sup>

Se prepararon 50 mL de una solución  $5\ \text{mM}$  de ABTS, ésta permaneció en contacto con 10 g de enzima inmovilizada, a temperatura ambiente, hasta que ya no se observaron cambios en el espectrofotómetro UV-Visible (a los 7 días), posteriormente se filtró con papel filtro Whatman del número 1 para separar la enzima inmovilizada del mediador oxidado.

### 2.5. Estabilidad del ABTS oxidado

10 mL de solución de ABTS oxidado se incubaron durante 30 días a  $4$  y  $25\ ^\circ\text{C}$ ; después de este tiempo se le hizo un barrido en el espectrofotómetro UV-visible en un rango de longitud de onda de 200 a 800 nm y se comparó con el espectro electrónico de la solución inicial del ABTS oxidado.

En 4 matraces se adicionaron 8 mL de solución de ABTS oxidado, a cada uno se les agregaron 2 mL de un disolvente diferente: metanol, etanol, isopropilalcohol ó acetonitrilo. A cada mezcla se le midió la absorbancia a 414 nm después de 1 y 7 horas.

### 2.6 Uso del como ABTS oxidado como agente oxidante de diversos compuestos

Se mezclaron 20 mL de ABTS oxidado  $0.1\ \text{mM}$  libre de enzima, con 20 mL de soluciones  $0.1\ \text{mM}$  de los siguientes compuestos químicos: índigo, ácido tánico, ácido gálico, azul brillante G, azul de Coomassie, naranja 7, p-cresol, aminoazotolueno, azobenceno ó p-cloroanilina. Las mezclas se incubaron a  $25\ ^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Se hizo el barrido en el espectrofotómetro UV-visible en un rango de longitudes de onda de 200 a 800 nm a los reactivos y a la mezcla de reacción al inicio y después de 2 horas.

### 2.7 Reciclado del ABTS entre la lacasa y diferentes compuestos

Se prepararon las siguientes mezclas de reacción de 200 nmoles de cada uno de los siguientes compuestos: índigo, azul brillante G, naranja 7 ó p-cresol con: 1) Dos nmoles de ABTS oxidado, 2) Cuatro unidades de lacasa y 3) dos nmoles de ABTS oxidado y cuatro unidades de lacasa. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas y se les hicieron barridos en el espectrofotómetro UV-Visible cada 20 min, en el rango de longitudes de onda de 200 a 800 nm. Se midieron los cambios de absorbancia con el tiempo a la máxima longitud de onda donde absorbe cada uno de los compuestos y se cuantificó la velocidad de reacción de cada compuesto en las tres condiciones de reacción.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Lacasa

La lacasa purificada tuvo una actividad específica de  $0.5\ \text{U}/\text{mg}$ , y una  $K_m$  de  $9.83 \times 10^{-5}\ \text{mM}$  a  $25\ ^\circ\text{C}$ . Después de haberse puesto la enzima en contacto con etanol ó acetonitrilo durante una hora, se observó que el etanol a porcentajes menores del 30 % incrementó la actividad de la enzima, mientras que el acetonitrilo afectó de manera considerable a la

lacasa, ya que con un 10 % de este disolvente disminuyó al 50 % la actividad enzimática. Los resultados se ilustran en la Fig. 1.

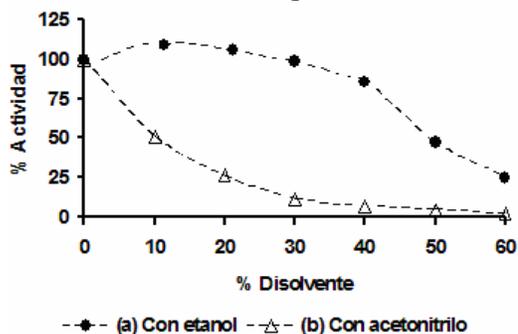


Fig. 1. Efecto del etanol y del acetonitrilo sobre la actividad lacasa después de 1 hora de estar en contacto con los disolventes.

La lacasa inmovilizada produjo una mezcla de ABTS y  $ABTS^{\bullet+}$ , ya que la lacasa no tuvo el potencial redox necesario para oxidar al ABTS hasta su segundo estado de oxidación (Solís-Oba y col., 2005). El ABTS no reaccionó con ninguno de los compuestos aquí estudiados, por lo que no fue necesaria la separación de ambas especies químicas.

### 3.2. Estabilidad del ABTS oxidado

La Fig. 2 muestra la estabilidad del  $ABTS^{\bullet+}$  después de mezclarse con diferentes disolventes: metanol, etanol, isopropanol ó acetonitrilo. Se observa que después de 7 horas de estar en contacto con los tres alcoholes probados, la cantidad de ABTS oxidado que se conservó fue entre el 70% y 80%. Mientras que el acetonitrilo no tuvo un efecto significativo sobre el mediador oxidado, prácticamente no hubo cambio en la concentración del ABTS oxidado después de 7 horas de contacto con este último disolvente.

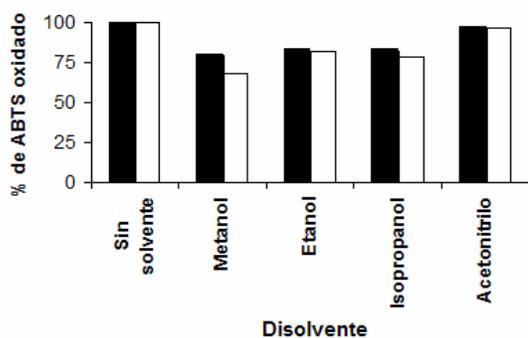


Fig. 2. Efecto de diversos disolvente sobre el  $ABTS^{\bullet+}$  después de: (■) 1 hora y (□) después de 7 horas de contacto.

Estos resultados del efecto de los disolventes sobre el ABTS oxidado y sobre la lacasa son muy interesantes, ya que se abre la posibilidad de trabajar

reacciones de oxidación, vía el mediador oxidado previamente con la enzima inmovilizada, pero en condiciones que afectan a la lacasa, como sería el caso de efectuar el proceso de oxidación en presencia de disolventes tales como el acetonitrilo, que dañan en gran medida a la lacasa pero no al ABTS oxidado. Entonces, dependiendo del disolvente, se pueden realizar las reacción de oxidación en presencia de la enzima (cuando se usa etanol como disolvente) y con el mediador ó, únicamente con el mediador previamente oxidado con la lacasa (cuando el disolvente es acetonitrilo), pero sin que este presente la enzima en el medio de reacción.

### 3.3. Uso del $ABTS^{\bullet+}$ como agente oxidante

La Fig. 3 muestra los espectros UV-Visible del ABTS y de la mezcla de  $ABTS/ABTS^{\bullet+}$  obtenida con la lacasa inmovilizada. Con el ABTS como única especie, se observaron dos picos con máximos en  $\lambda_1 = 214$  nm y  $\lambda_2 = 340$  nm. En el espectro correspondiente a la oxidación enzimática del ABTS se observaron además, señales con máximos en  $\lambda_3 = 394$  nm,  $\lambda_4 = 414$  nm,  $\lambda_5 = 646$  nm y  $\lambda_6 = 728$  nm, por lo que estas cuatro últimas señales corresponden a los picos de máxima absorción del ABTS oxidado.

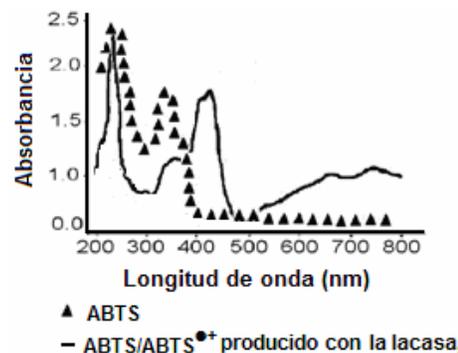
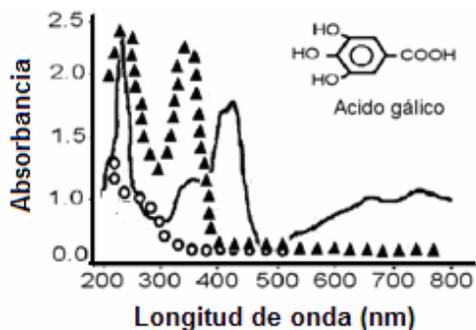


Fig. 3. Espectros UV-Visible del ABTS reducido y de la mezcla de oxidación producida por la lacasa.

Las figs. 4, 5 y 6 muestran la reactividad del  $ABTS^{\bullet+}$  con los diferentes tipos de compuestos probados. El espectro UV-Visible del ácido gálico se muestra en la Fig. 4, el pico de máxima absorción del compuesto puro se registró a 225 nm. Después de la reacción con  $ABTS^{\bullet+}$ , hubo un decremento en el pico a dicha longitud de onda, indicando el consumo del reactivo. Se observó además que el pico a 340 nm, correspondiente al ABTS en su forma reducida, incrementó y los correspondientes al  $ABTS^{\bullet+}$  disminuyeron; todo ello indica que el ácido gálico reaccionó con el  $ABTS^{\bullet+}$  sin requerir a la enzima en el medio de reacción; por otro lado durante el proceso de oxidación del ácido gálico, el  $ABTS^{\bullet+}$  se transformó en ABTS mediante la recuperación del electrón que previamente le fue sustraídos por la

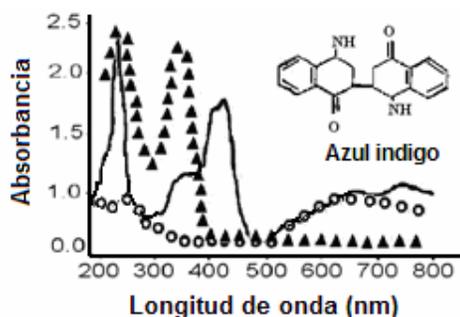
enzima inmovilizada, mismo que fue donado por el sustrato. El espectro UV-Visible del ácido tánico fue similar al del ácido gálico, indicando que este compuesto también fue oxidado por el  $ABTS^{\bullet+}$  libre de enzima.



○ Acido gálico, —  $ABTS/ABTS^{\bullet+}$  producido con la lacasa, ▲ Mezcla después de reacción

Fig. 4. Espectros de absorción UV-Visible de la reacción del ácido gálico con el ABTS oxidado.

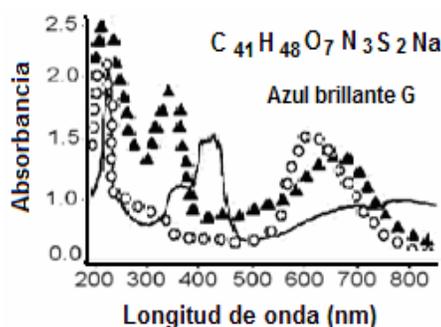
La Fig. 5 corresponde a la oxidación del índigo mediante el  $ABTS^{\bullet+}$ . El espectro UV-Visible del compuesto puro muestra una señal con máximo a 610 nm, la cual decreció rápidamente al hacerse reaccionar el colorante con el  $ABTS^{\bullet+}$ , como resultado de esta oxidación el índigo se decoloró. La señal con máximo a 340 nm se incrementó, indicando la formación de ABTS; mientras que las señales a  $\lambda_3=394$  nm,  $\lambda_4=414$  nm,  $\lambda_5=646$  nm y  $\lambda_6=728$  nm, correspondientes al mediador oxidado disminuyeron, debido a que el  $ABTS^{\bullet+}$  reaccionó con el índigo oxidándolo y decolorándolo. El espectro UV-Visible del naranja 7 fue similar a del índigo, mostrando también que el naranja 7 reaccionó con el mediador oxidado y como resultado se decoloró.



○ Azul índigo, —  $ABTS/ABTS^{\bullet+}$  producido con la lacasa, ▲ Mezcla después de reacción

Fig. 5. Espectros de absorción UV-Visible de la reacción del índigo con el ABTS oxidado.

La Fig. 6 muestra los cambios ocurridos en el azul brillante G al incubarlo con el  $ABTS^{\bullet+}$ , el colorante puro presentó un pico con máxima absorción a 605 nm. En este caso se apreció la formación de un nuevo compuesto, con un pico de máxima absorción a la longitud de onda de 658 nm. Los cambios en los espectros UV-Visible del ABTS y  $ABTS^{\bullet+}$  fueron similares a los descritos en las figs. 4 y 5, indicando que el  $ABTS^{\bullet+}$  reaccionó también con este colorante y, durante el proceso se formó, además, ABTS. Un comportamiento similar se observó en los casos del azul de coomassie y del p-cresol, donde los productos de oxidación fueron sustancias coloridas con picos de máxima absorción a longitudes de onda diferentes a las de los compuestos puros.

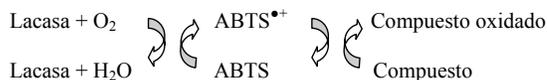


○ Azul brillante G —  $ABTS/ABTS^{\bullet+}$  producido con la lacasa, ▲ Mezcla después de reacción

Fig. 6. Espectros de absorción UV-Visible de la reacción del azul brillante G con el ABTS oxidado.

Para la p-cloroanilina, el aminoazotolueno y el azobenceno no hubo evidencia de reacción, ya que los espectros UV-Visible antes y después de dos horas de haber estado en contacto con el mediador oxidado libre de enzima, fueron casi idénticos, indicando que el mediador oxidado en las condiciones indicadas no pudo oxidar a estos tres compuestos.

En resumen, el  $ABTS^{\bullet+}$  fue capaz de oxidar al ácido gálico, al ácido tánico, al índigo, al naranja 7, al azul brillante G, al p-cresol y al azul de coomassie, sin requerir la presencia de la enzima. El mecanismo seguido en todos los casos fue:



Los compuestos aromáticos no sustituidos no pudieron reaccionar con el ABTS oxidado, como fue el caso del azo benceno, coincidiendo con Collins y col. (1998), quienes reportaron que el antraceno, aromático no sustituido tampoco reaccionó con el mediador oxidado. El ABTS oxidado fue capaz de oxidar compuestos orgánicos aromáticos sustituidos,

principalmente aquellos cuyas sustituciones son grupos hidroxilo o aminas.

### 3.4 Reciclado del ABTS entre la lacasa y el compuesto oxidado

La Tabla 1 muestra las velocidades de oxidación del índigo, azul brillante G, naranja 7 y p-cresol con lacasa y/o  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , medidas durante 2 horas tomando muestra cada 20 minutos. La velocidad de oxidación para los diversos compuestos usando  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  o lacasa fue similar, pero fue evidente el incremento en la velocidad de reacción cuando se usaron ambos, el mediador y la enzima; así, la velocidad de oxidación del índigo incrementó 94 veces, para el azul brillante G el incremento fue de 17 veces, de 34 veces para el naranja 7 y de 5 veces mayor para el p-cresol, comparado con usar  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ó lacasa como único agente oxidante; cabe destacar que en todos los casos se emplearon 100 veces menos  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  que el compuesto a oxidar, es decir que este proceso de reciclado además de favorecer en forma considerable los procesos reactivos, permite considerar el uso de mediadores caros como es el caso del ABTS, ya que la cantidad que se requirió del mismo fue pequeña en comparación con el compuesto oxidado.

Los resultados aquí presentados indican que es factible separar físicamente la acción de la enzima lacasa sobre el mediador ABTS, para producir un agente oxidante estable que previamente hemos identificado como el monocatión  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , para que a su vez, este reaccione en forma cíclica con los sustratos finales, que serían los compuestos orgánicos aquí estudiados. Este resultado ya se había previsto por trabajos de Majcherczyk y Johannes (2000) quienes separaron la enzima del sustrato acoplado con polietilenglicol (PEG) por una membrana semipermeable y observaron que la adición de ABTS, que es de bajo peso molecular, permitía la oxidación del sustrato. Pero no se habían medido las relaciones molares entre los sustratos y el ABTS que podían alcanzarse mediante el reciclado entre el mediador y los pigmentos. Este punto es crucial para el desarrollo de procesos económicamente más atractivos, pues el ABTS y la enzima suelen ser compuestos de alto precio en el mercado. Aquí se ha demostrado que, la velocidad de

oxidación incrementa varias veces al emplear la enzima y el mediador comparado con su uso en forma individual. El hecho que el intermediario oxidado,  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , sea estable aún en la presencia de agentes desnaturizantes de las enzimas como el acetonitrilo, indica que es factible establecer dichos ciclos de forma que el  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  actúe sobre soluciones del sustrato que serían dañinas para la lacasa. Por ejemplo, mediante dos reactores separados, uno con la enzima fija en donde se reoxidase el ABTS, y otro, con el sustrato disuelto en el solvente, donde ocurriese la reacción entre el  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  y el compuesto orgánico. Estos resultados se orientan hacia el desarrollo de nuevos esquemas de reacción y separación que permitan atacar sustratos hasta ahora no oxidados y sobre todo, hacia el uso rentable de mediadores como el ABTS cuyo costo sea excesivo. Quedan por desarrollarse procesos de separación entre el ABTS y el  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  que utilizarían sus diferencias de cargas y solubilidades para la realización práctica de los citados sistemas de reciclado.

### Conclusiones

El ABTS oxidado es un ión muy estable que pudo permanecer sin cambios a temperatura ambiente durante un mes; asimismo fue estable ante ciertos disolventes, incluso se puede emplear en presencia de algunos que dañan a la enzima, como es el caso del acetonitrilo. El ABTS oxidado es un agente oxidante por si mismo, capaz de oxidar diferentes compuestos orgánicos sin requerir el uso de la enzima. Actúa sobre aromáticos sustituidos, principalmente aquellos que tienen grupos hidroxilo ó aminas; durante el proceso de oxidación de dichos compuestos, el mediador se recicla entre la enzima y el sustrato, requiriéndose cantidades pequeñas del mediador comparadas con la cantidad de sustrato que es posible oxidar con este, la relación molar aquí probada fue de  $1/100 [\text{ABTS}^{\bullet+}] / [\text{compuesto}]$ . Todos estos resultados abren una nueva área de desarrollo en el tratamiento de diversos compuestos como colorantes, compuestos tánicos y cresoles, usando reactores con enzima inmovilizada y catalizados con ABTS.

Tabla 1. Velocidad de oxidación de índigo, azul brillante G, naranja 7 y p-cresol con: ( $V_1$ )  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , ( $V_2$ ) lacasa y ( $V_3$ ) con la mezcla de la enzima y el mediador.

Compuesto	$V_1$ (nmol/hr)	$V_2$ (nmol/hr)	$V_3$ (nmol/hr)	$V_3/V_2$
Índigo	$0.067 \pm 0.010$	$0.206 \pm 0.081$	$6.280 \pm 0.061$	94
Azul Brillante G	$0.072 \pm 0.021$	$0.052 \pm 0.033$	$1.224 \pm 0.130$	17
Naranja 7	$0.010 \pm 0.005$	$0.016 \pm 0.010$	$0.342 \pm 0.018$	34
p-cresol	$0.016 \pm 0.009$	$0.026 \pm 0.012$	$0.054 \pm 0.016$	4

## Referencias

- Bourbonnais R., Paice M. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267, 99–102.
- Bourbonnais R., Paice M., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with Kraft pulp and lignin model compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, 4627-4632.
- Collins P., Dobson A., Field J. (1998), Reduction of the 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (6), 2026-2031.
- Greca M., Costa-Ferreira M., Pessoa M. (2001). Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation. *Bioresource Technology* 79, 171-177.
- Ho G., Liao Ch. (1983). *Activation of a siliceous carrier for enzyme immobilization*. United States Patent 4,384,045.
- Johannes Ch., Majcherczyk A. (2000a). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 524-528.
- Johannes Ch., Majcherczyk A. (2000b). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78, 193-199.
- Li K., Helm R., Eriksson K. (1998). Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/I-hydroxibenzotriazole redox system. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 27, 239-243.
- Lonergan G., Mew E., Schliephake K., Baker W., (1997). Phenolic substrate for fluorometric detection of laccase activity. *FEMS Microbiology Letters* 153, 485-490.
- Majcherczyk A., Johannes C., (2000). Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1474 (2), 157-162.
- Novo Nordisk, Deni Lite II S Product Sheet, Enzyme Business, Denmark, 1999.
- Potthast A., Rosenau T., Chen C., Gratzl J. (1996). A novel method for the conversion of benzyl alcohols to benzaldehydes by laccase-catalysed oxidation. *Journal of Molecular Catalysis A*. 108, 5-9.
- Rodríguez E., Pickard M., Vázquez-Duhalt R. (1999). Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38, 27-32.
- Solís-Oba M., Ugalde-Saldivar V., Gonzalez I., Viniegra-Gonzalez G. (2005). An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 579, 59-66.
- Thurston Ch. (1994). The structure and function of fungal laccase, review article. *Microbiology* 140, 19-26.
- Xu F. (1996). Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccase: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35, 7608-7614.