



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estudio del enzima Lacasa y sus aplicaciones
en la industria alimentaria**

**D. Jesús Manzano Nicolás
2021**

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



DEPARTAMENTO DE
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS,
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE VETERINARIA

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Estudio del enzima Lacasa y sus
aplicaciones en la industria alimentaria

D. Jesús Manzano Nicolás

Directores:

Fulgencio Helenio Marín Iniesta

Amaury Taboada Rodríguez

José Luis Muñoz Muñoz

Murcia, 2021



D. Fulgencio Helenio Marín Iniesta, Catedrático de Universidad del Departamento de Tecnología de alimentos, nutrición y bromatología de la Universidad de Murcia, D. Amaury Taboada Rodríguez, Profesor Asociado del Departamento de Tecnología de alimentos, nutrición y bromatología de la Universidad de Murcia y D. José Luis Muñoz Muñoz, Doctor colaborador del Departamento de Bioquímica y biología molecular A de la Universidad de Murcia y Profesor Titular del Departamento de Ciencias aplicadas de la Universidad de Northumbria en Newcastle, **AUTORIZAN:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio del enzima Lacasa y sus aplicaciones en la industria alimentaria**”, realizada por D. Jesús Manzano Nicolás, bajo nuestra inmediata dirección, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 7 de julio de 2021

Fdo: Dr. Fulgencio Helenio Marín Iniesta

Fdo: Dr. Amaury Taboada Rodríguez

Fdo: Dr. José Luis Muñoz Muñoz

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a los profesores Fulgencio Marín y Amaury Taboada por haberme dado la oportunidad de poder trabajar en su grupo de investigación y haberme permitido poder llevar a cabo la presente tesis doctoral que aquí se expone, además de haberme ayudado y guiado en mi formación desde la etapa de máster y en otras facetas personales de no menos valor. Ellos fueron las primeras personas que creyeron en mí cuando nadie lo hizo.

Por otra parte, me gustaría agradecer a Francisco García Cánovas que me abriese las puertas de su laboratorio y despacho, ayudándome y guiándome en los trabajos de investigación que aquí se exponen. Su papel ha sido esencial para poder haber llevado a cabo la presente tesis doctoral, ya que sin él ninguno de estos artículos expuestos hoy habrían sido tan exitosos.

Me gustaría agradecer José Luis Muñoz Muñoz por su guía durante la presente tesis doctoral y ayuda en las diferentes investigaciones llevadas a cabo.

También quiero nombrar a José Tudela, quien me abrió las puertas de su despacho y me enseñó todo lo necesario para trabajar en el laboratorio de bioquímica, además de ayudar de forma voluntariosa en el proceso de investigación llevado a cabo. Sin su participación esta tesis tampoco habría sido llevada a cabo.

Por otra parte, me gustaría también reconocer al resto de los coautores que han participado en los diferentes trabajos de investigación, como José Antonio Teruel y Francisco García Molina, que han ayudado de forma muy importante para que los trabajos pudiesen salir adelante.

Por otro lado, no puedo olvidarme de Sancho Bañón, coordinador del programa de doctorado, quién siempre me ha ayudado y guiado en todo lo que he necesitado de forma voluntariosa, llegando a veces su ayuda a ir más allá de su función establecida como coordinador. De forma que me gustaría reconocer su generosa labor.

También quiero recordar a mis compañeros de laboratorio a lo largo de estos años, Leslie, Pablo y Emilio, quienes siempre me han ayudado en todo lo que he necesitado y me han animado. Desde aquí les doy mi más sincero agradecimiento.

A mi hermano Jaime, quién a pesar de ser solo un adolescente, ha sido desde siempre mi palanca de cambio, y ha conseguido sacar lo mejor de mí, además de una sonrisa.

A mis padres, quienes son uno de los grandes responsables de que esté defendiendo la tesis, ya que desde mi infancia me inculcaron los valores del esfuerzo y la honradez, y que me han apoyado en todos los pasos que he dado en mi vida. En el futuro, espero poder ser capaz de recompensarles por todo lo que han hecho por mí y han representado en mi vida.

A Rosalba, quién también ha sido una de las grandes responsables de que esta tesis haya podido defenderse, al apoyarme y ayudarme en todos los desafíos que me han ocurrido, además de haber estado junto con mis padres en los buenos y malos momentos. Espero poder agradecerte en el futuro todo lo que ha hecho por mí.

La presente tesis doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos de investigación:

Proyecto FEDER RTC-2017-5964-2 InsectFlour “Aprovechamiento de subproductos industriales agrícolas para la producción de harinas de insectos para consumo humano y animal” del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Madrid, España).

Proyectos 20961/PI/18 y 20809/PI/18 de la Fundación Seneca (Comunidad autónoma de la Región de Murcia, Murcia, España).

Proyecto AEIP-15452 de la Universidad de Murcia (Murcia, España).

SAF2016-77241-R de Ministerio de asuntos económicos y transformación digital (Madrid, España).

El doctorando ha disfrutado de un contrato de investigación durante parte del periodo del doctorado, financiado por el proyecto FEDER RTC-2017-5964-2 InsectFlour del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Madrid, España) antes mencionado.

PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONSTITUYEN LA TESIS DOCTORAL

La tesis doctoral titulada “**Estudio del enzima Lacasa y sus aplicaciones en la industria alimentaria**” se presenta en la modalidad de compendio de publicaciones, tras obtener un informe favorable de la Comisión de Doctorado del Programa de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, y recibir la autorización con carácter previo de la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia.

El compendio de publicaciones, lo conforman tres trabajos publicados en revistas indexadas en *Journal Citation Report* (JCR):

1. **Manzano-Nicolas, J.**, Marin-Iniesta, F., Taboada-Rodriguez, A., Garcia-Canovas, F., Tudela-Serrano, J., & Muñoz-Muñoz, J. L. (2020). Development of a method to measure laccase activity on methoxyphenolic food ingredients and isomers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 1099-1107.
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.152
2. **Manzano-Nicolas, J.**, Taboada-Rodriguez, A., Teruel-Puche, J. A., Marin-Iniesta, F., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., Tudela-Serrano, J., & Muñoz-Muñoz, J. L. (2020). Kinetic characterization of the oxidation of catecholamines and related compounds by laccase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1256–1266.
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.112
3. **Manzano-Nicolas, J.**, Taboada-Rodriguez, A., Teruel-Puche, J. A., Marin-Iniesta, F., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., Tudela-Serrano, J., & Muñoz-Muñoz, J. L. (2021). Enzymatic oxidation of oleuropein and 3-hydroxytyrosol by laccase, peroxidase and tyrosinase. *Journal of Food Biochemistry*, 00:e13803.
DOI: 10.1111/jfbc.13803

ÍNDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| 1.1 | LACASA | 3 |
| 1.1.1 | Características generales | 3 |
| 1.1.2 | Origen filogenético y diversidad taxonómica | 7 |
| 1.1.3 | Estructura y mecanismo de acción | 8 |
| 1.1.4 | Función biológica..... | 11 |
| 1.1.5 | Producción de Lacasa | 12 |
| 1.1.6 | Otras enzimas oxidasas | 14 |
| 1.2 | APLICACIONES DE LACASA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA..... | 15 |
| 1.2.1 | Biorremediación..... | 15 |
| 1.2.2 | Aprovechamiento de subproductos relacionados con lignina..... | 16 |
| 1.2.3 | Desarrollo de métodos analíticos..... | 17 |
| 1.2.4 | Procesamiento industrial de diferentes alimentos | 17 |
| 2 | OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL | 23 |
| 2.1 | OBJETIVO GENERAL..... | 25 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 25 |
| 3 | JUSTIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL..... | 27 |
| 4 | PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL..... | 33 |
| 5 | COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS DURANTE LA TESIS DOCTORAL..... | 41 |
| 6 | CONCLUSIONES | 53 |
| 6.1 | CONCLUSIONES ESPECÍFICAS..... | 55 |
| 6.2 | CONCLUSIONES GENERALES | 56 |
| 7 | RESUMEN..... | 57 |
| 8 | SUMMARY | 61 |
| 9 | BIBLIOGRAFÍA | 65 |

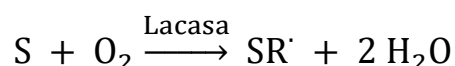
1 INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 LACASA

1.1.1 Características generales

Lacasa (EC 1.10.3.2) es una enzima descubierta en el siglo XIX (Yoshida, 1883) que pertenece al grupo de glicoproteínas multicobre oxidasas, junto con ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3), ferroxidasa y ceruloplasmina (EC 1.16.3.1) (Janusz et al., 2020; D. Singh & Gupta, 2020). Esta proteína puede presentar una estructura monomérica, dimerica o tetramérica, con un peso molecular de 50-130 kDa, que contiene una fracción de carbohidrato (10-45% de masa total) compuesta de manosa, galactosa y N-acetilglucosamina que permite la estabilización de la estructura proteica. Además, esta posee 4 átomos de cobre (tipo 1, tipo 2 y dos tipo 3) (Hakulinen & Rouvinen, 2015; Lyashenko et al., 2006; D. Singh & Gupta, 2020; Sitarz et al., 2016).

Lacasa es una enzima que cataliza la oxidación de diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos, a través de la transferencia de un electrón, provocando la reducción lateral de oxígeno en agua (transferencia global de 4 electrones) y la formación de un radical libre procedente del sustrato de partida (Esquema 1). Este radical debido a su elevada inestabilidad puede producir oxidación C α , y escisión aril-alquilo, C α -C β o del anillo aromático que pueden provocar la degradación de estructuras poliméricas como lignina, o por otra parte intervenir en reacciones de acoplamiento oxidativo que darán lugar a la producción de dímeros o polímeros (Hakulinen & Rouvinen, 2015; X. Li et al., 2020; Weng et al., 2021; Wong, 2009).



Esquema 1. Catálisis oxidativa de Lacasa. (S) sustrato, (SR') radical procedente de sustrato (Buchert et al., 2010).

El grupo de compuestos que son oxidados por Lacasa viene determinado por el potencial redox de las diferentes especies de esta. Así, en este conjunto pueden ser incluidos sustratos fenólicos, aminas e iones inorgánicos como Mn²⁺, entre otros (Tabla 1). Asimismo, diferentes sustratos, como subunidades de lignina o antraquinonas, que debido a su gran tamaño molecular y su alto potencial redox no podrían ser oxidados por Lacasa, pueden ser oxidados por esta a través de mediadores de bajo peso molecular, que al ser oxidados por Lacasa dan lugar a productos intermedios de alto potencial redox que oxidarán los sustratos mencionados con anterioridad a través de transferencia electrónica o de radicales hidrogeno. Entre los diferentes mediadores se

pueden destacar ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) o vainillina (Guan et al., 2018; Morozova et al., 2007; Zerva et al., 2019).

Entre los compuestos inhibidores que provocan la reducción de la actividad de Lacasa se pueden destacar compuestos como aniones pequeños, iones metálicos o moléculas con funciones biológicas como ácidos grasos o detergentes de amonio, entre otros (Tabla 2) (Dwivedi et al., 2011).

Este enzima presenta una óptima capacidad catalítica en un dilatado rango de condiciones ambientales, presentando una alta resistencia de desnaturalización ante disrupciones mecánicas o térmicas, y una elevada vida útil tras múltiples ciclos catalíticos debido en parte a la ausencia de H_2O_2 en el proceso de oxidación enzimática. Así, Lacasa presenta su máxima actividad catalítica a una temperatura de entre 30-50°C en la mayoría de los organismos y pH ácido, aunque también se encuentran Lacasas de diferentes fuentes biológicas que presentan su máxima actividad a pH neutro o alcalino. En relación con lo anterior, no solo el enzima determina el pH óptimo del proceso catalítico, sino que la naturaleza del sustrato va a determinarlo, así sustratos fenólicos incrementan su capacidad reductora con el incremento del pH. Por otra parte, Lacasa presenta un punto isoeléctrico de 3-7 en la mayoría de organismos a excepción de células vegetales, donde Lacasa presenta un punto isoeléctrico de 9 (Bilal et al., 2019; Buchert et al., 2010; Javaid et al., 2019; D. Singh & Gupta, 2020).

Tabla 1. Ejemplos de sustratos del enzima Lacasa (EC 1.10.3.2). Datos obtenidos a partir de la base de datos BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/>).

| Sustrato | Organismo | Km (mM) | Referencia |
|----------------------|-----------------------------------|---------|-----------------------------|
| 2,5-xilidina | <i>Aquisalibacillus elongatus</i> | 0.016 | (Rezaei et al., 2017) |
| 2,6-dimetoxifenol | <i>Trametes cinnabarina</i> | 0.324 | (Camarero et al., 2012) |
| 2-dianisidina | <i>Trametes sanguinea</i> | 0.044 | (Vite-Vallejo et al., 2009) |
| 4-metil catecol | <i>Lentinula edodes</i> | 0.175 | (D'Annibale et al., 1996) |
| p-fenilendiamina | <i>Agaricus bisporus</i> | 0.100 | (Wood, 1980) |
| ácido ascórbico | <i>Podospora anserina</i> | 0.192 | (Molitoris & Esser, 1970) |
| ácido cafeico | <i>Lentinula edodes</i> | 0.043 | (D'Annibale et al., 1996) |
| ácido ferúlico | <i>Polyporus brumalis</i> | 0.120 | (Nakade et al., 2010) |
| ácido gálico | <i>Chaetomium thermophilum</i> | 0.130 | (Chefetz et al., 1998) |
| ácido p-cumárico | <i>Lentinula edodes</i> | 0.240 | (D'Annibale et al., 1996) |
| ácido sinápico | <i>Trametes cinnabarina</i> | 0.085 | (Camarero et al., 2012) |
| ácido siríngico | <i>Fomes fomentarius</i> | 0.030 | (Rogalski et al., 1991) |
| ácido tánico | <i>Aquisalibacillus elongatus</i> | 0.025 | (Rezaei et al., 2017) |
| ácido vanílico | <i>Trametes versicolor</i> | 0.280 | (Rogalski et al., 1991) |
| alcohol coniferílico | <i>Populus x canadensis</i> | 0.002 | (Ranocha et al., 1999) |
| bilirrubina | <i>Haloferax volcanii</i> | 0.236 | (Uthandi et al., 2010) |
| brenzcatequina | <i>Podospora anserina</i> | 2.270 | (Molitoris & Esser, 1970) |
| catecol | <i>Trametes villosa</i> | 0.261 | (Zille et al., 2005) |
| coniferaldehído | <i>Populus x canadensis</i> | 0.030 | (Ranocha et al., 1999) |
| dopamina | <i>Trametes hirsuta</i> | 0.290 | (Frasconi et al., 2010) |
| ferrocianuro | <i>Trametes versicolor</i> | 0.830 | (Frasconi et al., 2010) |
| guaiacol | <i>Trametes versicolor</i> | 2.230 | (Bertrand et al., 2015) |
| hidroquinona | <i>Ganoderma lucidum</i> | 0.029 | (Kumari & Sirsi, 1972) |
| Siringaldazina | <i>Pleurotus ostreatus</i> | 0.220 | (Pakhadnia et al., 2009) |
| N-acetildopamina | <i>Manduca sexta</i> | 0.630 | (Dittmer et al., 2009) |
| L-tirosina | <i>Aquisalibacillus elongatus</i> | 0.052 | (Rezaei et al., 2017) |
| L-dopa | <i>Trametes polyzona</i> | 6.280 | (Chairin et al., 2014) |

Km: constante de Michaelis.

Tabla 2. Ejemplos de inhibidores del enzima Lacasa (EC 1.10.3.2). Datos obtenidos a partir de la base de datos BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/>).

| Inhibidor | Organismo | Ki (mM) | IC50 (mM) | Referencia |
|---------------------------------|---------------------------------------|------------|--------------|------------------------------|
| acetona | <i>Aureobasidium pullulans</i> | - | - | (Ademakinwa & Agboola, 2016) |
| acetonitrilo | <i>Naganishia albida</i> | - | - | (Singhal et al., 2012) |
| ácido fórmico | <i>Phoma</i> sp. | - | 0.230 | (Junghanns et al., 2009) |
| ácido malónico | <i>Trametes versicolor</i> | - | - | (Lorenzo et al., 2005) |
| ácido tioglicólico | <i>Basidiomycota</i> | 0.802 | - | (Jordaan et al., 2004) |
| benceno | <i>Leucaena leucocephala</i> | - | - | (Jaiswal et al., 2014) |
| cloroformo | <i>Leucaena leucocephala</i> | - | - | (Jaiswal et al., 2014) |
| EDTA | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> | - | 8 | (Trubitsina et al., 2015) |
| etanol | <i>Trichoderma harzianum</i> | - | - | (Bagewadi et al., 2017) |
| H ₂ O ₂ | <i>Coptotermes formosanus</i> | - | - | (Geng et al., 2018) |
| Hg ²⁺ | <i>Phlebia radiata</i> | - | - | (Kaneko et al., 2009) |
| hidroxilamina | <i>Trametes versicolor</i> | 0.180 | - | (Mishra & Kumar, 2009) |
| KCN | <i>Cyathus bulleri</i> | - | - | (Vasdev et al., 2005) |
| L-cisteína | <i>Trametes sanguinea</i> | - | - | (Garcia et al., 2007) |
| Mg ²⁺ | <i>Trametes polyzona</i> | - | - | (Chairin et al., 2014) |
| Mn ²⁺ | <i>Pleurotus ostreatus</i> | - | - | (Liu et al., 2009) |
| NaCl | <i>Phoma</i> sp. | - | 80 | (Junghanns et al., 2009) |
| Na ₂ CO ₃ | <i>Phoma</i> sp. | - | 69 | (Junghanns et al., 2009) |
| NaF | <i>Phoma</i> sp. | - | 3.7 | (Junghanns et al., 2009) |
| NaN ₃ | <i>Melanocarpus albomyces</i> | 0.085 | - | (Andberg et al., 2009) |
| azida | <i>Trametes versicolor</i> | 1.330 | - | (Mishra & Kumar, 2009) |
| SnCl ₂ | <i>Lentinula edodes</i> | - | - | (Nagai et al., 2003) |
| Tolueno | <i>Trichoderma harzianum</i> | - | - | (Bagewadi et al., 2017) |
| Urea | <i>Phoma</i> sp. | - | 2250 | (Junghanns et al., 2009) |

Ki: constante de inhibición; IC50: concentración de inhibición enzimática al 50%.

1.1.2 Origen filogenético y diversidad taxonómica

Lacasa se encuentra en una gran diversidad de organismos como, bacterias, hongos, plantas o artrópodos, hallándose en especies evolutivamente primitivas a diferencia de otras metaloproteínas como Peroxidasa. En este sentido, este enzima es clasificada en base a su contenido de dominios cupredoxina, como Lacasa común (3 dominios cupredoxina) y Lacasa pequeña (2 dominios cupredoxina). En un principio se propuso que Lacasas de 3 dominios se originaron a partir de Lacasas de 2 dominios, sin embargo, evidencias como la distribución de estos dos tipos en especies de muy distinto nivel evolutivo (bacteria, hongos, plantas o animales) indican la posibilidad de que estas proteínas hayan evolucionado a través de diferentes ramas filogenéticas (Hakulinen & Rouvinen, 2015; Janusz et al., 2020; D. Singh & Gupta, 2020).

Se ha descrito la presencia de Lacasa en una gran diversidad de organismos bacterianos grampositivos y gramnegativos, como cianobacterias o endobacterias, además de en organismos del dominio Archaea, que se caracteriza por presentar bajos potenciales redox, una actividad catalítica a pH básico y una alta resistencia a la desnaturalización a altas temperatura respecto a especies fúngicas. Normalmente, la síntesis y uso del enzima por estos microorganismos suele estar asociado a la fase de crecimiento o a la interacción de alguna estructura celular con algún sustrato inductor. Así, debido a la toxicidad de los subproductos producidos por el enzima, como quinonas, las bacterias producen una relocalización de sus sistemas de transporte de electrones para evitar daños celulares. En línea de esto último, se ha descrito la presencia de genes semejantes a Lacasa en patógenos humanos, habiéndose descrito por Singh *et al.* (2016) el uso de Lacasa por *Y. enterocolitica* en la biotransformación de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (Janusz et al., 2020; D. Singh et al., 2016).

Por su parte, plantas superiores como las pertenecientes a la familia Anacardiaceae, presentan el enzima Lacasa. Este tipo de Lacasa se caracteriza por producir la catálisis en un rango de pH de 5-7 y por poseer un cobre de tipo 1 con bajos potenciales redox, a pesar de lo cual no requiere de moléculas mediadoras para la oxidación de sus sustratos diana. La distribución de Lacasa suele darse en una gran diversidad de tejidos vegetales, como el xilema o los canales de resina (Janusz et al., 2020).

Gran parte de las Lacasas del reino Fungi descritas corresponden a las divisiones Basidiomycota y Ascomycota, las cuales presentan altos potenciales redox y una actividad catalítica óptima a pH 2-4, a pesar de su bajo grado de desnaturalización a pH superior a 7. En este tipo de organismos, Lacasa participa en la infección de diferentes

tejidos vegetales, de tal forma que se ha descrito que diferentes compuestos de respuesta de plantas a infecciones fúngicas modulan la expresión del enzima en hongos. Por último, se puede destacar de las Lacasas fúngicas su capacidad para oxidar sustratos no ordinarios de Lacasa (e.g. aminas aromáticas), lo que permite su aplicación como agente de biorremediación de diferentes toxinas ambientales (Gianfreda et al., 1999; Janusz et al., 2020; Torres-Salas et al., 2013).

También se ha descrito la distribución de Lacasa en diferentes animales, como moluscos, metazoos, insectos e incluso en el ser humano, donde la prevalencia de diferentes patologías como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa se relaciona con la presencia de genes de Lacasa. Así, Assadi *et al.* (2016) señalaron como la expresión de genes de Lacasa está implicada en la respuesta inflamatoria en macrófagos. Por otro lado, fisicoquímicamente, la propiedad más destacable que se ha encontrado de estas enzimas es la de presentar su actividad en un rango de pH de 5-6.5 (Assadi et al., 2016; Janusz et al., 2020).

1.1.3 Estructura y mecanismo de acción

Tal y como se ha comentado antes, Lacasa pertenece a la familia de proteínas multidominio cupredoxina, motivo por el que presenta una estructura de clave griega formada por 2 hojas β que presentan 7 horquillas β y se pliegan formando una estructura de barril cerrada. La mayoría de Lacasas descritas de las diferentes especies contienen normalmente 3 dominios cupredoxina unidos por enlaces disulfuro (dominio I con dominio II y dominio I con dominio III) (Agrawal et al., 2018; Arregui et al., 2019; Hakulinen & Rouvinen, 2015; Jafari et al., 2020). En la Figura 1 se muestra la estructura obtenida por cristalografía de una Lacasa fúngica de 3 dominios (Piontek et al., 2002).

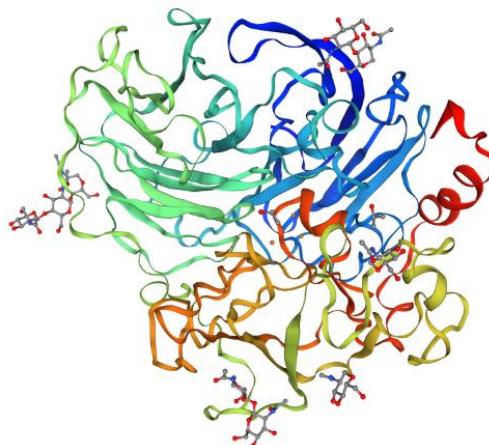


Figura 1. Estructura de Lacasa-2 de *Trametes versicolor* (entrada PDB: 1GYC) obtenida de UniProtKB (Q12718). Estructura proteica obtenida por cristalografía (Piontek et al., 2002).

Lacasa normalmente presenta dos centros activos formados por 4 iones de cobre que presentan diferentes señales de resonancia paramagnética electrónica (Agrawal et al., 2018; Dwivedi et al., 2011; Mot & Silaghi-Dumitrescu, 2012):

- Cobre azul paramagnético (tipo 1). Se encuentra normalmente unido a un residuo cisteína por enlace covalente, provocando una absorción electrónica que da a las proteínas multicobre una coloración azul. Este cobre es en la mayoría de los casos el responsable de la oxidación del sustrato a causa de su alto potencia redox (+790 mV). Generalmente presenta una conformación con dos residuos histidina y uno cisteína en la parte ecuatorial y una posición axial variable, que generan un sistema de coordinación trigonal.
- Cobre normal paramagnético (tipo 2). Este cobre destaca por no presentar absorción en el espectro visible y estar situado en el centro activo cerca del cobre tipo 3, donde se encuentra coordinado por dos residuos de histidina.
- Par de cobre diamagnético (tipo 3). Centro binuclear de dos átomos de cobre coordinados por 6 residuos de histidina y acoplados entre sí por un puente hidroxilo que provoca únicamente una absorción electrónica en su forma oxidada. Este centro binuclear forma un cluster trinuclear con el cobre tipo 2, responsable de la reducción de oxígeno en agua.

En la mayoría de Lacasas (3 dominios cupredoxina), donde la proteína adopta una conformación monomérica, el cobre tipo 1 se sitúa en el dominio III, mientras que el cluster trinuclear de cobre tipo 2 y 3 se sitúa en el punto de contacto entre el dominio I y III. Por su parte, el dominio II facilita el ensamblamiento del cluster trinuclear al unir los dominios I y III (Figura 2). De forma diferente, en especies bacterianas, donde únicamente se encuentra formada por 2 dominios, la proteína adopta una estructura cuaternaria trómera, donde el centro catalítico se sitúa en la superficie de contacto del dominio I y II de dos estructuras monoméricas, de forma que el cobre tipo 1 se coloca en el dominio I o II (Arregui et al., 2019; Mot & Silaghi-Dumitrescu, 2012).

La catálisis enzimática de Lacasa ocurre a través de dos semirreacciones, así la primera de ellas comienza con la oxidación del sustrato (transferencia de un electrón) por el cobre de tipo 1, mediante la estabilización del sustrato por residuos hidrofóbicos situados en la parte posterior del bolsillo de unión. Para que esta oxidación pueda darse, una interacción entre dos residuos aspartato e histidina se debe producir en el centro de cobre tipo 1, provocando que el residuo aspartato permita la transferencia electrónica desde el sustrato al átomo de cobre. Tras esto, se produce la transferencia electrónica desde el centro de cobre tipo 1 hacia el motivo Cu₃α (cluster trinuclear), a través de un

puente formado por cisteína e histidina. La segunda semirreacción comienza con la transferencia de dos electrones del cobre de tipo 3 hacia el oxígeno, introducido por un canal accesible por el disolvente, provocando su reducción a un intermedio peróxido. Tras esto, el enlace O-O se rompe por la transferencia de dos electrones procedentes de cobre de tipo 1 y 2 simultáneamente con la transferencia de H⁺, provocando la formación de agua que es expulsada al exterior del enzima por un canal de salida accesible por el solvente (Arregui et al., 2019).

El proceso de inhibición de Lacasa se ha descrito que puede llevarse a cabo a través de la interrupción de la transferencia del electrón por la unión del inhibidor sobre el cobre de tipo 2 y 3, por quelación de átomos de cobre (II) o por el intercambio de residuos aminoacídicos, entre otros (Dwivedi et al., 2011).

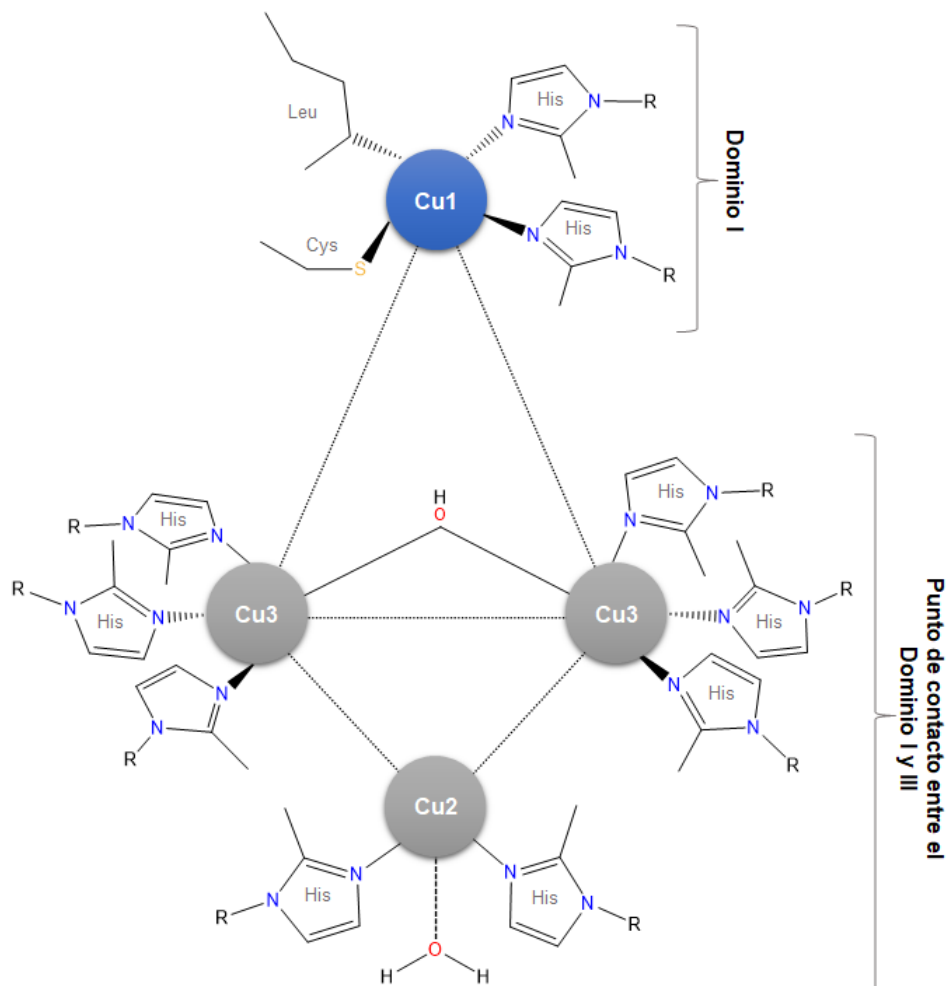


Figura 2. Centro activo de Lacasa de 3 dominios. Imagen inspirada principalmente de Agrawal *et al.* (2018) y secundariamente de Arregui *et al.* (2019) y Mot y Silaghi-Dumitrscu (2012).

1.1.4 Función biológica

La distribución de Lacasa en un extenso número de especies de organismos y el gran número de isoformas encontradas, provoca que este enzima presente una elevada variedad de roles biológicos (A. Sharma et al., 2018). A continuación, se expone brevemente alguna de estas.

Una de sus funciones destacables es su participación en el proceso de lignificación en células vegetales, en esta línea Liang *et al.* (2006) reportaron que la mutación del gen asociado a Lacasa *AtLAC15* provocó una reducción en el contenido de lignina en semillas de *Arabidopsis thaliana*, mientras que Wang *et al.* (2008) describieron como la sobreexpresión del gen asociado a Lacasa *GaLAC1* de algodón causaba una elevación en el contenido de lignina (Liang et al., 2006; A. Sharma et al., 2018; J. Wang et al., 2008).

En relación con el punto anterior, se ha descrito ampliamente la capacidad de deslignificación de los hongos sobre las paredes celulares vegetales, donde Lacasas fúngicas participan en este proceso debido a su habilidad de degradar lignina. Además de lo anterior, Eisenman *et al.* (2007) describieron la producción de melanina en *Cryptococcus neoformans* a partir de una catálisis oxidativa de L-Dopa asistida por Lacasa, pigmento que permite a esta y otras especies fúngicas patógenas prevenir diferentes daños celulares. Por último, se ha descrito la capacidad de Lacasas fúngicas de recolección de radicales libres, evitando la degradación oxidativa de compuestos del medio (Blanchette, 1991; Chakraborty et al., 2020; Eisenman et al., 2007; Kumar et al., 2015; A. Sharma et al., 2018; G. Singh & Arya, 2019).

Entre las diferentes funciones de Lacasa en bacterias se puede destacar su papel en la detoxificación de cobre, la protección de radiación ultravioleta a través de la formación de pigmentos en esporas o su intervención en el proceso patogénico de *Cryptococcus neoformans* a través de la oxidación de diferentes moléculas señalizadoras, como serotonina (Janusz et al., 2020; K. K. Sharma et al., 2018).

Entre los diferentes roles que puede adoptar Lacasa en el mundo animal, se puede destacar su papel en insectos. Así, Hattori *et al.* (2005) expusieron como la presencia de Lacasa en la saliva de *Nephotettix cincticeps* permitía a este insecto descontaminar su alimento (planta de arroz) por la polimerización de monolignoles. Asimismo, Arakane *et al.* (2005) describieron la intervención de Lacasa en la pigmentación y esclerotización de la cutícula de *Tribolium castaneum* en diferentes etapas de desarrollo, mientras que Suderman *et al.* (2006) mostró que Lacasa intervenía en el proceso de entrecruzamiento proteico de la esclerotización de cutícula de insectos a través de la oxidación de *N*-

acilcatecolaminas, provocando que este sustrato oxidado forme enlaces covalentes con proteínas cuticulares y estas últimas precipiten. En relación con esto último, Asano *et al.* (2019) han teorizado que el sistema de formación de la cutícula por Lacasa de insectos surge como una adaptación evolutiva de estos organismos en su proceso de colonización de la superficie terrestre, permitiendo a estos animales moverse de forma más eficiente respecto a animales con exoesqueletos constituidos por depósitos de sales de calcio (Arakane *et al.*, 2005; Asano *et al.*, 2019; Hattori *et al.*, 2005; Suderman *et al.*, 2006).

En este sentido, Lacasa podría ser un tema de investigación relevante debido al creciente interés por el uso de insectos en productos alimenticios humanos (Belluco *et al.*, 2013). Por último, además de la función de Lacasa en insectos, se ha descrito que la esponja *Suberites domuncula* lleva a cabo su defensa antibacteriana con el uso de Lacasa (Q. Li *et al.*, 2015).

1.1.5 Producción de Lacasa

Debido al interés científico e industrial de Lacasa, en los últimos años se han realizado numerosos estudios centrados en el proceso de optimización de su producción. La mayoría de las estrategias para obtener la enzima Lacasa se basan en la producción de ésta por hongos de la podredumbre blanca como *Trametes versicolor*. Estos hongos generan la enzima Lacasa en su metabolismo secundario para llevar a cabo la degradación de paredes celulares vegetales (Patel *et al.*, 2019; Pinheiro *et al.*, 2020; Silvério *et al.*, 2013). La producción de Lacasa se ve influenciada por diversos factores como las fuentes de carbono y nitrógeno, la concentración de vitaminas y microelementos, la temperatura o el pH del medio. Las mejores condiciones para la producción de Lacasa se dan a un pH ligeramente ácido (4.5-6) y a temperatura ambiente (25°C - 30°C). Sin embargo, un reciente estudio de Atilano-Camino *et al.* (2020) ha mostrado que la producción máxima de Lacasa se alcanza a una temperatura de 35°C. Actualmente, se emplean tanto la fermentación sumergida como la fermentación en estado sólido para la producción de Lacasa (Atilano-Camino *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2019; Silvério *et al.*, 2013).

1.1.5.1 Producción de Lacasa mediante fermentación sumergida

En la fermentación sumergida, el crecimiento microbiano se produce en un medio líquido de manera monitorizada. La fermentación sumergida es la estrategia más extendida, aunque tiene un elevado coste económico y energético. Permite controlar las condiciones del caldo de cultivo (pH, temperatura, etc.) y asegurar el abastecimiento de nutrientes a los microorganismos, de manera fácil y garantizando la esterilidad. En este

sentido, se ha usado la fermentación sumergida de *Trametes versicolor* para producir Lacasa a partir de residuos de la industria agrícola como fibras de coco, vinaza o salvado de trigo, entre otros. Sin embargo, la fermentación sumergida presenta como inconvenientes que la viscosidad del medio de cultivo es elevada, y que es imprescindible suministrar una gran cantidad de aire, para poder cubrir las necesidades de oxígeno de los microorganismos. Con el objeto de afrontar estas limitaciones, se han propuesto diversas opciones como la inmovilización celular, obteniéndose resultados diferentes en función de la especie de hongo. Así, mientras que se ha comprobado que la inmovilización celular de *Peniophora cinerea* ha generado un aumento de la producción de Lacasa, se ha observado que ésta conlleva una reducción del rendimiento de producción en *Trametes versicolor*. Por el contrario, Wang *et al.* (2013) observaron una mayor producción de Lacasa a partir *Trametes versicolor* sometida a inmovilización celular tras la sonicación del medio de cultivo (Atilano-Camino *et al.*, 2020; Manpreet *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2019; Pinheiro *et al.*, 2020; Silvério *et al.*, 2013; F. Wang *et al.*, 2013).

1.1.5.2 Producción de Lacasa mediante fermentación en estado sólido

En la fermentación en estado sólido, los microorganismos crecen sobre un soporte sólido de carácter inerte que puede tener un origen natural (e.g. residuos agroindustriales) o sintético (e.g. nylon). Aunque este soporte se mantiene húmedo, no existe un medio líquido como en el caso de la fermentación sumergida. En la fermentación en estado sólido no hay problemas relacionados con las limitaciones de oxígeno y no se generan residuos líquidos. Además, es más eficiente energéticamente y es menos cara que la fermentación sumergida. Por el contrario, la monitorización de los parámetros del medio y el posterior escalado industrial son más complicados. Asimismo, el tipo de biorreactor usado juega un papel importante en el rendimiento de la producción de Lacasa. Tras el estudio de la producción de Lacasa mediante fermentación en estado sólido de hongos del género *Trametes* sp. como *T. versicolor* y *T. hirsuta* con varios tipos de biorreactores (inmersión, lecho expandido y bandeja), se ha observado que la producción de Lacasa aumenta al emplear biorreactores de bandeja (Manpreet *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2019).

1.1.6 Otras enzimas oxidasas

1.1.6.1 *Tirosinasa*

Tirosinasa o polifenol oxidasa (EC 1.14.18.1) es una enzima, que al igual que Lacasa, posee átomos de cobre en su centro activo, y tiene un peso molecular de 13.4-128 kDa. Esta enzima se ha descrito en multitud de especies de animales, plantas, hongos o bacterias. La Tirosinasa oxida una gran variedad de sustratos como monofenoles y difenoles. Para que esta reacción de oxidación tenga lugar, es necesario la presencia de oxígeno y se ve favorecida por un pH neutro. Además, Tirosinasa posee estereoespecificidad, mostrando preferencia por los enantiómeros L. No obstante, esta enzima tiene un papel fundamental en la melanogénesis, ya que es la responsable de la oxidación de la L-tirosina. Asimismo, Tirosinasa tiene interés en diversos sectores de la industria alimentaria como la fabricación de bebidas (e.g. estabilización del vino) o la panadería (e.g. fortalecimiento de la masa), entre otros (Halaouli et al., 2006; Marín-Zamora et al., 2007; Muñoz-Muñoz et al., 2010; Sánchez-Ferrer et al., 1995; Tikhonov et al., 2019).

1.1.6.2 *Peroxidasa*

Peroxidasa (EC.1.11.1.7), a diferencia de Lacasa y Tirosinasa no es una cuproproteína, sino que cuenta con un grupo hemo en su centro activo. Se trata de una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza, con un peso molecular de 40 kDa aproximadamente dependiendo del organismo. Peroxidasa oxida una extensa variedad de sustratos, entre los que predominan los compuestos aromáticos. Las condiciones adecuadas para la reacción de oxidación catalizada por Peroxidasa incluyen: presencia de peróxido de hidrógeno y un pH de 7. Entre las numerosas aplicaciones de Peroxidasa destacan su empleo en la eliminación de colorantes sobrantes en la industria textil, o su uso en generación de productos intermedios en la industria farmacéutica (Hiner et al., 2002; Tikhonov et al., 2019).

1.2 APLICACIONES DE LACASA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

1.2.1 Biorremediación

A pesar de que no se emplean todavía de forma extensiva los tratamientos de limpieza de aguas residuales basados en Lacasa, existe una vasta cantidad de literatura científica que describe la capacidad de eliminar contaminantes por Lacasa (Arregui et al., 2019).

Una de las principales actividades de Lacasa descritas ha sido su capacidad para degradar fármacos (Yang et al., 2017). En este sentido, Koyappayil *et al.* (2021) describieron la degradación de adrenalina por Lacasa, Reda et al. (2019) mostraron que el uso de Lacasa de *Streptomyces mutabilis* permitía la degradación de antibióticos de tipo sulfamida en compuestos con una toxicidad considerablemente menor, y Lonappan *et al.* (2017) describieron la eliminación de diclofenaco a través de una apertura de anillo mediada por hidroxilación (Koyappayil et al., 2021; Lonappan et al., 2017; Reda et al., 2019). Por otra parte, se ha descrito también la capacidad de Lacasa para degradar disruptores endocrinos o pesticidas de interés agrícola como la atrazina (Patel et al., 2019). Esta capacidad de Lacasa de degradar fármacos, pesticidas o disruptores endocrinos antes descrita podría constituir una herramienta relevante para evitar la introducción de sustancias contaminantes en la cadena alimentaria.

Uno de los procesos de la industria alimentaria que más cantidad de residuos orgánicos sólidos y líquidos produce en las regiones del Mediterráneo es el procesado de la oliva (Mayolo-Deloisa et al., 2020). Entre estos, destacan los residuos derivados de la molienda de la oliva, los cuales presentan un valor de pH 5, grandes concentraciones de sal o polifenoles, que pueden provocar daños ambientales y en la salud humana. Diferentes artículos han estudiado la aplicación de Lacasa sobre residuos de molienda de la oliva, así Chiaiese *et al.* (2011) notificaron la capacidad de Lacasa de *Pleurotus ostreatus* expresada en una microalga y una planta transgénica de disminuir la cantidad de fenoles en el residuo mencionado. Por su parte, Ergül *et al.* (2009) reportaron la actividad de Lacasa y manganeso Peroxidasa en *Trametes versicolor* en la eliminación de fenoles de los residuos de molienda de oliva (Chiaiese et al., 2011; Ergül et al., 2009; Osma et al., 2010).

Además de los residuos derivados del procesamiento de la oliva, se pueden destacar por su importancia industrial los residuos de destilería y de producción de cerveza. En el primer caso, estos residuos se caracterizan por presentar una gran diversidad de compuestos químicos en elevadas concentraciones, tales como metales alcalinos o compuestos orgánicos. De entre todos estos compuestos destaca la

melanoidina, compuesto tóxico para animales. Por su parte, los residuos de cerveza se caracterizan por presentar una alta concentración de taninos. En este sentido, a pesar de la dificultad de degradación de la melanoidina por métodos convencionales, Singh *et al.* (2015) describieron la degradación de estos compuestos con Lacasa inmovilizada en aluminio. Por su parte, se ha descrito la síntesis de Lacasa asociada a la degradación del residuo de producción de cerveza por el cultivo de *Corolopsis gallica* (Chowdhary *et al.*, 2018; Mayolo-Deloisa *et al.*, 2020; N. Singh *et al.*, 2015).

1.2.2 Aprovechamiento de subproductos relacionados con lignina

La lignina es un polímero, constituido por residuos fenilpropanoides, que se encuentra junto a celulosa y hemicelulosa en los tejidos vegetales, confiriéndoles a estos una importante estabilidad y dureza. Así, la biomasa terrestre se encuentra formada en un alto porcentaje por lignocelulosa, destacándose su alta presencia en residuos agrícolas derivados del arroz o trigo, entre otros cultivos. En este sentido, se ha invertido un importante esfuerzo por la comunidad científica en el estudio de metodologías catalíticas de degradación de lignina para su transformación en subproductos útiles, habiéndose conseguido hitos tales como la síntesis de nanocomplejos metálicos de oro y plata con propiedades antioxidantes y antimicrobianas a partir de lignina de residuos agrícolas. A pesar de lo anterior, entre las estrategias de valorización más estudiadas para lignina destaca la producción de biocombustible (Becker & Wittmann, 2019; Shin *et al.*, 2019; Singhvi & Gokhale, 2019; Van den Bosch *et al.*, 2018).

Así, con relación a lo comentado anteriormente (apartado 1.1.4) sobre el rol biológico de Lacasa fúngica en la degradación de lignina, se ha descrito el uso de Lacasa como pretratamiento industrial en procesos de valorización de lignina. En esta línea, Rencoret *et al.* (2017) describieron la eliminación de lignina en paja y bagazo de caña de azúcar por Lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*, permitiendo una mejora en el bioproceso de obtención de subproductos derivados de la hidrólisis de carbohidratos presentes en estos residuos. Esta biotransformación anterior se encuentra normalmente limitada en estos residuos debido al impedimento en el acceso a estos carbohidratos provocado por la lignina. Similarmente con lo anterior, Giacobbe *et al.* (2018) notificaron un incremento de la sacarificación de la piel plateada de grano de café y de la pulpa de manzana, derivado de la efectiva retirada de lignina de estos residuos (Giacobbe *et al.*, 2018; Rencoret *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2019).

1.2.3 Desarrollo de métodos analíticos

Debido a su capacidad para oxidar compuestos fenólicos, Lacasa ha sido empleada para la identificación de diferentes compuestos de relevancia agroalimentaria, como pesticidas (Bucur et al., 2018; Osma et al., 2010).

Así, Di Fusco *et al.* (2010) diseñaron y validaron un sensor amperométrico de Lacasa de *Trametes hirsuta* inmovilizada con poliazetidina para la medición del índice de polifenoles en vinos. Por su parte, Đurđić *et al.* (2021) realizaron un trabajo similar a los anteriores autores pero inmovilizando Lacasa de *Trametes versicolor* con un nanocomposite constituido por nanoplaquetas de grafeno y nanopartículas de MnO₂, que permitía al sistema realizar medidas de forma rápida y precisa (Di Fusco et al., 2010; Đurđić et al., 2021).

Por otro lado, Zapp *et al.* (2011) presentaron un biosensor de Lacasa de *Aspergillus oryzae* que permitía cuantificar la cantidad del insecticida metomilo en muestras de zanahoria y tomate a través de la medida del grado de inhibición enzimática. En este sensor, la inmovilización enzimática fue llevada a cabo sobre una fase de 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato y platino (Zapp et al., 2011).

1.2.4 Procesamiento industrial de diferentes alimentos

1.2.4.1 Estabilización de bebidas

El vino es un producto alimentario formado por diferentes compuestos tales como polifenoles, etanol o ácidos orgánicos, entre otros, que dotan a este producto de su característico color y sabor. En este sentido, se ha descrito la adición de Lacasa en vinos, como un tratamiento de estabilización efectivo debido a su capacidad de eliminación de polifenoles en medio ácido y su posibilidad de inactivarse de forma reversible a través del uso de sulfito. Asimismo, Minussi *et al.* (2007) aplicaron el uso de Lacasa de *Trametes versicolor* en la estabilización de vino blanco, obteniendo una disminución de fenoles totales asimétrica con la caída de la capacidad antioxidante. Por su parte, Conrad *et al.* (2000) patentaron un tratamiento con Lacasa para el procesamiento de embotellado del vino (Conrad et al., 2000; Minussi et al., 2007; Osma et al., 2010).

Por otro lado, se ha descrito la eliminación del oxígeno de la cerveza por el uso de Lacasa para elevar la vida útil de almacenamiento. Otra aplicación descrita para Lacasa ha sido la clarificación de zumos al provocar la reducción de la velocidad de formación de precipitados polifenol-proteína. En este sentido, diferentes autores reportan resultados contradictorios sobre esta aplicación, ya que Neifar *et al.* (2011)

reportaron el aumento de la claridad del zumo de granada tras el tratamiento de Lacasa de forma combinada con un proceso de ultrafiltración, mientras que Sammartino *et al.* (1998) mostraron que el tratamiento de Lacasa sobre zumo de manzana provocaba una reducción en su estabilidad (Neifar *et al.*, 2011; Osma *et al.*, 2010; Sammartino *et al.*, 1998).

1.2.4.2 Entrecruzamiento polimérico en productos de panadería

Tal y como se ha descrito anteriormente, Lacasa presenta la capacidad de producir polímeros entrecruzados, así pues, esta propiedad permite que esta enzima muestre aplicaciones en procesos de panadería, tales como la mejora del procesamiento de la masa derivada de una mayor sequedad o dureza de esta (Osma *et al.*, 2010).

Respecto a este punto, Selinheimo *et al.* (2006) reportaron como la aplicación de Lacasa de *Trametes hirsuta* provocó un aumento de la resistencia máxima al estiramiento de la harina y masa de gluten. Por su parte, Renzetti *et al.* (2010) describieron como el uso de Lacasa y proteasa permitió obtener una calidad textural superior respecto a glucosa oxidasa en pan y harina de avena (Renzetti *et al.*, 2010; Selinheimo *et al.*, 2006).

1.2.4.3 Desamargado de olivas

La oliva es un alimento extendido ampliamente en los países de la cuenca del Mediterráneo, caracterizado por ser fuente de nutrientes lipídicos como ácido oleico monoinsaturado y otros compuestos promotores de la salud. Este fruto una vez es recolectado, contiene un glucósido denominado oleuropeína (molécula constituida por la unión de hidroxitirosol, ácido elenólico y glucosa) que confiere sabor amargo a la oliva, provocando su inhabilidad para ser consumido como alimento. Por lo tanto, diferentes procesos de desamargado, como su remojo en salmuera o sosa, o secado, son realizados para mejorar su palatabilidad (D. Boskou *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2014).

En la actualidad, se pueden diferenciar en la industria alimentaria tres tipos de productos de oliva en base a su proceso de desamargado (Johnson & Mitchell, 2018):

- Oliva griega natural, donde el desamargado de la oliva se realiza por difusión de oleuropeína hacia una disolución de salmuera del 8-10% de NaCl, presentando un intervalo de duración de 6 a 12 meses.
- Oliva verde española, donde el desamargado se lleva a cabo por hidrólisis básica de oleuropeína con NaOH principalmente, tras lo cual presenta un

procesamiento semejante a la oliva griega. El tiempo de desamargado es ligeramente menor a la oliva griega natural (1-7 meses).

- Oliva negra estilo californiano, donde la oliva es desamargada por hidrólisis básica con NaOH, tras lo cual se le realiza un lavado con agua combinado con burbujeo de oxígeno. Este proceso de desamargado es repetido en diferentes ciclos. Este proceso de desamargado presenta una importante reducción de tiempo respecto los métodos anteriores (1 semana).

Por ello, la aplicación de NaOH en los procesos de desamargado de olivas permite significativamente reducir el tiempo de procesado. El mecanismo de acción de este tratamiento consiste en una inicial ruptura del enlace éster formado entre hidroxitirosol y el glucósido de ácido elenólico, tras lo cual, se produce la liberación de la molécula de glucosa de la molécula anterior (Figura 3). Esto provoca la degradación de la molécula de ácido elenólico, debido a su inestabilidad a pH ácido. A pesar de la ventaja mostrada del uso de NaOH, este método provoca una gran acumulación de residuos cáusticos y una pérdida de la calidad nutricional de la oliva, motivo por el que métodos alternativos al uso de NaOH deben ser desarrollados para el desamargado de olivas (D. Boskou et al., 2015; Guggenheim et al., 2018; Johnson & Mitchell, 2018).

Enzimas endógenas de oliva han sido señaladas por su papel en la variación de la concentración de diferentes compuestos fenólicos en la oliva (Ramírez et al., 2014). En este sentido, Ramírez *et al.* (2016) mostraron que olivas verdes sin tratar almacenadas unos meses sufrían un proceso de desamargado natural a través de la actividad enzimática endógena de β -glucosidasa y esterasa sobre oleuropeína en el fruto. En estos procesos enzimáticos, β -glucosidasa produce la degradación de oleuropeína en glucosa y la forma decarboxilmetil dialdehídica de la mitad aglicónica de oleuropeína (Figura 3). Por su parte, esterasa produce la ruptura del enlace éster entre ácido elenólico e hidroxitirosol (Figura 3). Sobre esta línea, Guggenheim *et al.* (2018) describieron la capacidad de β -glucosidasa de *Streptomyces* sp. de degradar oleuropeína en un extracto de hoja de oliva, mientras que en el fruto el enzima no era capaz de realizar la degradación de forma significativa debido a su dificultad para introducirse en el fruto (De Leonardis et al., 2015; Guggenheim et al., 2018; Ramírez et al., 2016).

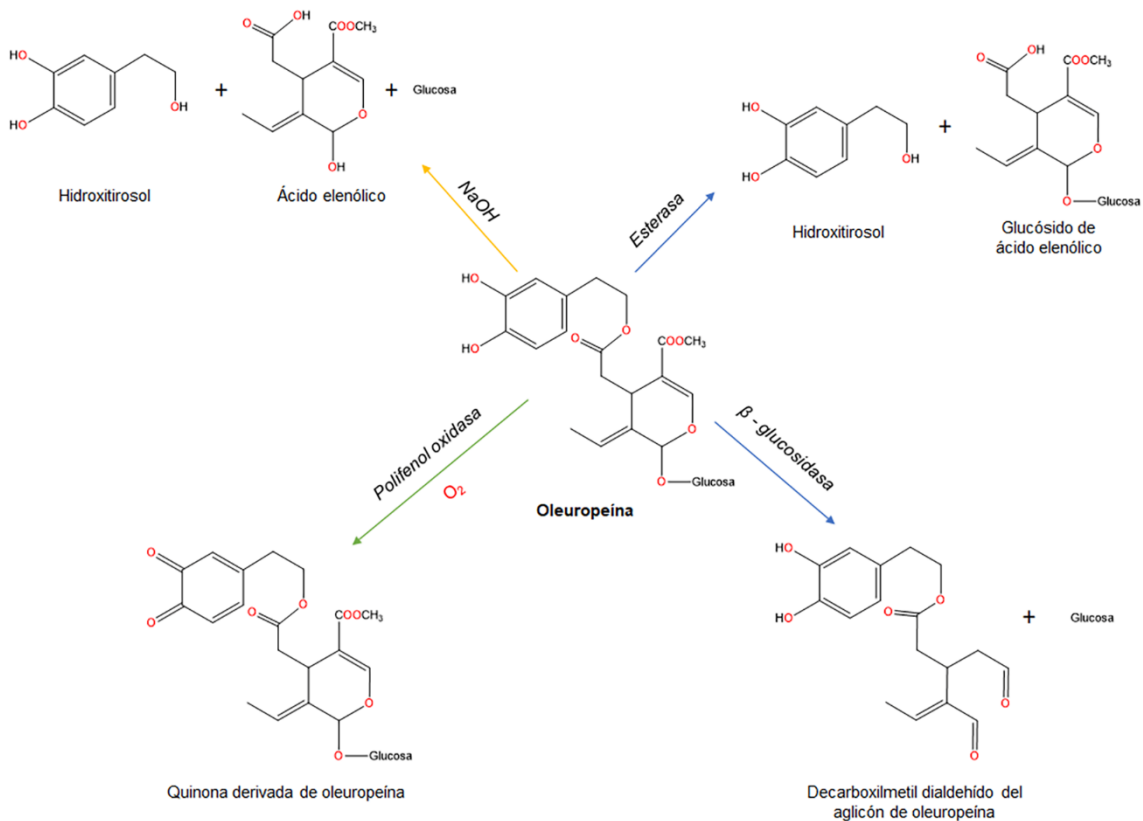


Figura 3. Procesos de transformación y degradación de oleuropeína. Imagen inspirada en Ramírez *et al.* (2016) y Boskou *et al.* (2015).

Además de las enzimas anteriores, polifenol oxidasa puede participar en procesos de oscurecimiento de la oliva a través de la oxidación de diferentes fenoles. En este marco, este enzima también provoca la oxidación de oleuropeína en una quinona que espontáneamente polimeriza, dando lugar a un compuesto no amargo (Figura 3) (D. Boskou *et al.*, 2015). Asimismo, De Leonardis *et al.* (2013) mostraron la capacidad de Lacasa de *Trametes versicolor* para eliminar oleuropeína en muestras de aceite de oliva virgen (De Leonardis *et al.*, 2013).

1.2.4.4 Mejora de propiedades alimentarias de diferentes sustratos

Lacasa es un enzima que tiene la capacidad de catalizar la transformación de diferentes sustratos en compuestos químicos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes mejoradas respecto el sustrato de partida (Mohit *et al.*, 2020).

Respecto a este punto, Polak *et al.* (2020) notificaron la producción de compuestos fenazínicos a partir de la biotransformación de derivados benzoicos y naftalenos por Lacasa de *Cerrena unicolor*, siendo mostrada la actividad antimicrobiana de alguno de estos compuestos sobre *Staphylococcus aureus*. En esta línea, Božič *et al.* (2012a) consiguieron con el uso de Lacasa de *Trametes versicolor* la funcionalización de

quitosano con quercetina y ácido tánico, logrando un incremento de la capacidad antioxidante respecto a los compuestos de partida. De forma similar al estudio anterior, Božič *et al.* (2012b) describieron que la enzima anterior era capaz de funcionalizar quitosano con ácido cafeico y ácido gálico, obteniéndose un nuevo compuesto basado en quitosano que presentaba una actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* que era mayor respecto al quitosano nativo (Božič *et al.*, 2012a, 2012b; Polak *et al.*, 2020).

Por otra parte, De Leonardis *et al.* (2013) mostraron que el tratamiento con Lacasa de *Trametes versicolor* sobre aceite de oliva virgen, provocaba en este una mejora de su capacidad antioxidante, derivada según los autores por los subproductos de la oxidación de polifenoles producida por el enzima. A pesar de las funciones tecnológicas negativas de oleuropeína mostradas anteriormente (apartado 1.2.4.3), esta molécula presenta propiedades saludables en el ser humano derivadas de su actividad antioxidante, cardioprotectora o antimicrobiana entre otras. Además de ello, oleuropeína es uno de los compuestos que más contribuye en la actividad antimicrobiana en extractos de hoja de oliva (De Leonardis *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2021; Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2021).

Por todo lo anterior expuesto, futuras investigaciones podrían ser llevadas a cabo para la producción con Lacasa de derivados de oleuropeína que presenten actividades antioxidantes y antimicrobianas más elevadas respecto a oleuropeína nativa.

2 OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis doctoral es el estudio de la actividad enzimática de Lacasa y sus aplicaciones en el campo de la tecnología alimentaria.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Desarrollo de un método adecuado para la medida de la actividad enzimática de la proteína Lacasa (EC.1.10.3.2) y comparación con otros métodos analíticos descritos en la literatura.

II. Caracterización de la cinética de la actividad enzimática de Lacasa con diferentes sustratos de naturaleza metoxifenólica.

III. Establecimiento de los efectos de la actividad enzimática de Lacasa sobre la estereoisomería de diferentes sustratos, además de los anteriores.

IV. Caracterización de la cinética de la actividad enzimática de Lacasa con diferentes catecolaminas relacionadas estructuralmente con sustratos implicados en el proceso de esclerotización de insectos.

V. Estudio de acoplamiento molecular “docking” de la interacción entre las catecolaminas y Lacasa.

VI. Caracterización de la cinética de la actividad enzimática de Lacasa con diferentes sustratos farmacológicos y tóxicos, para sentar las bases para una posible aplicación de Lacasa en un proceso descontaminante en la cadena alimentaria.

VII. Estudio de la cinética de Lacasa y diferentes enzimas relacionadas sobre oleuropeína y 3-hidroxitirosol, con objeto de sentar las bases del desarrollo de un proceso tecnológico alternativo a la adición de NaOH en la eliminación de amargor de la oliva.

VIII. Estudio de acoplamiento molecular “docking” de la interacción entre oleuropeína y 3-hidroxitirosol con Lacasa y enzimas relacionadas.

3 JUSTIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

La presente tesis doctoral está constituida por el compendio de tres publicaciones que representan una unidad científica y que abordan los objetivos planteados. A continuación, se expone la justificación y estructura de la tesis doctoral y se indica que objetivos específicos son tratados en cada una de las publicaciones:

PUBLICACIÓN 1: Development of a method to measure laccase activity on methoxyphenolic food ingredients and isomers.

En este trabajo se ha realizado el estudio de la catálisis oxidativa llevada a cabo por Lacasa de *Trametes versicolor* sobre los ingredientes alimentarios 2-metoxifenol (guaiacol) y 2,6-dimetoxifenol (siringol), y sobre sus isómeros 3-metoxifenol, 4-metoxifenol, 2,3-dimetoxifenol, 3,4-dimetoxifenol y 3,5-dimetoxifenol. Para su medida, se ha desarrollado en este trabajo un método cronométrico que evite los errores de medida derivados de la generación de los radicales libres producidos por la oxidación catalítica de Lacasa. Este método se basa en la adición de ácido ascórbico, el cual provoca la generación de un periodo Lag o de retardo en la aparición del producto de la catálisis provocado por la reducción de los radicales metoxifenol. La medida del periodo Lag, permite la determinación de velocidades de estado estacionario precisas de Lacasa.

Objetivos llevados a cabo en el trabajo:

- *Objetivo específico I.* Desarrollo de un método adecuado para la medida de la actividad enzimática de la proteína Lacasa (EC.1.10.3.2) y comparación con otros métodos analíticos descritos en la literatura.
- *Objetivo específico II.* Caracterización de la cinética de la actividad enzimática de Lacasa con diferentes sustratos de naturaleza metoxifenólica.
- *Objetivo específico III.* Establecimiento de los efectos de la actividad enzimática de Lacasa sobre la estereoisomería de diferentes sustratos, además de los anteriores.

PUBLICACIÓN 2: Kinetic characterization of the oxidation of catecholamines and related compounds by laccase.

El método desarrollado en la anterior publicación fue utilizado para la determinación de la actividad de Lacasa de *Trametes versicolor* sobre catecolaminas relacionadas con la esclerotización de la cutícula de insectos y de carácter farmacológico: L-dopa, L-epinefrina, L-norepinefrina, DL-isoprenalina, L-isoprenalina, DL- α -metildopa, L- α -metildopa y L-dopametiléster. Debido a que la mayoría de los compuestos anteriores se encuentran en forma hidrociorada, se caracterizó la inhibición de cloruro sobre el enzima, para poder obtener los parámetros cinéticos de su oxidación por Lacasa, Km y velocidad máxima (Vm). Los resultados obtenidos sobre la cinética de los sustratos anteriores mostraron que la formación del éster (L-dopametiléster) no afectaba la catálisis, mientras que la presencia de un grupo isopropilo unido a nitrógeno en estos sustratos dificultaba la catálisis. Por su parte, se obtuvo que la adición de un grupo metilo (α -metildopa) provocaba un incremento de velocidad unido a una reducción de su afinidad catalítica. Por último, se llevó a cabo el estudio del acoplamiento molecular de las catecolaminas sobre el centro activo del enzima, notificándose la interacción por puente de hidrogeno entre el C-4 y los residuos His-458 y Asp-206, que permitirían la transferencia electrónica al cobre de tipo 1 en el centro activo del enzima. Además de lo anterior, se observó como el residuo Phe-265 facilitaba la unión del sustrato en el bolsillo enzimático a través de interacciones π - π .

Objetivos llevados a cabo en el trabajo:

- *Objetivo específico IV.* Caracterización de la cinética de la actividad enzimática de Lacasa con diferentes catecolaminas relacionadas estructuralmente con sustratos implicados en el proceso de esclerotización de insectos.
- *Objetivo específico V.* Estudio de acoplamiento molecular “docking” de la interacción entre las catecolaminas y Lacasa.
- *Objetivo específico VI.* Caracterización de la cinética de la actividad enzimática de Lacasa con diferentes sustratos farmacológicos y tóxicos, para sentar las bases para una posible aplicación de Lacasa en un proceso descontaminante en la cadena alimentaria.

PUBLICACIÓN 3: Enzymatic oxidation of oleuropein and 3-hydroxytyrosol by laccase, peroxidase and tyrosinase.

En este trabajo se realizó el estudio de la catálisis enzimática de oxidación de oleuropeína y 3-hidroxitirosol por Lacasa, Tirosinasa y Peroxidasa, obteniéndose los parámetros cinéticos de V_m y K_m de cada enzima sobre estos sustratos. En este sentido, se obtuvo que oleuropeína presentaba una mayor afinidad de unión por Lacasa respecto al resto de las enzimas estudiadas. Por otra parte, se realizó el estudio de la capacidad antioxidante de estos sustratos, presentando estos valores similares. Por último, se realizó el estudio de acoplamiento molecular de estos sustratos sobre las distintas enzimas de estudio, observándose que ambos sustratos presentaban la misma posición óptima de unión sobre los distintos enzimas. Se puede destacar, como la parte o-difenol de ambas moléculas se unieron a Lacasa a través de los residuos mencionados en el anterior trabajo, presentando hidroxitirosol una unión adicional de enlace de hidrógeno con el residuo Pro-163, mientras que oleuropeína presentó enlaces de hidrógeno con los residuos Gly-334 y Gly-39, además de una interacción hidrofóbica con el residuo Phe-332, lo que provocó que Lacasa de *Trametes versicolor* presentase un valor menor en la constante de disociación (K_d).

Objetivos llevados a cabo en el trabajo:

- *Objetivo específico VII.* Estudio de la cinética de Lacasa y diferentes enzimas relacionadas sobre oleuropeína y 3-hidroxitirosol, con objeto de sentar las bases del desarrollo de un proceso tecnológico alternativo a la adición de NaOH en la eliminación de amargor de la oliva.
- *Objetivo específico VI.* Estudio de acoplamiento molecular “docking” de la interacción entre oleuropeína y 3-hidroxitirosol con Lacasa y enzimas relacionadas.

4 PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL

PUBLICACIÓN 1

Revista: *International Journal of Biological Macromolecules*

Factor de impacto (2020): 6.953

Ámbito: Biochemistry & Molecular Biology; Chemistry, Applied; Polymer Science

Rango: 52/298 (Q1); 10/71 (Q1); 6/88 (Q1)

Título: Development of a method to measure laccase activity on methoxyphenolic food ingredients and isomers

Autores: Manzano-Nicolas, J., Marin-Iniesta, F., Taboada-Rodriguez, A., Garcia-Canovas, F., Tudela-Serrano, J., Muñoz-Muñoz, J.L.

Resumen: We studied the laccase-catalysed oxygenation of methoxyphenolic food ingredients, such as 2-methoxyphenol (guaiacol) and 2,6-dimethoxyphenol (syringol), isomers such as 3- and 4-methoxyphenol, and 2,3-, 3,4- and 3,5-dimethoxyphenol. These methoxyphenolic substrates generate unstable free radicals, which leads to the erroneous determination of steady state rates. The addition of small quantities of ascorbic acid as coupling reagent generates a lag period because it reduces free radicals to methoxyphenols. Measurement of the length of the lag period provides the reliable determination of true steady state rates. We describe the application of this chronometric method to the kinetic characterization of the oxidation of the above methoxyphenolic substrates by *Trametes versicolor* laccase.

Año: 2020

Volumen: 151

Páginas: 1099-1107

URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.152>

PUBLICACIÓN 2**Revista:** *International Journal of Biological Macromolecules***Factor de impacto (2020):** 6.953**Ámbito:** Biochemistry & Molecular Biology; Chemistry, Applied; Polymer Science**Rango:** 52/298 (Q1); 10/71 (Q1); 6/88 (Q1)**Título:** Kinetic characterization of the oxidation of catecholamines and related compounds by laccase**Autores:** Manzano-Nicolas, J., Taboada-Rodríguez, A., Teruel-Puche, J.A., Marin-Iniesta, F., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., Tudela-Serrano, J., Muñoz-Muñoz, J.L.**Resumen:** The pathways of melanization and sclerotization of the cuticle in insects are carried out by the action of laccases on dopamine and related compounds. In this work, the laccase action of *Trametes versicolor* (TvL) on catecholamines and related compounds has been kinetically characterized. Among them, dopamine, l-dopa, l-epinephrine, l-norepinephrine, dl-isoprenaline, l-isoprenaline, dl- α -methyldopa, l- α -methyldopa and l-dopa methylester. A chronometric method has been used, which is based on measuring the lag period necessary to consume a small amount of ascorbic acid, added to the reaction medium. The use of TvL has allowed docking studies of these molecules to be carried out at the active site of this enzyme. The hydrogen bridge interaction between the hydroxyl oxygen at C-4 with His-458, and with the acid group of Asp-206, would make it possible to transfer the electron to the T1 Cu-(II) copper centre of the enzyme. Furthermore, Phe-265 would facilitate the adaptation of the substrate to the enzyme through Π - Π interactions. To kinetically characterize these compounds, we need to take into consideration that, excluding l-dopa, l- α -methyldopa and dl- α -methyldopa, all compounds are in hydrochloride form. Because of this, first we need to kinetically characterize the inhibition by chloride and, after that, calculate the kinetic parameters K_M and $V_{max}S$. From the kinetic data obtained, it appears that the best substrate is dopamine. The presence of an isopropyl group bound to nitrogen (isoprenaline) makes it especially difficult to catalyse. The formation of the ester (l-dopa methyl ester) practically does not affect catalysis. The addition of a methyl group (α -methyl dopa) increases the rate but decreases the affinity for catalysis. l-Epinephrine

and l-norepinephrine have an affinity similar to isoprenaline, but faster catalysis, probably due to the greater nucleophilic power of their phenolic hydroxyl.

Año: 2020

Volumen: 164

Páginas: 1256-1266

URL: <https://doi.org/10.1016/j.jjbiomac.2020.07.112>

PUBLICACIÓN 3

Revista: *Journal of Food Biochemistry*

Factor de impacto (2020): 2.720

Ámbito: Food Science & Technology; Biochemistry & Molecular Biology

Rango: 73/144 (Q3); 213/298 (Q3)

Título: Enzymatic oxidation of oleuropein and 3-hydroxytyrosol by laccase, peroxidase and tyrosinase

Autores: Manzano-Nicolas, J., Taboada-Rodriguez, A., Teruel-Puche, J.A., Marin-Iniesta, F., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., Tudela-Serrano, J., Muñoz-Muñoz, J.L.

Resumen: The oxidation of oleuropein and 3-hydroxytyrosol by oxidases laccase, tyrosinase and peroxidase has been studied. The use of a spectrophotometric method and another spectrophotometric chronometric method has made it possible to determine the kinetic parameters V_{max} and K_M for each enzyme. The highest binding affinity was shown by laccase. The antioxidant capacities of these two molecules have been characterized, finding a very similar primary antioxidant capacity between them. Docking studies revealed the optimal binding position, which was the same for the two molecules and was a catalytically active position. PRACTICAL APPLICATIONS: One of the biggest environmental problems in the food industry comes from olive oil mill wastewater with a quantity of approximately 30 million tons per year worldwide. In addition, olive pomace, the solid residue obtained from the olive oil production, is rich in hydroxytyrosol and oleuropein and the action of enzymatic oxidases can give rise to products in their reactions that can lead to polymerization. This polymerization can have beneficial effects because it can increase the antioxidant capacity with potential application on new functional foods or as feed ingredients. Tyrosinase, peroxidase, and laccase are the enzymes degrading these important polyphenols. The application of a spectrophotometric method for laccase and a chronometric method, for tyrosinase and peroxidase, allowed us to obtain the kinetic information of their reactions on hydroxytyrosol and oleuropein. The kinetic information obtained could advance in the understanding of the mechanism of these important industrial enzymes.

Año: 2021

Volumen: No asignado

Páginas: No asignado

URL: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13803>

5 COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS DURANTE LA TESIS DOCTORAL

Congreso: I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers

Tipo de comunicación: Comunicación Oral

Lugar: Murcia

Fecha: 22-23 de octubre de 2020

Título: Design and validation of a method to measure laccase activity on methoxyphenolic food additives

Autores: Manzano-Nicolas, J., Marin-Iniesta, F., Taboada-Rodriguez, A., Tudela-Serrano, J., Garcia-Molina, P., Muñoz-Muñoz, J.L.

Resumen: Laccase is a copper-protein (Mayer & Staples, 2002) which presents different applications in food industry like: clarification of fruit juices through the fall of formation of phenol-protein complexes, bioremediation of phenolic residues from waste waters of agri-food industry or the improvement of antioxidant and antimicrobial ability of food additives and ingredients (Manzano-Nicolas et al., 2020). In this work, it has been studied the catalytic activity of laccase, oxidation, on methoxyphenolic food ingredients, such as 2-methoxyphenol (guaiacol) and 2,6-dimethoxyphenol (syringol), and isomers such as 3- and 4-methoxyphenol, 2,3-, 3,4- and 3,5-dimethoxyphenol. Normally, mistaken results of steady state rates are obtained by the production of unstable free radicals during the oxidation of methoxyphenols. In this sense, if it is added small quantities of ascorbic acid as coupling reagent during enzymatic measures assays, it produces a lag period for the regeneration of methoxyphenols (reduction of free radicals). So, quantification of lag period time allows to obtain a more accurate determination of true steady state rates, as it was described previously for peroxidase and tyrosinase (Manzano-Nicolas et al., 2020). In this work, we report the application and validation of this chronometric method to obtain the kinetic parameters (K_m and V_m) of catalytic oxidation by *Trametes versicolor* laccase on methoxyphenols before listed. So, syringol presented the highest catalytic power (V_m/K_m) respect to all substrates studied ($142.20 \pm 3.60 \text{ h}^{-1}$) according to its chemical displacements of the carbon atom that supports the hydroxyl group (128.5 ppm) (Manzano-Nicolas et al., 2020).

ISBN: 978-84-09-24510-9

Congreso: V Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia

Tipo de comunicación: Póster

Lugar: Murcia

Fecha: 29-31 de mayo de 2019

Título: Puesta a punto de un método de medida de actividad de Lacasa sobre ingredientes alimentarios metoxifenólicos e isómeros

Autores: Manzano-Nicolas, J., Marin-Iniesta, F., Taboada-Rodriguez, A., Tudela-Serrano, J., Muñoz-Muñoz, J.L., Garcia-Canovas, F.

Resumen: Lacasa (EC.1.10.3.2) es una cupoproteína (Mayer & Staples, 2002) que presenta diferentes aplicaciones en la industria alimentaria como son: la clarificación de zumos de frutas a través de la reducción de la formación de los complejos fenol-proteína, biorremediación de residuos fenólicos procedentes de aguas de desecho de la industria agroalimentaria o la mejora de la capacidad antioxidante y antimicrobiana de aditivos e ingredientes alimentarios (Božič et al., 2012b; Osma et al., 2010). En la literatura se han descrito diferentes métodos espectrofotométricos de medida de la actividad de Lacasa (Moshtaghioun et al., 2011; Tinoco et al., 2001), pero todos ellos son específicos para determinados compuestos.

En este trabajo se propone el estudio y validación de un método espectrofotométrico cronométrico que permite el estudio de la actividad del enzima sobre un amplio grupo de compuestos y permite la obtención de los parámetros cinéticos: velocidad máxima (V_m) y constante de Michaelis (K_m). Para ello, se midió la actividad enzimática de siringol (2,6-Dimetoxifenol) y guaiacol (2-Metoxifenol), aditivos saborizantes de ahumado en alimentos (Kostyra & Baryłko-Pikielna, 2006), y sus isómeros, 2,3-metoxifenol, 3,4-metoxifenol, 3,5-metoxifenol, 3-metoxifenol y 4-metoxifenol con este método cronométrico. El método cronométrico fue validado por la comparación de los valores de V_m y K_m obtenidos de siringol y guaiacol, respecto a los obtenidos de estos sustratos por un método espectrofotométrico convencional.

Los resultados obtenidos muestran en primer lugar, la validez del método cronométrico, debido a la ausencia de diferencias significativas de los valores de V_m y K_m de siringol y guaiacol respecto a los obtenidos por el método espectrofotométrico convencional. A partir de estos datos se mostró una mayor afinidad del enzima por siringol y sus

isómeros, respecto guaiacol y sus isómeros, mientras que no se encontraron diferencias significativas de V_m entre los dos grupos de sustratos.

Este nuevo método de medida de la actividad enzimática de Lacasa sobre diferentes compuestos e ingredientes alimentarios, validado en el presente trabajo, permitirá preliminarmente evaluar el efecto de este enzima sobre diferentes matrices alimentarias, para posteriormente estudiar el efecto de su aplicación en el procesado de diferentes alimentos.



PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE MEDIDA DE ACTIVIDAD DE LACASA SOBRE INGREDIENTES ALIMENTARIOS METOXIFENÓLICOS E ISÓMEROS

J. Manzano-Nicolás¹, F. Marín-Iniesta¹, A. Taboada-Rodríguez¹, J. Tudela-Serrano², J.L. Muñoz-Muñoz³ y F. García-Canovas².

¹ Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España,

jesus.manzano1@um.es; ² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España; ³

Department of Applied Sciences, Northumbria University, Newcastle Upon Tyne NE1 8ST, Tyne & Wear, Inglaterra, Reino Unido.

RESUMEN

Lacasa (EC.1.10.3.2) es una copoproteína (Mayer & Staples, 2002) que presenta diferentes aplicaciones en la industria alimentaria como son: la clarificación de zumos de frutas a través de la reducción de la formación de los complejos fenol-proteína, biorremediación de residuos fenólicos procedentes de aguas de desecho de la industria agroalimentaria o la mejora de la capacidad antioxidante y antimicrobiana de aditivos e ingredientes alimentarios (Božić, Gorgieva, & Kokol, 2012; Osma, Toca-Herrera, & Rodríguez-Couto, 2010). En la literatura se han descrito diferentes métodos espectrofotométricos de medida de la actividad de lacasa (Moshtaghion et al., 2011; Tinoco, Pickard, & Vazquez-Duhalt, 2001), pero todos ellos son específicos para determinados compuestos. En este trabajo se propone el estudio y validación de un método espectrofotométrico cronométrico sobre siringol (2,6-Dimetoxifenol) y guaiaicol (2-Metoxifenol), y sus isómeros, para la obtención de los parámetros cinéticos: velocidad máxima (V_m) y constante de Michaelis (K_m). Los resultados obtenidos muestran en primer lugar, la validez del método cronométrico y la mayor afinidad del enzima por siringol y sus isómeros, respecto guaiaicol y sus isómeros.

OBJETIVOS

En este trabajo se propone el estudio y validación de un método espectrofotométrico cronométrico de la actividad del enzima Lacasa sobre un amplio grupo de ingredientes y que permita la obtención de V_m y K_m. Para ello, se midió la actividad enzimática de 2,6-Dimetoxifenol y 2-Metoxifenol, aditivos saborizantes de ahumado en alimentos (Kostyra & Baryko-Pikielna, 2006), y sus isómeros. El método fue validado por comparación con el método espectrofotométrico convencional.

MATERIALES Y METODOS

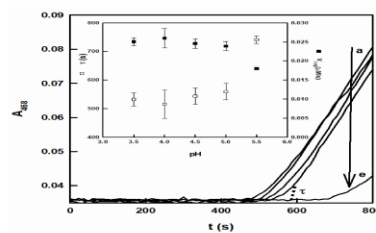
El método cronométrico propuesto consiste en medir el tiempo necesario en consumir una cantidad conocida de ácido ascórbico(τ), mediante su reacción con el radical libre generado por lacasa de *Trametes Versicolor* en su reacción con el sustrato. De este modo la determinación de V_m y K_m viene determinada por la medida de V_{SS} a una [S]₀.

$$V_{SS} = \frac{2[AH_2]_0}{\tau} \quad ; \quad V_{SS} = \frac{V_m [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

Elección de la longitud de onda de medida. En primer lugar, fue necesario determinar la longitud de onda en el UV-Vis en la que lacasa genera un producto de reacción enzimática que permita seguir la cinética enzimática. Para ello se realizaron registros espectrofotométricos en barrido en 200-500 nm sobre los sustratos metoxilados en tampón acetato 50 mM, pH 4 y 4.17-833.33 µg/mL.

Determinación de τ, K_m y V_m. Una vez seleccionada la longitud de onda de medida, se llevó a cabo la medida espectrofotométrica a una λ, durante 500 s, [E]₀=8.3-166 µg/mL sobre diferentes [S]₀ a una [AH₂]=0.16-94.14 µM en tampón acetato 50 mM, pH 4. τ fue determinado como la intersección de la tangente de la línea de incremento de producto de la reacción, sobre la línea base de señal constante de absorbancia, correspondiente con la reducción del producto radical generado por el AH₂ presente en la disolución de reacción. El Método espectrofotométrico tradicional se realizó midiendo el incremento de absorbancia en ausencia de AH₂. V_m y K_m fueron determinadas por la representación no lineal de V_{SS} sobre la [S]₀ con Sigma-Plot 12.5 (Systat Software, USA). Análisis de Varianza (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey (P>0.05) fue realizado con Statistix 10.0 (Analytical Software, USA).

RESULTADOS



pH: 4 (a), 3.5(b), 4.5(c), 5(d) y 5.5 (e).

| | Sustrato | K _m (nM)* | V _m (µM/s)* | δ _{ci} (ppm) |
|----------------------------|-------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| Método Cronométrico | 2,6-DiMeOPh | 0.02±0.00 ^a | 0.79±0.02 ^a | 128.5 |
| | 2,3-DiMeOPh | 3.43±0.10 ^a | 1.08±0.01 ^a | 151.3 |
| | 3,4-DiMeOPh | 0.22±0.02 ^{cd} | 0.61±0.01 ^c | 152.9 |
| | 3,5-DiMeOPh | 0.01±0.00 ^{cd} | 0.01±0.00 ^a | 159.3 |
| | 2-MeOPh | 0.61±0.03 ^{cd} | 0.75±0.01 ^b | 147.8 |
| Método Espectrofotométrico | 4-MeOPh | 0.73±0.09 ^{cd} | 1.04±0.03 ^a | 152.25 |
| | 3-MeOPh | 1.36±0.35 ^b | 0.31±0.02 ^d | 159.49 |
| | 2,6-DiMeOPh | 0.02±0.00 ^{cd} | 0.79±0.02 ^b | 128.5 |
| | 2-MeOPh | 0.45±0.02 ^{cd} | 0.75±0.01 ^b | 147.8 |

(* Standard deviations with values depicted as "±0.00" indicate experimental values equal or lower than 0.004.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran en primer lugar, la validez del método cronométrico, debido a la ausencia de diferencias significativas de los valores de V_m y K_m de siringol y guaiaicol respecto a los obtenidos por el método espectrofotométrico convencional. A partir de estos datos se mostró una mayor afinidad del enzima por siringol y sus isómeros, respecto guaiaicol y sus isómeros, mientras que no se encontraron diferencias significativas de V_m entre los dos grupos de sustratos.

Este nuevo método de medida de la actividad enzimática de lacasa sobre diferentes compuestos e ingredientes alimentarios, validado en el presente trabajo, permitirá preliminarmente evaluar el efecto de este enzima sobre diferentes matrices alimentarias, para posteriormente estudiar el efecto de su aplicación en el procesado de diferentes alimentos.

REFERENCIAS

- Božić, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2388–2398. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.006>
- Kostyra, E., & Baryko-Pikielna, N. (2006). Volatile composition and flavour profile identity of smoke flavourings. *Food Quality and Preference*, 17(1–2), 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.06.008>
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551–565. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00171-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00171-1)
- Moshtaghion, S. M., Haghighi, K., Loffi, Sahaghadam, A., Legge, R. L., Khoshniveizadeh, R., & Farhadi, S. (2011). Direct Spectrophotometric Assay of Laccase Using Diazo Derivatives of Guaiaicol. *Analytical Chemistry*, 83(11), 4200–4205. <https://doi.org/10.1021/acs.200910w>
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2010). Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Research*, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.actpep.2010.07.002>
- Tinoco, R., Pickard, M. A., & Vazquez-Duhalt, R. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 33(5), 331–335. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00913.x>

Congreso: I Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias

Tipo de comunicación: Póster

Lugar: Almería

Fecha: 20 de diciembre de 2018

Título: Efectos de termosonicación y refrigeración sobre compuestos bioactivos y recuentos microbiológicos en zumo de tomate

Autores: Manzano-Nicolas, J., Taboada-Rodriguez, A., Marin-Iniesta, F.

Resumen: Existe una demanda creciente durante los últimos años de alimentos mínimamente procesados, asociada a la mejora de sus propiedades nutricionales y sensoriales. En este sentido la termosonicación es una tecnología que está emergiendo como una alternativa a los métodos clásicos de procesamiento alimentario. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la termosonicación y refrigeración sobre parámetros de calidad (contenidos de licopeno y β -caroteno, actividad antioxidante y recuentos de aerobios, mohos y levaduras) en zumo de tomate. En este trabajo se ha estudiado el efecto de la termosonicación (24 kHz, 10.55 W/mL, 100 % amplitud, tipo sonda, $<40^{\circ}\text{C}$) durante un periodo de 1, 10, 20 y 30 minutos sobre zumo de tomate y el efecto de este tratamiento cuando las muestras ($n=3$) fueron almacenadas en refrigeración (5°C) durante 15 días. Los resultados mostraron una significativa reducción ($p<0.05$) de los contenidos de β -caroteno, licopeno y recuentos de mohos y levaduras, y un mantenimiento de actividad antioxidante y recuentos de aerobios con los tratamientos de termosonicación de 1-30 min. Por otra parte, las muestras de zumo de tomate almacenadas 15 días en refrigeración mostraron un incremento significativo de licopeno, mohos, levaduras y aerobios. Por otra parte, en refrigeración no hubo cambios significativos en los contenidos de β -caroteno, así como una significativa caída de actividad antioxidante. Podemos concluir que la termosonicación aplicada al zumo de tomate podría mejorar los parámetros de calidad microbiológica y capacidad antioxidante en tiempo cortos de almacenamiento. Sin embargo, la termosonicación no fue capaz de controlar el incremento de la población microbiana durante 15 días de refrigeración en zumo de tomate.

There is a growing demand during the last years of minimally processed foods, associated with the improvement of their nutritional and sensory properties. In this sense,

the application of thermosonication is a technology that is emerging as an alternative to classical methods of food processing. The objective of this work was to study the effect of thermosonication and refrigeration on quality parameters (lycopene and β -carotene contents, antioxidant activity and aerobic, mold and yeast counts) in tomato juice. In this work we have studied the effect of thermosonication (24 kHz, 10.55 W/mL, 100% amplitude, probe type, $<40^{\circ}\text{C}$) during a period of 1, 10, 20 and 30 minutes on tomato juice and the effect of this treatment when the samples ($n = 3$) were stored under refrigeration (5°C) for 15 days. The results showed a significant reduction ($p < 0.05$) in the contents of β -carotene, lycopene and mold and yeast counts, and a maintenance of antioxidant activity and aerobic counts with the thermosonication treatments of 1-30 min. On the other hand, samples of tomato juice stored 15 days in refrigeration showed a significant increase in lycopene and counts of molds, yeasts and aerobes. On the other hand, in refrigeration there were no significant changes in the contents of β -carotene as well as a significant drop in antioxidant activity. We can conclude that thermosonication applied to tomato juice could improve the parameters of microbiological quality and antioxidant capacity in short storage times. Whereas thermosonication was not able to control the increasing of microbiological counts during the 15 days of refrigeration storage in tomato juice.

ISBN: 978-84-09-13004-7



EFFECTS OF THERMOSONICATION AND REFRIGERATION ON BIOACTIVE COMPOUNDS AND MICROBIAL COUNTS IN TOMATO JUICE

MANZANO NICOLÁS, JESÚS*; TABOADA RODRIGUEZ, AMAURY AND MARIN INIESTA, FULGENCIO.

Group of Food Biotechnology (BTA), Food Technology, Nutrition and Bromatology Department, Faculty of Veterinary, University of Murcia, Campus de Espinardo, s/n, E-30100, Murcia, Spain.
*Corresponding Author email: jesus.manzano1@um.es

INTRODUCTION

Tomato products are characterized by possessing promoting health properties tightly associated to its content of lycopene, β -carotene, phenolic and flavonoid compounds or for its antioxidant activity (1,2). Normally, the reference treatment to reduce microbial and enzymatic presence and extend shelf life is thermal treatment (3,4). Despite this, thermal treatments involve sensory alterations and loss of nutrients in food, so non-thermal methods (e.g. high pressure, microwave or ultrasound) are emerging by improve properties of processed food products (3,5). In other way, it has been reported the ability of thermosonication (US plus mild thermal treatments) to reduce the microbial counts and the enzymatic activity in foods (4), so many scientific literature treat this last topic. Besides, sonication has been described for improving in vegetal materials the extraction methods and bioavailability of active compounds (6). Additionally, it has been reported the thermosonication by preserving in fruit products the stability of bioactive phytochemicals (4).

OBJECTIVES

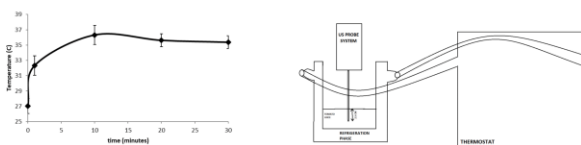
We propose to study the effect of thermosonication (24 kHz, 100 amplitude and 10.55 W/mL) on bioactive compounds as lycopene, β -carotene, antioxidant activity and the microbial stability (yeast, mold and total aerobic plate counts) in refrigerated tomato juice stored at 5°C during 15 days.

MATERIAL AND METHODS

Tomato juice samples (30 mL) were placed in the internal cavity of a double layered vessel connected to a thermostat (Digiterm 100, Selecta, Switzerland) which pumped room tempered water to external cavity of double layered vessel, a probe (3 mm of diameter, S3, Hielscher Ultrasonics, Germany) joined to an ultrasonic processor (UP200H, Hielscher Ultrasonics, Germany) was immersed 2.5 cm in tomato juice, so ultrasonic processor worked at 24 kHz, 100 amplitude and 10.55 W/mL during times of treatments (1, 10, 20 and 30 minutes) above 40 °C. Treatments were composed by a experimental triplicate, being control treatment (C) not submitted to ultrasound treatment. Finally, after ultrasound treatments, samples were microbiological analyzed and stored at -15 °C, in the case of being treatments with a storing time of 0 days, or stored in refrigeration (5 °C) during 15 days, being after again microbiological analyzed and stored at -15 °C.

Lycopene and β -Carotene were determined and quantified following the method of Nagata and Yamashita (1992) with light modifications (7); Antioxidant activity was analyzed through the method developed by Guerrouj et al. (2016) that is based from Blois (1958) (8,9); Aerobic plate counts and Yeast and mold counts were conducted according to FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM) (10, 11).

Results obtained were analyzed with Statistix 10 (Analytical Software, USA) through a two-way factorial variance analyze (ANOVA) with an interaction of up two factors, being made a means comparison post-hoc with Tukey-HSD contrast (P<0.05).



CONCLUSIONS

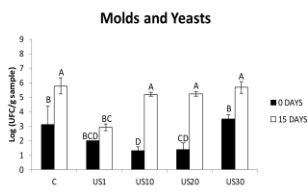
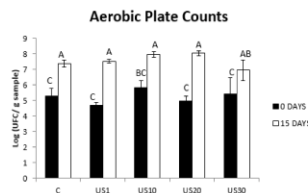
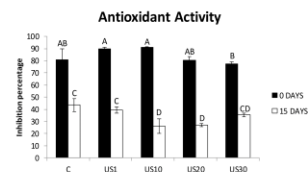
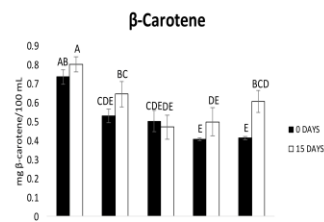
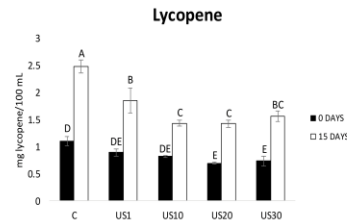
Thermosonication produced a progressive significant reduction of lycopene and β -carotene with the increasing of processing time. The antioxidant activity did not show significant changes when applying thermosonication for 0 to 30 minutes. No significant changes were detected in the aerobic microorganism counts with the thermosonication treatment, although the mold and yeast counts suffered a significant drop in most of the cases studied.

On the other hand, after 15 days of storage in refrigeration of thermosonicated samples, it was reported a misunderstood increase of lycopene, while β -carotene levels were stable respect to its initial values in all treatments studied. For its part, antioxidant activity was reduced with longer thermosonication processing. Finally thermosonication was not able to control the increasing of microbiological counts during the 15 days of refrigeration storage.

BIBLIOGRAPHY

1. Periago MJ, Garcia-Alonso J, Jacobs K, Olivares AB, Bernal MJ, Iniesta MD, et al. Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (Lycopersicon esculentum) during wine ripening. *Int J Food Sci Nutr*. 2009;60(6):684-705.
2. Pispser JR, Barnett DM. Effects of organic and conventional production systems on quality and nutritional parameters of processing tomatoes. *J Sci Food Agric*. 2009;89(2):177-84.
3. Sorici AC, Villemet M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends Food Sci Technol*. 2010;21(7):323-31.
4. Anya-Esparza LM, Velazquez-Estrada RM, Rogg AX, Garcia-Galindo HS, Sayago-Ayerdi SG, Montalvo-Gonzalez E. Thermosonication: An alternative processing for fruit and vegetable juices. *Trends Food Sci Technol*. 2017;61:26-37.
5. Chemat F, Zil-E-Huma, Khan MK. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason Sonochem*. 2011;18(4):313-35.
6. Aseel YS, Mohamed HA, Shaltout OE, Askar O, Yousef MM. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Res Int*. 2012;45(2):110-27.
7. Nagata M, Yamashita I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Soc Food Sci Technol (Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi)*. 1992;38(10):923-6.
8. Guerrouj K, Sánchez-Rubio M, Taboada-Rodríguez A, Cava-Roda RM, Marin-Iniesta F. Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food Bioprocess Technol*. 2016;9:30-8.
9. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958;181(4617):1199-200.
10. Martin L, Dewler JT. Bacteriological Analytical Manual Chapter 3 Aerobic Plate Count [Internet]. FDA. 2001. Available from: <https://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm003348.htm>
11. Tourmas V, Shack ME, Mallico PB, Koch HA, Bandler R. Bacteriological Analytical Manual Chapter 18 Yeasts, Molds and Mycotoxins [Internet]. FDA. 2001. Available from: <https://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071432.htm>

RESULTS



Study parameters levels in tomato juice samples (n=3) submitted by thermosonication at 0 and 15 days of storage. Significant differences (p<0.05) of ANOVA-Tukey-HSD represented with letters.

6 CONCLUSIONES

6.1 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1. Se ha diseñado, aplicado y validado un método cronométrico de medida de la actividad enzimática de Lacasa que permite obtener parámetros cinéticos más precisos sobre la catálisis de este enzima, respecto a diferentes métodos descritos en la literatura, sobre diversos sustratos de interés en la industria alimentaria.
2. El análisis de la cinética enzimática de Lacasa de *Trametes versicolor* sobre siringol (2,6-dimetoxifenol), guaiacol (2-metoxifenol) y sus compuestos isómeros, pusieron de manifiesto que siringol presentaba el máximo poder catalítico respecto los demás sustratos, estando esto relacionado con su menor valor de desplazamiento químico (128.5 ppm). De esta forma, tanto los efectos electrónicos como los estéricos fueron relevantes en la afinidad y la catálisis del enzima sobre los sustratos. Así, se obtuvieron distintos valores de los parámetros cinéticos en los diferentes estereoisómeros.
3. El estudio de la catálisis enzimática de Lacasa de *Trametes versicolor* sobre catecolaminas farmacológicas e implicadas sobre el proceso de esclerotización de la cutícula de los insectos reveló que la presencia de un grupo isopropilo unido al nitrógeno (isoprenalina) dificultaba la catálisis, mientras que la adición de un grupo metilo (α -metildopa) provocaba un incremento de la velocidad de catálisis a costa de una reducción de la afinidad enzimática. Por su parte, la formación de un grupo éster (L-dopametilester) en estas moléculas no afectaba a la catálisis.
4. Estudios de acoplamiento molecular o “docking” mostraron que diferentes catecolaminas, con estructuras químicas con ligeras diferencias, presentaron un mecanismo de unión al enzima Lacasa de *Trametes versicolor* idéntico, donde todas ellas establecían enlaces de hidrógeno en el C-4 con los residuos His-458 y Asp-206, permitiendo posiblemente la transferencia del electrón al cobre de tipo 1 del centro activo enzimático.
5. El estudio de la catálisis oxidativa de oleuropeína y 3-hidroxitiroso por las oxidasas Lacasa, Tirosinasa y Peroxidasas, puso de manifiesto la capacidad de Lacasa respecto a estas oxidasas de unirse con mayor afinidad a estos sustratos de interés industrial.
6. Oleuropeína y 3-hidroxitiroso presentaban una capacidad antioxidante similar.
7. Oleuropeína establecía mayor número de enlaces en el centro activo de Lacasa de *Trametes versicolor* respecto a 3-hidroxitiroso, lo cual provoca que oleuropeína presente una menor probabilidad de disociarse del enzima.

6.2 CONCLUSIONES GENERALES

La presente tesis doctoral presenta conocimiento de carácter básico sobre Lacasa, con relación al desarrollo de un método de medida de su actividad, y el estudio de su proceso catalítico sobre compuestos químicos de interés en la industria agroalimentaria:

1. Monometoxifenoles y dimetoxifenoles, utilizados como aditivos en diferentes productos alimenticios.
2. Catecolaminas, compuestos con un posible rol en la esclerotización del exoesqueleto de insectos y que podrían influir en el procesado de ciertas especies de insectos como ingrediente de productos alimenticios.
3. Catecolaminas de uso farmacológico, compuestos tóxicos que pueden actuar como contaminantes de materias primas alimentarias.
4. Oleuropeína, compuesto con impacto sensorial desagradable en las olivas.

De esta forma, este conocimiento presentado puede sentar las bases para el desarrollo o mejora de distintos procesos industriales a través del uso del enzima Lacasa.

7 RESUMEN

Lacasa es un enzima oxidasa presente en una gran diversidad de organismos, donde cumple una gran variedad de funciones biológicas, de las cuales pueden ser destacado su rol en el proceso de esclerotización de la cutícula de insectos. Este enzima interviene en una gran cantidad de procesos en la industria alimentaria, como biorremediación, desarrollo de métodos de medida o estabilización de bebidas.

Esta tesis ha tenido como objetivo el desarrollo de un método analítico de la actividad de Lacasa sobre diferentes sustratos y el análisis de la cinética enzimática de Lacasa sobre los distintos estereoisómeros de 2-metoxifenol (guaiacol) y 2,6-dimetoxifenol (siringol), sobre catecolaminas de carácter farmacológico o relacionadas a las involucradas en el proceso de esclerotización de la cutícula de insectos, y sobre oleuropeína e hidroxitirosol implicados en procesos industriales de la oliva. Todos los estudios de Lacasa fueron realizados usando la especie modelo *Trametes versicolor*.

En este sentido, un método cronométrico fue diseñado, desarrollado y validado para la medida de la actividad enzimática de Lacasa, que permitió determinar los parámetros de la cinética enzimática sobre los estereoisómeros de siringol y guaiacol, las catecolaminas L-dopa, L-epinefrina, L-norepinefrina, DL-isoprenalina, L-isoprenalina, DL- α -metildopa, L- α -metildopa y L-dopametilester, además de los compuestos oleuropeína e hidroxitirosol.

Además de los parámetros cinéticos descritos, estudios de “docking” molecular realizados sobre las catecolaminas mencionadas, oleuropeína e hidroxitirosol, pusieron de manifiesto que Lacasa de *Trametes versicolor* establecía enlaces de hidrógeno en el C-4 con los residuos His-458 y Asp-206, e interacciones π - π con el residuo Phe-265 que facilitaban la unión de los sustratos en el bolsillo enzimático.

Por último, se ha descrito como Lacasa de *Trametes versicolor* presentaba una afinidad de unión superior sobre oleuropeína e hidroxitirosol respecto otras enzimas oxidadas como tirosina y Peroxidasa.

Esta tesis presenta un estudio básico de la cinética enzimática de Lacasa sobre diferentes sustratos de interés en la industria alimentaria, que permita avanzar en el estudio de futuras aplicaciones industriales de Lacasa como procesos de biorremediación para evitar la contaminación de materias primas de la industria alimentaria, la producción de insectos comestibles o el desamargado de las olivas.

8 SUMMARY

Laccase is an oxidase enzyme presented in a great diversity of organisms, where it fulfills a great variety of biological functions, of which its role in the process of sclerotization of the cuticle of insects can be highlighted. This enzyme is involved in a large number of processes in the food industry, such as bioremediation, development of measurement methods or stabilization of beverages.

The aim of this thesis was the development of an analytical method for laccase activity on different substrates and the analysis of the enzymatic kinetics of laccase on the different stereoisomers of 2-methoxyphenol (guaiacol) and 2,6-dimethoxyphenol (syringol), on catecholamines of pharmacological character or related to those involved in the sclerotization process of insect cuticle, and on oleuropein and hydroxytyrosol involved in olive industrial processes. All laccase studies were performed using the model species *Trametes versicolor*.

In this sense, a chromometric method was designed, developed and validated for the measurement of laccase enzymatic activity, which allowed determining the parameters of the enzymatic kinetics on the stereoisomers of syringol and guaiacol, the catecholamines L-dopa, L-epinephrine, L-norepinephrine, DL-isoprenaline, L-isoprenaline, DL- α -methyldopa, L- α -methyldopa and L-dopamethylester, as well as the compounds oleuropein and hydroxytyrosol.

In addition to the kinetic parameters described above, molecular docking studies performed on the aforementioned catecholamines, oleuropein and hydroxytyrosol, revealed that *Trametes versicolor* laccase established hydrogen bonds at C-4 with residues His-458 and Asp-206, and π - π interactions with residue Phe-265 that facilitated the binding of the substrates in the enzyme pocket.

Finally, it has been described how *Trametes versicolor* laccase had a higher binding affinity for oleuropein and hydroxytyrosol than other oxidase enzymes such as tyrosine and peroxidase.

This thesis presents a basic study of the enzymatic kinetics of laccase on different substrates of interest in the food industry, which allows to advance in the study of future industrial applications of laccase such as bioremediation processes to avoid contamination of raw materials from the food industry, production of edible insects or olive debittering.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Ademakinwa, A. N., & Agboola, F. K. (2016). Biochemical characterization and kinetic studies on a purified yellow laccase from newly isolated *Aureobasidium pullulans* NAC8 obtained from soil containing decayed plant matter. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 143–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.05.004>
- Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2018). Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0190-z>
- Andberg, M., Hakulinen, N., Auer, S., Saloheimo, M., Koivula, A., Rouvinen, J., & Kruus, K. (2009). Essential role of the C-terminus in *Melanocarpus albomyces* laccase for enzyme production, catalytic properties and structure. *The FEBS Journal*, 276(21), 6285–6300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07336.x>
- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Beeman, R. W., Kanost, M. R., & Kramer, K. J. (2005). Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32), 11337–11342. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504982102>
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera de los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
- Asano, T., Seto, Y., Hashimoto, K., & Kurushima, H. (2019). Mini-review an insect-specific system for terrestrialization: Laccase-mediated cuticle formation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 108(March), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.03.007>
- Assadi, G., Vesterlund, L., Bonfiglio, F., Mazzurana, L., Cordeddu, L., Schepis, D., Mjösberg, J., Ruhmann, S., Fabbri, A., Vukojevic, V., Percipalle, P., Salomons, F. A., Laurencikiene, J., Törkvist, L., Halfvarson, J., & D'Amato, M. (2016). Functional Analyses of the Crohn's Disease Risk Gene LACC1. *PLOS ONE*, 11(12), e0168276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168276>
- Atilano-Camino, M. M., Álvarez-Valencia, L. H., García-González, A., & García-Reyes, R. B. (2020). Improving laccase production from *Trametes versicolor* using lignocellulosic residues as cosubstrates and evaluation of enzymes for blue

- wastewater biodegradation. *Journal of Environmental Management*, 275, 111231.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111231>
- Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., & Ninnekar, H. Z. (2017). Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 139–150.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.007>
- Becker, J., & Wittmann, C. (2019). A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107360.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.016>
- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G., & Ricci, A. (2013). Edible Insects in a Food Safety and Nutritional Perspective: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 296–313.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12014>
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Rojas, S., Acosta-Urdapilleta, L., & Trejo-Hernández, M. R. (2015). Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 339–347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.10.009>
- Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., Zhao, Y., & Iqbal, H. M. N. (2019). Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. *Environment International*, 124, 336–353.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.011>
- Blanchette, R. A. (1991). Delignification by Wood-Decay Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 29(1), 381–403.
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.002121>
- Boskou, D., Camposeo, S., & Clodoveo, M. L. (2015). 8 - Table Olives as Sources of Bioactive Compounds. In D. B. T.-O. and O. O. B. C. Boskou (Ed.), *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents* (pp. 217–259). AOCS Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-041-2.50014-8>
- Božič, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012a). Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. *Carbohydrate Polymers*, 89(3), 854–864.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.021>

- Božič, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012b). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, *87*(4), 2388–2398. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.006>
- Buchert, J., Ercili Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., Mattinen, M., Boer, H., Partanen, R., Selinheimo, E., Lantto, R., & Kruus, K. (2010). Crosslinking Food Proteins for Improved Functionality. *Annual Review of Food Science and Technology*, *1*(1), 113–138. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100841>
- Bucur, B., Munteanu, F.-D., Marty, J.-L., & Vasilescu, A. (2018). Advances in Enzyme-Based Biosensors for Pesticide Detection. *Biosensors*, *8*(2), 27. <https://doi.org/10.3390/bios8020027>
- Camarero, S., Pardo, I., Cañas, A. I. ., Molina, P., Record, E., Martínez, A. T., Martínez, M. J., & Alcalde, M. (2012). Engineering Platforms for Directed Evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(5), 1370–1384. <https://doi.org/10.1128/AEM.07530-11>
- Chairin, T., Nitheranont, T., Watanabe, A., Asada, Y., Khanongnuch, C., & Lumyong, S. (2014). Purification and characterization of the extracellular laccase produced by *Trametes polyzona* WR710–1 under solid-state fermentation. *Journal of Basic Microbiology*, *54*(1), 35–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.201200456>
- Chakraborty, T., Tóth, R., Nosanchuk, J. D., & Gácsér, A. (2020). Multicopper Oxidases in *Saccharomyces cerevisiae* and Human Pathogenic Fungi. *Journal of Fungi*, *6*(2), 56. <https://doi.org/10.3390/jof6020056>
- Chefetz, B., Chen, Y., & Hadar, Y. (1998). Purification and Characterization of Laccase from *Chaetomium thermophilum* and Its Role in Humification. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(9), 3175–3179. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3175-3179.1998>
- Chiaiese, P., Palomba, F., Tatino, F., Lanzillo, C., Pinto, G., Pollio, A., & Filippone, E. (2011). Engineered tobacco and microalgae secreting the fungal laccase POXA1b reduce phenol content in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, *49*(6), 540–546. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.002>
- Chowdhary, P., Raj, A., & Bharagava, R. N. (2018). Environmental pollution and health

- hazards from distillery wastewater and treatment approaches to combat the environmental threats: A review. *Chemosphere*, *194*, 229–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.163>
- Conrad, L. S., Sponholz, W. R., & Berker, O. (2000). *Treatment of cork with a phenol oxidizing enzyme* (Patent No. US6152966A).
- D'Annibale, A., Celletti, D., Felici, M., Di Mattia, E., & Giovannozzi-Sermanni, G. (1996). Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes*. *Acta Biotechnologica*, *16*(4), 257–270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/abio.370160408>
- De Leonardis, A., Angelico, R., Macciola, V., & Ceglie, A. (2013). Effects of polyphenol enzymatic-oxidation on the oxidative stability of virgin olive oil. *Food Research International*, *54*(2), 2001–2007. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.034>
- De Leonardis, A., Macciola, V., Cuomo, F., & Lopez, F. (2015). Evidence of oleuropein degradation by olive leaf protein extract. *Food Chemistry*, *175*, 568–574. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.016>
- Di Fusco, M., Tortolini, C., Deriu, D., & Mazzei, F. (2010). Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta*, *81*(1), 235–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.063>
- Dittmer, N. T., Gorman, M. J., & Kanost, M. R. (2009). Characterization of endogenous and recombinant forms of laccase-2, a multicopper oxidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *39*(9), 596–606. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.06.006>
- Đurđić, S., Stanković, V., Vlahović, F., Ognjanović, M., Kalcher, K., Veličković, T. Ć., Mutić, J., & Stanković, D. M. (2021). Laccase Polyphenolic Biosensor Supported on MnO₂@GNP Decorated SPCE: Preparation, Characterization, and Analytical Application. *Journal of The Electrochemical Society*, *168*(3), 37510. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/abeaf2>
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P., & Kumar, A. (2011). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *68*(2), 117–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
- Eisenman, H. C., Mues, M., Weber, S. E., Frases, S., Chaskes, S., Gerfen, G., & Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin

- synthesis from both d- and l-DOPA. *Microbiology*, 153(12), 3954–3962. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011049-0>
- Ergül, F. E., Sargin, S., Öngen, G., & Sukan, F. V. (2009). Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(1), 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.018>
- Frasconi, M., Favero, G., Boer, H., Koivula, A., & Mazzei, F. (2010). Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(4), 899–908. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.018>
- Garcia, T. A., Santiago, M. F., & Ulhoa, C. J. (2007). Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(2), 311–318. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0817-4>
- Geng, A., Wu, J., Xie, R.-R., Li, X., Chang, F.-X., & Sun, J.-Z. (2018). Characterization of a laccase from a wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus*. *Insect Science*, 25(2), 251–258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1744-7917.12415>
- Giacobbe, S., Pezzella, C., Lettera, V., Sannia, G., & Piscitelli, A. (2018). Laccase pretreatment for agrofood wastes valorization. *Bioresource Technology*, 265, 59–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.108>
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J.-M. (1999). Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*, 3(1), 1–26. <https://doi.org/10.1080/10889869991219163>
- Guan, Z.-B., Luo, Q., Wang, H.-R., Chen, Y., & Liao, X.-R. (2018). Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(19), 3569–3592. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2883-z>
- Guggenheim, K. G., Crawford, L. M., Paradisi, F., Wang, S. C., & Siegel, J. B. (2018). β -Glucosidase Discovery and Design for the Degradation of Oleuropein. *ACS Omega*, 3(11), 15754–15762. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02169>
- Hakulinen, N., & Rouvinen, J. (2015). Three-dimensional structures of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 857–868. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1827-5>
- Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., & Lomascolo, A. (2006). Fungal

- tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 219–232. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02866.x>
- Hattori, M., Konishi, H., Tamura, Y., Konno, K., & Sogawa, K. (2005). Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Journal of Insect Physiology*, 51(12), 1359–1365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.08.010>
- Hiner, A. N. P., Raven, E. L., Thomeley, R. N. F., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2002). Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(1), 27–34. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00390-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00390-2)
- Jafari, M., Mojtavavi, S., Faramarzi, M. A., Mehrnejad, F., Soleimani, M., & Mirjani, R. (2020). Molecular level insight into stability, activity, and structure of Laccase in aqueous ionic liquid and organic solvents: An experimental and computational research. *Journal of Molecular Liquids*, 317, 113925. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113925>
- Jaiswal, N., Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. (2014). Purification of a thermostable laccase from *Leucaena leucocephala* using a copper alginate entrapment approach and the application of the laccase in dye decolorization. *Process Biochemistry*, 49(7), 1196–1204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.002>
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdorska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 966. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
- Javaid, R., Sabir, A., Sheikh, N., & Ferhan, M. (2019). Recent Advances in Applications of Acidophilic Fungi to Produce Chemicals. *Molecules*, 24(4), 786. <https://doi.org/10.3390/molecules24040786>
- Johnson, R. L., & Mitchell, A. E. (2018). Reducing Phenolics Related to Bitterness in Table Olives. *Journal of Food Quality*, 2018, 3193185. <https://doi.org/10.1155/2018/3193185>
- Jordaan, J., Pletschke, B. I., & Leukes, W. D. (2004). Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(7), 635–641.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.02.003>
- Junghanns, C., Pecyna, M. J., Böhm, D., Jehmlich, N., Martin, C., von Bergen, M., Schauer, F., Hofrichter, M., & Schlosser, D. (2009). Biochemical and molecular genetic characterisation of a novel laccase produced by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*(6), 1095–1105. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2028-2>
- Kaneko, S., Cheng, M., Murai, H., Takenaka, S., Murakami, S., & Aoki, K. (2009). Purification and Characterization of an Extracellular Laccase from *Phlebia radiata* Strain BP-11-2 That Decolorizes Fungal Melanin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*(4), 939. <https://doi.org/10.1271/bbb.80740>
- Kostyra, E., & Barylko-Pikielna, N. (2006). Volatiles composition and flavour profile identity of smoke flavourings. *Food Quality and Preference*, *17*(1), 85–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2005.06.008>
- Koyappayil, A., Kim, H. T., & Lee, M.-H. (2021). ‘Laccase-like’ properties of coral-like silver citrate micro-structures for the degradation and determination of phenolic pollutants and adrenaline. *Journal of Hazardous Materials*, *412*, 125211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125211>
- Kumar, A., Sharma, K. K., Kumar, P., & Ramchiary, N. (2015). Laccase isozymes from *Ganoderma lucidum* MDU-7: Isolation, characterization, catalytic properties and differential role during oxidative stress. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *113*, 68–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.01.010>
- Kumari, H. L., & Sirsi, M. (1972). Purification and properties of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Archiv Für Mikrobiologie*, *84*(4), 350–357. <https://doi.org/10.1007/BF00409083>
- Li, Q., Wang, X., Korzhev, M., Schröder, H. C., Link, T., Tahir, M. N., Diehl-Seifert, B., & Müller, W. E. G. (2015). Potential biological role of laccase from the sponge *Suberites domuncula* as an antibacterial defense component. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1850*(1), 118–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.007>
- Li, X., Li, S., Liang, X., McClements, D. J., Liu, X., & Liu, F. (2020). Applications of oxidases in modification of food molecules and colloidal systems: Laccase, peroxidase and tyrosinase. *Trends in Food Science & Technology*, *103*, 78–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.014>

- Liang, M., Davis, E., Gardner, D., Cai, X., & Wu, Y. (2006). Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*. *Planta*, 224(5), 1185. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0300-6>
- Liu, L., Lin, Z., Zheng, T., Lin, L., Zheng, C., Lin, Z., Wang, S., & Wang, Z. (2009). Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6), 426–433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.02.008>
- Lonappan, L., Rouissi, T., Laadila, M. A., Brar, S. K., Hernandez Galan, L., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2017). Agro-industrial-Produced Laccase for Degradation of Diclofenac and Identification of Transformation Products. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(7), 5772–5781. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00390>
- Lorenzo, M., Moldes, D., Rodríguez Couto, S., & Sanromán, M. A. (2005). Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere*, 60(8), 1124–1128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.051>
- Lyashenko, A. V., Zhukhlistova, N. E., Gabdoukhakov, A. G., Zhukova, Y. N., Voelter, W., Zaitsev, V. N., Bento, I., Stepanova, E. V., Kachalova, G. S., Koroleva, O. V., Cherkashyn, E. A., Tishkov, V. I., Lamzin, V. S., Schirwitz, K., Morgunova, E. Y., Betzel, C., Lindley, P. F., & Mikhailov, A. M. (2006). Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. *Acta Crystallographica Section F*, 62(10), 954–957. <https://doi.org/10.1107/S1744309106036578>
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. C. (2005). Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 1(2), 1–9.
- Manzano-Nicolas, J., Marin-Iniesta, F., Taboada-Rodriguez, A., Garcia-Canovas, F., Tudela-Serrano, J., & Muñoz-Muñoz, J. L. (2020). Development of a method to measure laccase activity on methoxyphenolic food ingredients and isomers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 1099–1107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.152>
- Marín-Zamora, M. E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., & García-Ruiz, P. A. (2007). Stereospecificity of Mushroom Tyrosinase Immobilized on a Chiral and a Nonchiral Support. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4569–4575.

<https://doi.org/10.1021/jf0701178>

- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, *60*, 551–565. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00171-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00171-1)
- Mayolo-Deloisa, K., González-González, M., & Rito-Palomares, M. (2020). Laccases in Food Industry: Bioprocessing, Potential Industrial and Biotechnological Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 222. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00222>
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., & Durán, N. (2007). Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *45*(3), 102–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.12.004>
- Mishra, A., & Kumar, S. (2009). Kinetic studies of laccase enzyme of *Coriolus versicolor* MTCC 138 in an inexpensive culture medium. *Biochemical Engineering Journal*, *46*(3), 252–256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.02.016>
- Mohit, E., Tabarзад, M., & Faramarzi, M. A. (2020). Biomedical and Pharmaceutical-Related Applications of Laccases. *Current Protein & Peptide Science*, *21*(1), 78–98. <https://doi.org/10.2174/1389203720666191011105624>
- Molitoris, H. P., & Esser, K. (1970). The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. V. Properties of laccase I after further purification. *Archiv Für Mikrobiologie*, *72*(3), 267–296.
- Monteiro, M., Silva, A. F. R., Resende, D., Braga, S. S., Coimbra, M. A., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2021). Strategies to Broaden the Applications of Olive Biophenols Oleuropein and Hydroxytyrosol in Food Products. *Antioxidants*, *10*(3), 444. <https://doi.org/10.3390/antiox10030444>
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., & Yaropolov, A. I. (2007). “Blue” laccases. *Biochemistry (Moscow)*, *72*(10), 1136–1150. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100112>
- Moshtaghioun, S. M., Haghbeen, K., Lotfi Sahebghadam, A., Legge, R. L., Khoshneviszadeh, R., & Farhadi, S. (2011). Direct Spectrophotometric Assay of Laccase Using Diazo Derivatives of Guaiacol. *Analytical Chemistry*, *83*(11), 4200–4205. <https://doi.org/10.1021/ac200501w>
- Mot, A. C., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2012). Laccases: Complex architectures for one-electron oxidations. *Biochemistry (Moscow)*, *77*(12), 1395–1407.

<https://doi.org/10.1134/S0006297912120085>

- Muñoz-Muñoz, J. L., Acosta-Motos, J. R., Garcia-Molina, F., Varon, R., Garcia-Ruiz, P. A., Tudela, J., Garcia-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2010). Tyrosinase inactivation in its action on dopa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1804*(7), 1467–1475. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.02.015>
- Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., Kanda, K., & Sato, T. (2003). Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology*, *149*(9), 2455–2462. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26414-0>
- Nakade, K., Nakagawa, Y., Yano, A., Sato, T., & Sakamoto, Y. (2010). Characterization of an extracellular laccase, PbLac1, purified from *Polyporus brumalis*. *Fungal Biology*, *114*(8), 609–618. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.05.002>
- Neifar, M., Ellouze-Ghorbel, R., Kamoun, A., Baklouti, S., Mokni, A., Jaouani, A., & Ellouze-Chaabouni, S. (2011). Effective clarification of pomegranate juice using laccase treatment optimized by response surface methodology followed by ultrafiltration. *Journal of Food Process Engineering*, *34*(4), 1199–1219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00523.x>
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2010). Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Research*, *2010*, 918761. <https://doi.org/10.4061/2010/918761>
- Pakhadnia, Y. G., Malinouski, N. I., & Lapko, A. G. (2009). Purification and characteristics of an enzyme with both bilirubin oxidase and laccase activities from mycelium of the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochemistry (Moscow)*, *74*(9), 1027–1034. <https://doi.org/10.1134/S0006297909090119>
- Patel, N., Shahane, S., Soni, S., Majumdar, R., & Mishra, U. (2019). Mode of Action, Properties, Production, and Application of Laccase: A Review. *Recent Patents on Biotechnology*, *13*(1), 19–32. <https://doi.org/10.2174/1872208312666180821161015>
- Pinheiro, V. E., Michelin, M., Vici, A. C., de Almeida, P. Z., & Teixeira de Moraes Polizeli, M. de L. (2020). *Trametes versicolor* laccase production using agricultural wastes:

- a comparative study in Erlenmeyer flasks, bioreactor and tray. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(3), 507–514. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02245-z>
- Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37663–37669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204571200>
- Polak, J., Wlizło, K., Pogni, R., Petricci, E., Graż, M., Szałapata, K., Osińska-Jaroszuk, M., Kapral-Piotrowska, J., Pawlikowska-Pawłęga, B., & Jarosz-Wilkołazka, A. (2020). Structure and Bioactive Properties of Novel Textile Dyes Synthesised by Fungal Laccase. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2052. <https://doi.org/10.3390/ijms21062052>
- Ramírez, E., Brenes, M., García, P., Medina, E., & Romero, C. (2016). Oleuropein hydrolysis in natural green olives: Importance of the endogenous enzymes. *Food Chemistry*, 206(1), 204–209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.061>
- Ramírez, E., Medina, E., Brenes, M., & Romero, C. (2014). Endogenous Enzymes Involved in the Transformation of Oleuropein in Spanish Table Olive Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(39), 9569–9575. <https://doi.org/10.1021/jf5027982>
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A.-M., & Goffner, D. (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases – a divergent gene family – in poplar. *European Journal of Biochemistry*, 259(1–2), 485–495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00061.x>
- Reda, F. M., El-Mekkawy, R. M., & Hassan, N. S. (2019). Detoxification and Bioremediation of Sulfa Drugs and Synthetic Dyes by *Streptomyces mutabilis* A17 Laccase Produced in Solid State Fermentation. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(1), 85–96. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.22207/JPAM.13.1.09>
- Rencoret, J., Pereira, A., del Río, J. C., Martínez, Á. T., & Gutiérrez, A. (2017). Delignification and Saccharification Enhancement of Sugarcane Byproducts by a Laccase-Based Pretreatment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(8), 7145–7154. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01332>

- Renzetti, S., Courtin, C. M., Delcour, J. A., & Arendt, E. K. (2010). Oxidative and proteolytic enzyme preparations as promising improvers for oat bread formulations: Rheological, biochemical and microstructural background. *Food Chemistry*, *119*(4), 1465–1473. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.028>
- Rezaei, S., Shahverdi, A. R., & Faramarzi, M. A. (2017). Isolation, one-step affinity purification, and characterization of a polyextremotolerant laccase from the halophilic bacterium *Aquisalibacillus elongatus* and its application in the delignification of sugar beet pulp. *Bioresource Technology*, *230*, 67–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.036>
- Rogalski, J., Wojtas-Wasilewska, M., Apalovič, R., & Leonowicz, A. (1991). Affinity chromatography as a rapid and convenient method for purification of fungal laccases. *Biotechnology and Bioengineering*, *37*(8), 770–777. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260370812>
- Sammartino, M., Piacquadio, P., Stefano, G. de, & Sciancalepore, V. (1998). Apple juice stabilization by conventional and innovative methods. *Industria Delle Bevande*, *27*(156), 367–369.
- Sánchez-Ferrer, Á., Neptuno Rodríguez-López, J., García-Cánovas, F., & García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1247*(1), 1–11. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)00204-T](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00204-T)
- Sánchez-Gutiérrez, M., Bascón-Villegas, I., Rodríguez, A., Pérez-Rodríguez, F., Fernández-Prior, Á., Rosal, A., & Carrasco, E. (2021). Valorisation of *Olea europaea* L. Olive Leaves through the Evaluation of Their Extracts: Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Foods*, *10*(5), 966. <https://doi.org/10.3390/foods10050966>
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A., & Autio, K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, *43*(2), 152–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.08.007>
- Sharma, A., Jain, K. K., Jain, A., Kidwai, M., & Kuhad, R. C. (2018). Bifunctional in vivo role of laccase exploited in multiple biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(24), 10327–10343. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9404-8>

- Sharma, K. K., Singh, D., & Rawat, S. (2018). Molecular dynamics simulation studies suggests unconventional roles of non-secretary laccases from enteropathogenic gut bacteria and *Cryptococcus neoformans* serotype D. *Computational Biology and Chemistry*, 73, 41–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.01.010>
- Shin, S. K., Ko, Y. J., Hyeon, J. E., & Han, S. O. (2019). Studies of advanced lignin valorization based on various types of lignolytic enzymes and microbes. *Bioresource Technology*, 289, 121728. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121728>
- Silvério, S. C., Moreira, S., Milagres, A. M. F., Macedo, E. A., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinerea* and *Trametes versicolor*: a comparative study. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(3), 365–373. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0793-2>
- Singh, D., & Gupta, N. (2020). Microbial Laccase: a robust enzyme and its industrial applications. *Biologia*, 75(8), 1183–1193. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00414-9>
- Singh, D., Rawat, S., Waseem, M., Gupta, S., Lynn, A., Nitin, M., Ramchiary, N., & Sharma, K. K. (2016). Molecular modeling and simulation studies of recombinant laccase from *Yersinia enterocolitica* suggests significant role in the biotransformation of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(2), 306–312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.096>
- Singh, G., & Arya, S. K. (2019). Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 1070–1084. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.168>
- Singh, N., Basu, S., Vankelecom, I. F. J., & Balakrishnan, M. (2015). Covalently Immobilized Laccase for Decolourization of Glucose-Glycine Maillard Products as Colourant of Distillery Wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(1), 76–89. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1729-5>
- Singhal, A., Choudhary, G., & Thakur, I. S. (2012). Characterization of laccase activity produced by *Cryptococcus albidus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 42(2), 113–124. <https://doi.org/10.1080/10826068.2011.577882>

- Singhvi, M. S., & Gokhale, D. V. (2019). Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(23), 9305–9320. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10212-7>
- Sitarz, A. K., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2016). Structure, functionality and tuning up of laccases for lignocellulose and other industrial applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(1), 70–86. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.949617>
- Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P. W., & Mishra, P. K. (2019). Chapter 23 - Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: An Overview. In V. K. Gupta & A. B. T.-N. and F. D. in M. B. and B. Pandey (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 345–354). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00023-2>
- Suderman, R. J., Dittmer, N. T., Kanost, M. R., & Kramer, K. J. (2006). Model reactions for insect cuticle sclerotization: Cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4), 353–365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.012>
- Tikhonov, B. B., Sulman, E. M., Stadol'nikova, P. Y., Sulman, A. M., Golikova, E. P., Sidorov, A. I., & Matveeva, V. G. (2019). Immobilized Enzymes from the Class of Oxidoreductases in Technological Processes: A Review. *Catalysis in Industry*, 11(3), 251–263. <https://doi.org/10.1134/S2070050419030115>
- Tinoco, R., Pickard, M. A., & Vazquez-Duhalt, R. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 32(5), 331–335. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00913.x>
- Torres-Salas, P., Mate, D. M., Ghazi, I., Plou, F. J., Ballesteros, A. O., & Alcalde, M. (2013). Widening the pH Activity Profile of a Fungal Laccase by Directed Evolution. *ChemBioChem*, 14(8), 934–937. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.201300102>
- Trubitsina, L. I., Tishchenko, S. V, Gabdulkhakov, A. G., Lisov, A. V, Zakharova, M. V, & Leontievsky, A. A. (2015). Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochimie*, 112, 151–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.005>
- Uthandi, S., Saad, B., Humbard, M. A., & Maupin-Furlow, J. A. (2010). LccA, an Archaeal

- Laccase Secreted as a Highly Stable Glycoprotein into the Extracellular Medium by *Haloferax volcanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 733–743. <https://doi.org/10.1128/AEM.01757-09>
- Van den Bosch, S., Koelewijn, S.-F., Renders, T., Van den Bossche, G., Vangeel, T., Schutyser, W., & Sels, B. F. (2018). Catalytic Strategies Towards Lignin-Derived Chemicals. *Topics in Current Chemistry*, 376(5), 36. <https://doi.org/10.1007/s41061-018-0214-3>
- Vasdev, K., Dhawan, S., Kapoor, R. K., & Kuhad, R. C. (2005). Biochemical characterization and molecular evidence of a laccase from the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(8), 684–693. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.03.013>
- Vite-Vallejo, O., Palomares, L. A., Dantán-González, E., Ayala-Castro, H. G., Martínez-Anaya, C., Valderrama, B., & Folch-Mallol, J. (2009). The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(3), 233–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.007>
- Wang, F., Guo, C., & Liu, C.-Z. (2013). Immobilization of *Trametes versicolor* cultures for improving laccase production in bubble column reactor intensified by sonication. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(1), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1214-x>
- Wang, J., Wang, C., Zhu, M., Yu, Y., Zhang, Y., & Wei, Z. (2008). Generation and characterization of transgenic poplar plants overexpressing a cotton laccase gene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(3), 303. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9377-x>
- Weng, C., Peng, X., & Han, Y. (2021). Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01934-w>
- Wong, D. W. S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 174–209. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>
- Wood, D. A. (1980). Production, Purification and Properties of Extracellular Laccase of *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, 117(2), 327–338. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-117-2-327>

- Yang, J., Li, W., Ng, T. B., Deng, X., Lin, J., & Ye, X. (2017). Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 832. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00832>
- Yoshida, H. (1883). LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 43, 472–486. <https://doi.org/10.1039/CT8834300472>
- Zapp, E., Brondani, D., Vieira, I. C., Scheeren, C. W., Dupont, J., Barbosa, A. M. J., & Ferreira, V. S. (2011). Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 155(1), 331–339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.04.015>
- Zerva, A., Simić, S., Topakas, E., & Nikodinovic-Runic, J. (2019). Applications of Microbial Laccases: Patent Review of the Past Decade (2009–2019). *Catalysts*, 9(12), 1023. <https://doi.org/10.3390/catal9121023>
- Zille, A., Munteanu, F.-D., Gübitz, G. M., & Cavaco-Paulo, A. (2005). Laccase kinetics of degradation and coupling reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 33(1), 23–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.01.005>

