



Efecto de la enzima lacasa proveniente de hongos de pudrición blanca de la madera sobre la estabilidad oxidativa de aceites vegetales y el procesado de jugos de fruta

Kay Gisela Guerberoff.

Tesis (Doctora en Ciencias de la Salud)--Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias
Médicas, 2020.

Aprobada: 15 de mayo de 2020

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>



Efecto de la enzima lacasa proveniente de hongos de pudrición blanca de la madera sobre la estabilidad oxidativa de aceites vegetales y el procesado de jugos de fruta por Kay Gisela Guerberoff se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional,



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**EFECTO DE LA ENZIMA LACASA PROVENIENTE DE HONGOS DE PUDRICIÓN
BLANCA DE LA MADERA SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITES
VEGETALES Y EL PROCESADO DE JUGOS DE FRUTA.**

Tesis para optar al título de

Doctora en Ciencias de la Salud

Gisela Kay Guerberoff

Director

Prof. Dr. Celso C. Camusso

Córdoba, Argentina Año 2020

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

Integrantes: Prof. Dra. María Emilia Santillán

Prof. Dr. Edgardo Luis Calandri

Prof. Dr. Celso Clemente Camusso

Art. 43: "LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS" del Reglamento Vigente RHCD 722/10 RHCS.

“Siempre atraemos a nuestras vidas aquello en lo que creemos con más fuerza, lo que ansiamos más profundamente, lo que imaginamos de un modo más real.”

Shakti Gawain

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba y ha sido financiado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECyT) en el marco del proyecto “Aplicación de hongos con actividad ligninolíticas para el mejoramiento de la calidad nutricional de productos alimenticios y para la biorremediación de efluentes y suelos contaminados” y por una beca interna doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

No es fácil llegar al final, se necesita ahínco, lucha y deseo, pero sobre todo, la fuerza que me ha ayudado a conseguirlo ha sido el apoyo recibido de muchas personas. Para ellas van estas palabras de agradecimiento.

En primer lugar, agradezco a mi director de tesis, Prof. Dr. Celso Camusso, por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por sus enseñanzas y conocimientos. Gracias también por la confianza depositada en mí, por su paciencia, respeto y compañerismo. A la comisión de seguimiento, Dra. María Emilia Santillán y Dr. Edgardo Calandri por sus valiosas sugerencias, por su comprensión y apoyo en cada etapa.

Agradezco especialmente al Prof. Dr. Ricardo Madoery, compañero de trabajo y guía en todas las áreas de mi trabajo en estos años.

A la Ing. Agr. Agustina Ruiz Posse, compañera de equipo de investigación, gracias por haber estado conmigo hasta la hora que fuera necesaria y volviendo a empezar tantas veces para obtener resultados.

Al Dr. Emanuel Grassi, micólogo referente y amigo, por ayudarme en mis comienzos con la micología y microbiología y por los buenos momentos pasados.

A la Dra. Gabriela Reartes, quien me introdujo en este mundo de la investigación, gracias por la confianza, el apoyo y la amistad.

A mis padres, Miriam y Eduardo por darme las oportunidades que me han permitido estar donde estoy y ser lo que soy. Por su preocupación y cariño constante y por enseñarme que todo esfuerzo tiene al final su recompensa.

A mis hermanos, Sofía y Pepe, y sus bellas hijas, que me han dado las mayores alegrías de mi vida y han sido mi norte en los momentos difíciles. A todos muchas Gracias!!

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
ÍNDICE.....	II
RESUMEN	V
SUMMARY	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XV
INTRODUCCION GENERAL.....	1
HIPOTESIS GENERALES	18
OBJETIVOS GENERALES.....	19
CAPITULO 1.....	20
“Producción de lacasa por especies del genero <i>Trametes</i> y <i>Coriolus ver. antarticus</i> y análisis del efecto de la enzima sobre la degradación de colorantes de diferente naturaleza química”	
INTRODUCCION	21
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
MATERIALES Y METODOS.....	25
1.1 Organismos seleccionados.....	25
1.2 Cultivos de mantenimientos	25
1.3 Medios de cultivos líquidos para la expresión de lacasa	27
1.4 Obtención de los extractos enzimáticos	28
1.5 Determinación de la actividad lacasa	28
1.6 Concentración de los extractos enzimáticos.....	28
1.7 Colorantes seleccionados	29
1.8 Ensayo de decoloración	33
1.9 Velocidad de decoloración	33
RESULTADO Y DISCUSION.....	34
1.1 Efecto de los diferentes medios y condiciones de cultivo en la producción de lacasa por las cepas seleccionadas.....	34

1.2 Efecto de los extractos enzimáticos en la decoloración de los colorantes seleccionados	35
CONCLUSIONES PARCIALES	43
CAPITULO 2.....	44
“Evaluación de la estabilidad oxidativa de aceites vegetales tratados con lacasa de <i>Trametes versicolor</i> ”	
INTRODUCCION	45
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	47
MATERIALES Y METODOS.....	48
2.1 Aceites vegetales seleccionados.....	48
2.2 Extracto enzimático seleccionado.....	48
2.3 Extracto con lacasa inhibida.....	48
2.4 Estabilidad oxidativa de los aceites.....	48
2.4.1. Valor de peróxidos	48
2.4.2 Dienos y trienos conjugados.....	49
2.5 Diseño experimental	50
2.6 Análisis estadístico	50
RESULTADOS Y DISCUSION.....	51
2.1 Valor de peróxido	51
2.1.1 Tratamiento 1.....	51
2.1.2 Tratamiento 2.....	53
2.2 Dienos y trienos conjugados	55
2.2.1 Tratamiento 1.....	55
2.2.2 Tratamiento 2.....	57
CONCLUSIONES PARCIALES	60
CAPITULO 3.....	61
“Efecto de lacasa de <i>T. villosa</i> en el procesado de jugos de fruta”	
INTRODUCCION	62
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	65
MATERIALES Y METODOS.....	67
3.1 Extractos enzimáticos seleccionados	67

3.2 Jugos de frutas seleccionados	67
3.3 Diseño experimental	67
3.4 Análisis fisicoquímicos de los jugos	67
3.4.1 Fenoles totales	68
3.4.2 Turbidez en jugos de fruta	68
3.4.3 Determinación de color	69
3.5 Análisis estadístico de resultados.....	69
RESULTADOS Y DISCUSION.....	70
3.1 Efecto de la lacasa en el jugo de manzana	70
3.2 Efecto de la lacasa en el jugo de pera.....	74
3.3 Efecto de la lacasa en el jugo de naranja	77
CONCLUSIONES PARCIALES	81
CONCLUSION GENERAL.....	82
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	85
ANEXO (PUBLICACIÓN CIENTÍFICA)	109

RESUMEN

Efecto de la enzima lacasa proveniente de hongos de pudrición blanca de la madera sobre la estabilidad oxidativa de aceites vegetales y el procesado de jugos de fruta.

Los hongos causantes de pudrición blanca son capaces de degradar hasta su completa mineralización la lignina de la madera, un polímero altamente recalcitrante. Esto ocurre gracias a las enzimas ligninolíticas presentes en estos organismos, entre ellas la lacasa. La lacasa oxida la lignina que contiene grupos fenólicos libres, con la consecuente reducción de oxígeno molecular a agua. Muchas revisiones discuten las aplicaciones potenciales de la lacasa en la industria alimentaria. En aceites vegetales, la lacasa despeja el O₂ que, de lo contrario, reaccionaría con los ácidos grasos, proteínas y alcoholes para formar precursores de mal sabor. En los jugos de fruta, la lacasa reduce el contenido de polifenoles, responsables de la turbidez, intensificación del color y aroma en estos alimentos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de lascasas fúngicas en la oxidación de aceites vegetales y en la clarificación de jugos de frutas. Para la obtención de los extractos enzimáticos se seleccionaron tres cepas del género *Trametes* (*T. trogii*, *T. villosa* y *T. versicolor*) y una cepa de *Coriolus versicolor f. antárticus*. Se determinó la concentración de lacasa en todos los extractos, usando un reactivo indicador de actividad de la enzima (Dimetoxifeno), y se midió la capacidad de estos extractos para degradar colorantes de estructura química similar a la lignina. Para el análisis de la oxidación de aceites vegetales, se seleccionó el extracto con mayor concentración de lacasa (*T. versicolor*). Los aceites analizados fueron obtenidos por prensado en frío de semillas de girasol, maní, sésamo y chía. Se midió el valor de peróxidos, dienos y trienos conjugados. Para el estudio de los jugos de frutas, se utilizó el segundo extracto con mayor unidades de lacasa (*T. villosa*). Los jugos fueron de manzana, naranja y pera y se analizó la variación en el contenido de polifenoles totales, color y turbidez. Los resultados relacionados con la degradación de colorantes, mostraron que las cepas seleccionadas tienen gran capacidad para degradar colorantes con diversas estructuras aromáticas con porcentajes de

decoloración entre 50 y 99%, sin diferencia entre las cepas. En cuanto al efecto de la lacasa sobre la oxidación de aceites vegetales, los resultados fueron contrarios a lo esperado. Los aceites tratados con la enzima mostraron mayor contenido de productos primarios de oxidación (peróxidos, dienos y trienos). Estos hallazgos pueden deberse a la generación de radicales fenoxilo provenientes de la oxidación de los fenoles del aceite mediante la lacasa. En relación al procesado de jugos de frutas (manzana, pera y naranja) con lacasa, la enzima logró reducir el contenido de fenoles totales, en un 50% promedio de los tres jugos. El color y la turbidez aumentaron en el jugo de manzana y naranja y disminuyeron levemente en el jugo de pera. Los resultados son positivos para el caso del jugo de naranja, ya que el consumidor busca el efecto contrario a la clarificación (jugo con pulpa estable). En el caso del jugo de manzana, el aumento del color y turbidez puede deberse a la formación de quinonas insolubles, producto de la polimerización de los fenoles oxidados (quinonas), lo cual podría solucionarse mediante ultrafiltración con presión hidráulica, según la bibliografía. Se concluye que la enzima lacasa fúngica, no es apta para prevenir la oxidación de aceites vegetales ya que aumenta los indicadores de oxidación. Por otro lado, se concluye que la enzima lacasa es capaz de interrumpir uno de los procesos reconocidos como responsables de la turbidez y oscureciendo de jugos de fruta, gracias a la disminución del contenido fenólico.

Palabras claves: lacasa fúngica, aceites vegetales, rancidez, jugos de fruta, turbidez.

SUMMARY

Effect of the enzyme laccase from fungi of white wood rot on the oxidative stability of vegetable oils and the processing of fruit juices.

White rot fungi are capable of degrading wood lignin, a highly recalcitrant polymer, to its complete mineralization. This occurs thanks to the ligninolytic enzymes present in these organisms, including laccase. Laccase oxidizes lignin that contains free phenolic groups, with the consequent reduction of molecular oxygen to water. Many reviews discuss the potential applications of laccase in the food industry. In vegetable oils, laccase clears O₂, which would otherwise react with fatty acids, proteins, and alcohols to form bad-tasting precursors. In fruit juices, laccase reduces the content of polyphenols, responsible for the turbidity, intensification of color and aroma in these foods. The objective of this work was to evaluate the effect of fungal laccases on the oxidation of vegetable oils and on the clarification of fruit juices. To obtain the enzymatic extracts, three strains of the genus *Trametes* (*T. trogii*, *T. villosa* and *T. versicolor*) and a strain of *Coriolus versicolor f. antarcticus*. The concentration of laccase in all the extracts was determined, using a reagent indicating the activity of the enzyme (Dimethoxyphenol) and the ability of these to measure dyes with a chemical structure similar to lignin was measured. For the analysis of the oxidation of vegetable oils, the extract with the highest concentration of laccase (*T. versicolor*) was selected. The analyzed oils were obtained by cold pressing sunflower, peanut, sesame and chia seeds. The value of peroxides, dienes and conjugated trienes was measured. For the study of fruit juices, the second extract with the highest laccase units (*T. villosa*) was used. The juices were apple, orange and pear, and the variation in total polyphenol content, color and turbidity was analyzed. The results related to the degradation of dyes, showed that the selected strains have great capacity to degrade dyes with various aromatic structures with percentages of discoloration between 50 and 99%, no difference between the strains. Regarding the effect of laccase on the oxidation of vegetable oils, the results were contrary to expectations. The oils treated with the enzyme showed a higher content of primary oxidation products (peroxides, dienes and triene). These findings may be due to the generation of phenoxy radicals from the

oxidation of oil phenols by laccase. In relation to the processing of fruit juices (apple, pear and orange) with laccase, the enzyme managed to reduce the content of total phenols, by an average 50% of the three juices. Color and turbidity increased in apple and orange juice and decreased slightly in pear juice. The results are positive in the case of orange juice, since the consumer seeks the opposite effect of clarification (juice with stable pulp). In the case of apple juice, the increase in color and turbidity may be due to the formation of insoluble quinones, a product of polymerization of oxidized phenols (quinones), which could be solved by ultrafiltration with hydraulic pressure, according to the bibliography. It is concluded that the enzyme fungal laccase is not suitable to prevent the oxidation of vegetable oils since it increases oxidation indicators. On the other hand, it is concluded that the laccase enzyme is capable of interrupting one of the processes recognized as responsible for turbidity and darkening of fruit juices, thanks to the decrease in phenolic content.

Keywords: fungal laccase, vegetable oils, rancidity, fruit juices, turbidity.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCION GENERAL

Figura 1: Tipos de degradación: (A) Pudrición blanca causada por <i>Polyporus tricholoma</i> en madera de dicotiledónea; (B) Pudrición castaña o cúbica causada por <i>Laetiporus sulphureus</i> en madera de <i>Eucalyptus</i> sp	2
Figura 2: Esquema de la constitución de la pared de una célula vegetal donde se observa la interconexión entre las microfibrillas de celulosa constituidas por monómeros de glucosa y la matriz de hemicelulosa adherida a moléculas de lignina, (modificado de Santos et al., 2012).....	3
Figura 3: Esquema de una cadena lineal de celulosa formada por monómeros de glucosa.....	4
Figura 4: Representación esquemática de una hemicelulosa.....	5
Figura 5: Estructura esquemática de una molécula de lignina, los números indican los monómeros que la constituyen.....	6
Figura 6: Ilustración del sitio activo de la lacasa mostrando la orientación relativa de los átomos de cobre (Enguita et al. 2003)....	10

CAPITULO 1

Figura 7: Estructura química de colorantes industriales (Grassi et al, 2011).	29
Figura 8: Espectro de absorbancia del colorante Remazol Brilliant Blue R, durante la decoloración causada por la enzima lacasa (0,5 U/ml) proveniente del hongo <i>Trametes versicolor</i> , medido durante 25 min correspondiente con la desaparición del color. El máximo de absorción re registró a los 609 nm.....	30
Figura 9: Espectro de absorbancia del colorante Verde de Malaquita, durante la decoloración causada por la enzima lacasa (0,5 U/ml) proveniente del hongo <i>Trametes versicolor</i> , medido durante 48 h	

correspondiente con la desaparición del color. El máximo de absorción se registró a los 618 nm.....	31
Figura 10: Espectro de absorbancia del colorante Índigo Carmín, durante la decoloración causada por la enzima lacasa (0,5 U/ml) proveniente del hongo <i>Trametes versicolor</i> , medido durante 48 h correspondiente con la desaparición del color. El máximo de absorción se registró a los 608 nm.....	31
Figura 11: Espectro de absorbancia del colorante Anaranjado de Metilo, durante la decoloración causada por la enzima lacasa (0,5 U/ml) proveniente del hongo <i>Trametes versicolor</i> , medido durante 48 h. El máximo de absorción se registró en la longitud de onda de 455 nm.....	32
Figura 12: Espectro de absorbancia del colorante Remazol Brillant Blue R, durante la decoloración causada por la enzima lacasa (0,5 U/ml) proveniente del hongo <i>Trametes versicolor</i> , medido durante 48 h. El máximo de absorción se registró a los 650 nm.....	32
Figura 13: A- Porcentaje de decoloración de RBBR en función del tiempo con lacasa proveniente de tres extractos enzimáticos (<i>Coriolus ver. antarticus</i> , <i>Trametes versicolor</i> y <i>Trametes Villosa</i>). B- Velocidades de decoloración para cada tiempo, del RBBR con lacasa de tres extractos enzimáticos (<i>Coriolus ver. antarticus</i> , <i>Trametes versicolor</i> y <i>Trametes Villosa</i>). Cada experiencia contiene 0,5 U/ml de lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas.....	37
Figura 14 A- Porcentaje de decoloración de VM en función de tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (<i>Coriolus antarticus</i> , <i>Trametes trogii</i> , <i>Trametes versicolor</i> y <i>Trametes Villosa</i>). B- : Velocidades de decoloración del VM en función del tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (<i>Coriolus antarticus</i> , <i>Trametes trogii</i> , <i>Trametes versicolor</i> y <i>Trametes Villosa</i>). Cada experiencia contiene 0,5 U/ml de lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas.....	38

- Figura 15:** A- Porcentaje de decoloración de IC en función de tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). B- Velocidades de decoloración del IC en función del tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). Cada experiencia contiene 0,5 U/mL de lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas.....39
- Figura 16:** A- Porcentaje de decoloración de AM en función de tiempo con cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarcticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). B- Velocidades de decoloración del AM en función del tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). Cada experiencia contiene 0,5 U/ml de lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas.....40
- Figura 17:** A- Porcentaje de decoloración de AzB en función de tiempo con cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarcticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). B- Velocidades de decoloración del AzB en función del tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). Cada experiencia contiene 0,5 U/ml de lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas.....41
- Figura 18:** Porcentajes de decoloración final alcanzados por cada colorante (AzB, AM, IC, VM y RBBR) con los diferentes extractos enzimáticos (*Coriolus ver. antarcticus* BAFC 266, *Trametes villosa* BAFC 2755 y *Trametes versicolor* BACF 2234). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según Test de Fisher. Las barras representan la media más el error estándar.....42

CAPITULO 2

Figura 19: VP en aceites vegetales tratados con lacasa y sus controles correspondientes en un periodo de reacción de 72 h, a 60 ° C. Los datos representan la media de tres repeticiones y las barras representan el error. Cada muestra tratada contenía 3,2 U ml⁻¹ de lacasa de *Trametes versicolor*. Diferente letra indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según Test de Fisher.....54

Figura 20: Dienos conjugados (K232) en aceites vegetales (chía, girasol, maní, sésamo) tratados con lacasa y sus controles correspondientes, almacenados durante 72 horas a 60 ° C. Las letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P <0.05$) de acuerdo con la prueba de Fisher. Los resultados se basan en mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media....57

Figura 21: Trienos conjugados (K270) en aceites vegetales (chía, girasol, maní, sésamo) tratados con lacasa y sus controles correspondientes, almacenados durante 72 horas a 60° C. Las letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P <0.05$) de acuerdo con la prueba de Fisher. Los resultados se basan en mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media.....58

CAPITULO 3

Figura 22: Fenoles Totales (expresado en mg de Ácido Gálico por cada 100 mL de Jugo) en jugo de manzana tratado (sábana inferior) con lacasa proveniente de *Trametes villosa* BAFC 2755, en diferentes concentraciones de la enzima (eje z); y sus correspondientes testigos (sábana superior); en un periodo de reacción de 80 min, a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media71

Figura 23: Turbidez (expresado en NTU) en jugo de manzana tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 40 °C. Los resultados se basan en

mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media	72
Figura 24: Color (expresado en Absorbancia) en jugo de manzana tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa <i>Trametes villosa</i> BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media	73
Figura 25. Fenoles Totales (expresado en mg de Ácido Gálico por cada 100 mL de Jugo) en jugo de pera tratado (sábana inferior) con extracto concentrado de lacasa proveniente de la cepa <i>Trametes villosa</i> BAFC 2755, en diferentes concentraciones de la enzima (expresadas en U de Lac por ml de Jugo); y sus correspondientes testigos (sabana superior); en un periodo de reacción de 80 min a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media.....	75
Figura 26. Turbidez (expresado en NTU) en jugo de pera tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa <i>Trametes villosa</i> BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media	76
Figura 27. Color (expresado en Absorbancia) en jugo de pera tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa <i>Trametes villosa</i> BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media	77
Figura 28. Fenoles Totales (expresado en mg de Acido Gálico por cada 100 mL de Jugo) en jugo de naranja tratado (sábana inferior) con extracto concentrado de lacasa proveniente de la cepa <i>Trametes villosa</i> BAFC 2755, en diferentes concentraciones de la enzima (expresadas en U de Lac por mL de Jugo); y sus correspondientes testigos (sabana superior); en un periodo de reacción de 80 min, a 40 °C. Los datos representan la media de tres réplicas.....	78

Figura 29. Turbidez (expresado en NTU) en jugo de naranja tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa <i>Trametes villosa</i> BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los datos representan la media de tres réplicas y las barras representan el error estándar de la media.....	79
Figura 30. Color (expresado en Absorbancia a 400 nm) en jugo de naranja tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa <i>Trametes villosa</i> BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los datos representan la media de tres réplicas y las barras representan el error estándar de la media	80

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO 1

Tabla 1: Medios de cultivo líquido utilizados para la expresión de lacasa	27
Tabla 2. Colorantes de distinta naturaleza química seleccionados para el ensayo de decoloración con las enzimas lacasas.....	30
Tabla 3: Concentración de lacasa expresada en U/mL, en los distintos extractos enzimáticos luego de 21 días de incubación y posterior proceso de diálisis con sacarosa.....	34
Tabla 4: Velocidades iniciales de decoloración, expresadas mediante la ecuación de la recta de los diferentes colorantes con las cuatro cepas de hongos ensayadas.....	36

CAPITULO 2

Tabla 5: Composición estimada de los principales ácidos grasos en los aceites vegetales, expresados en porcentaje promedio por peso de aceite.....	46
Tabla 6. Valor de Peróxidos en aceites vegetales tratados con lacasa (LAC) y sus controles correspondientes (Fresco).	52
Tabla 7: Evolución de los dienos conjugados (K232) en aceites vegetales (chia, girasol, maní, sésamo) tratados con lacasa (LAC) y sus controles correspondientes (fresco), almacenados durante 18 días a 28°C.....	55
Tabla 8: Evolución de los trienos conjugados (K270) en aceites vegetales (chia, girasol, maní, sésamo) tratados con lacasa (LAC) y sus controles correspondientes (fresco), almacenados durante 18 días a 28 °C.....	56

INTRODUCCION GENERAL

Hongos degradadores de madera- Rol Ecológico

Los hongos de pudrición son aquellos que atacan la pared celular de la madera provocando su rotura y descomposición, para acceder al material celulósico del cual se alimentan. Un gran número de organismos dependen de ellos para obtener sus nutrientes, por ejemplo las larvas de insectos utilizan la madera degradada para llevar a cabo parte de su ciclo de vida (Grove, 2002; Kadowaki et al., 2011). Teniendo en cuenta esto, se considera que el principal rol de los hongos degradadores de la madera en los ecosistemas se centra en el reciclado del carbono y otros elementos, utilizando su capacidad enzimática hidrolítica (celulasas, xilaninas, ligninasas, pectinasas y lipasas), para transformar esta madera en alimento y compuestos simples que vuelven al ecosistema (Filotas et al., 2014).

Clasificación de los hongos degradadores de madera

Tradicionalmente se ha clasificado a los hongos degradadores de la madera en dos grandes grupos según el tipo de pudrición que ocasionan: “hongos causantes de pudrición blanca” aquellos con mayor capacidad degradativa de lignina, y “hongos de pudrición castaña o cúbica” aquellos que degradan y mineralizan la celulosa dejando a la lignina como residuo. Posteriormente surgió el grupo “hongos causantes de pudrición blanda” que producen cavidades cónicas dentro de la madera y poca solubilización de la lignina (Martinez et al., 2005). Estas categorías abarcan cientos de especies de *Basidiomycota* y algunos *Ascomycota*.

Los hongos causantes de pudrición blanca son capaces de degradar hasta su completa mineralización la lignina, celulosa y hemicelulosa de la madera (**Figura 1-A**).

La pudrición castaña o cónica produce un tipo de degradación que disminuye notablemente la integridad estructural (**Figura 1-B**).

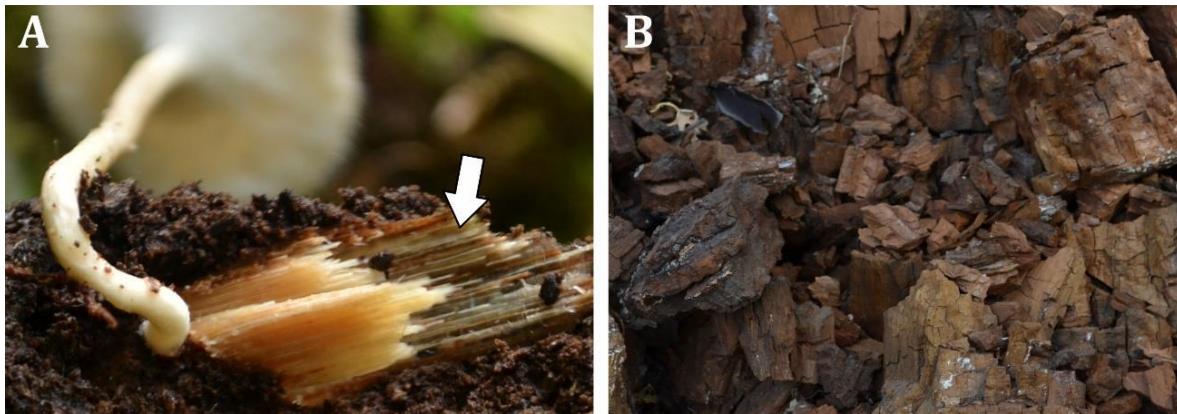


Figura 1: Tipos de degradación: (A) Pudrición blanca causada por *Polyporus tricholoma* en madera de dicotiledónea; (B) Pudrición castaña o cúbica causada por *Laetiporus sulphureus* en madera de *Eucalyptus* sp.

Pared vegetal

La pared vegetal proporciona rigidez y tensión mecánica para soportar la columna de agua, además de funcionar como una barrera de protección contra patógenos. Los organismos que pueden superar esta barrera obtendrán alimento de los constituyentes de las paredes, llamados materiales lignocelulósicos. Todas las células vegetales están rodeadas por una pared primaria compuesta de celulosa y hemicelulosas y una pared secundaria que se lignifica durante el proceso de maduración de algunos tipos celulares (**Figura 2**) (Taiz et al., 2015).

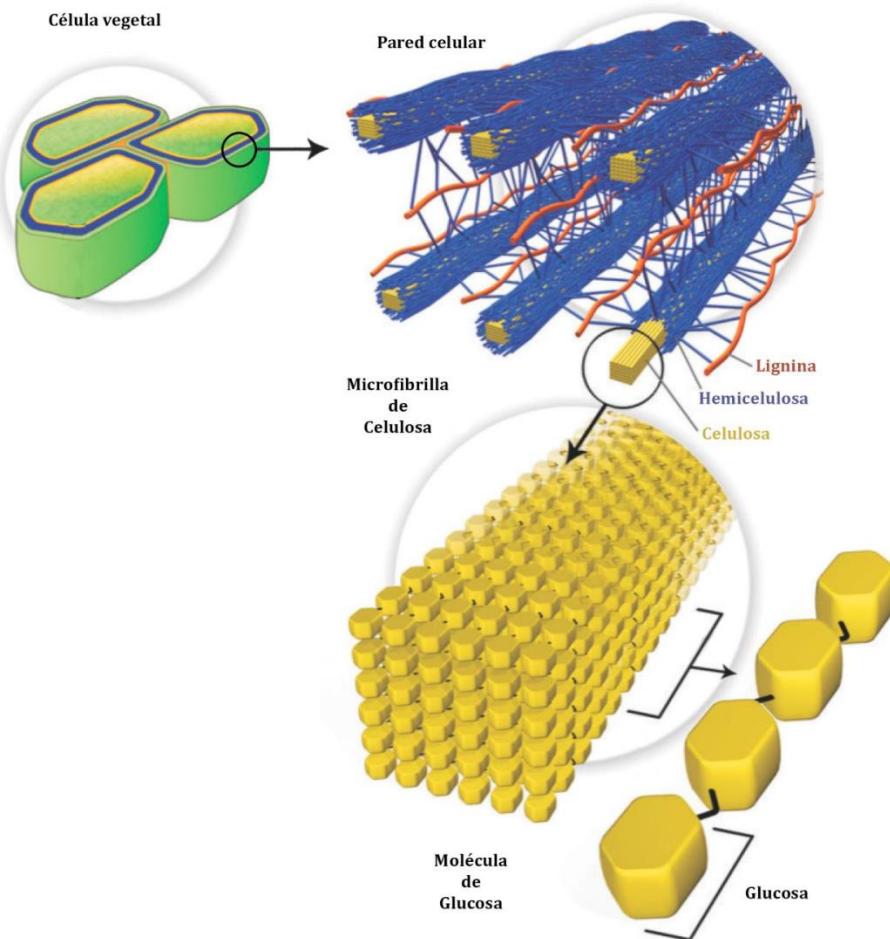


Figura 2: Esquema de la constitución de la pared de una célula vegetal donde se observa la interconexión entre las microfibrillas de celulosa constituidas por monómeros de glucosa y la matriz de hemicelulosa adherida a moléculas de lignina, (modificado de Santos et al., 2012).

Las tres principales macromoléculas complejas que son degradadas por los organismos xilófagos (que se alimentan de madera) son:

Celulosa

La celulosa constituye el 40-50% del peso seco de la madera. Está conformada por cadenas de monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,4. Cada monómero de

glucosa presenta una rotación de 180° respecto de los residuos contiguos (**Figura 3**). Esta conformación lineal con ausencias de cadenas laterales permite la formación de agregados moleculares (microfibrillas) estabilizados por puentes de hidrógeno entre cadenas paralelas.

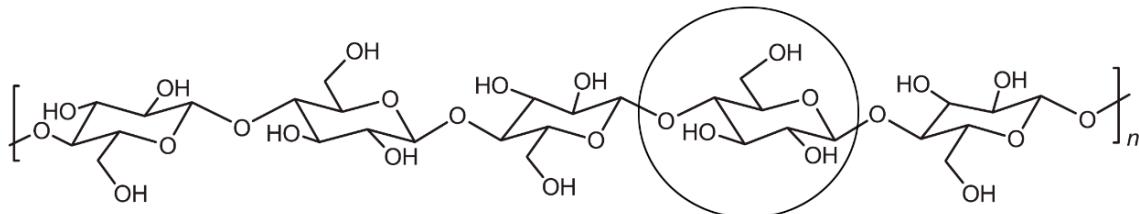


Figura 3: Esquema de una cadena lineal de celulosa formada por monómeros de glucosa.

Con fines experimentales se consideran dos tipos de celulosa: a) “celulosa nativa” o “cristalina”, la cual posee un alto grado de cristalinidad y polimerización y es, por lo tanto, insoluble (ej.: papel de filtro) y b) “celulosa modificada”, la cual se define como una celulosa amorfa, de bajo grado de polimerización y ordenamiento que resulta soluble en agua (ej.: carboximetilcelulosa) (Joseleau y Ruel, 1994).

Hemicelulosa

Las hemicelulosas constituyen el 25-40% del peso seco de la madera y son una porción fácilmente hidrolizable de la pared celular. Están conformadas por polímeros de diversas hexosas como D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico, y pentosas como D-xilosa y L-arabinosa. La mayoría de las hemicelulosas poseen una columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos por enlaces β -1,4 de la que pueden o no salir ramificaciones muy cortas. (Joseleau y Ruel, 1994) (**Figura 4**).

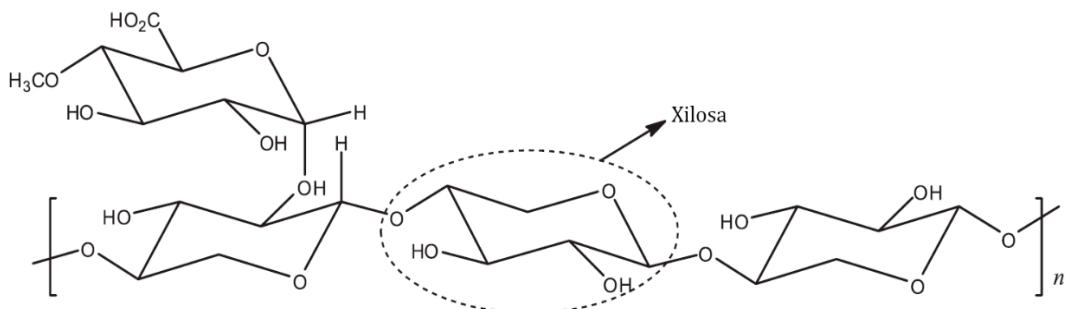


Figura 4: Representación esquemática de una hemicelulosa.

Las hemicelulosas recubren y cohesionan a las microfibrillas de celulosa en una matriz común. Su posición expuesta y su bajo grado de polimerización que incrementa su solubilidad explicarían porqué son los primeros componentes de la madera en ser atacados por los microorganismos (Zabel y Morrell, 2012).

Lignina

La lignina es un polímero aromático insoluble en agua y amorfó, extremadamente recalcitrante a la degradación. Se encuentra entrecruzada entre los otros materiales de la pared celular y constituye una barrera que dificulta el ataque de los organismos a los polisacáridos de la pared (Figura 2). Su estructura compleja, es producto de la unión oxidativa de distintos monolignoles (unidades p-hidroxifenilo, guayacilo y siringilo) que se diferencian en las sustituciones del anillo aromático. Estos monómeros se unen por uniones C-C y C-O-C formando una red compleja y de estructura variable en la cual la proporción de los mismos varía de acuerdo a la especie vegetal y su edad (Ralph et al., 2004) (Figura 5).

Las uniones C-C y C-O-C son catalizadas por enzimas lacasas y peroxidases que generan radicales libres sobre estos monómeros provocando su activación y permitiendo que se polimericen de forma azarosa (Vanholme et al., 2008).

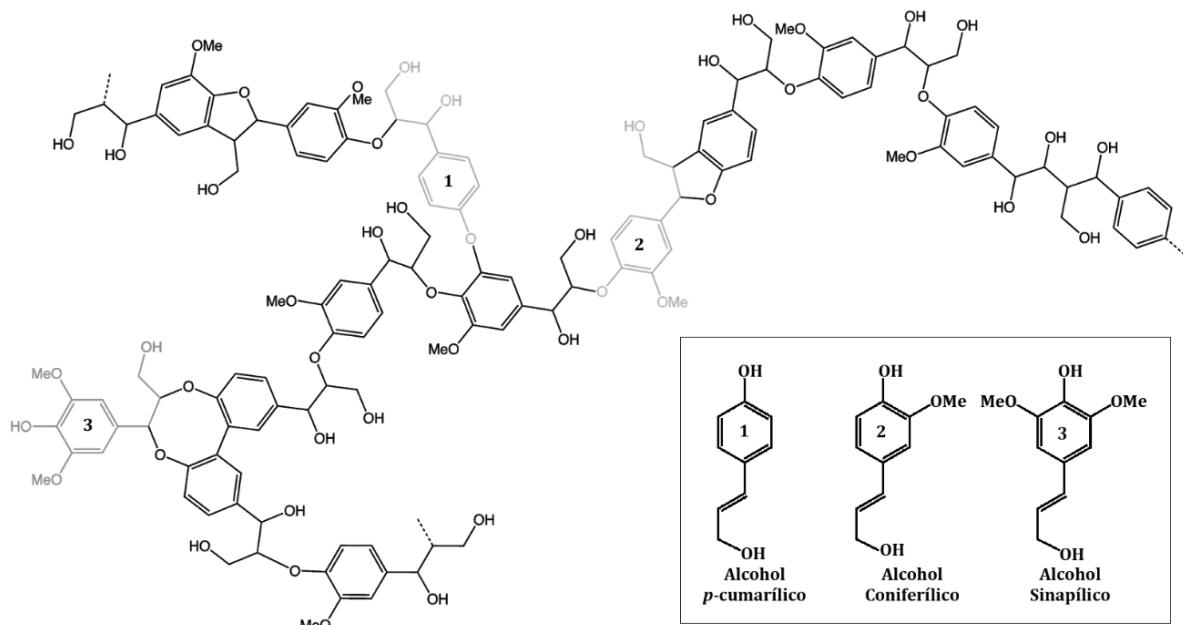


Figura 5: Estructura esquemática de una molécula de lignina, los números indican los monómeros que la constituyen.

Enzimas ligninolíticas

Las enzimas ligninolíticas difieren significativamente de acuerdo al tipo de madera que el hongo utiliza como sustrato y también varían los patrones de deterioro de la madera, demostrando que existen varias estrategias en la naturaleza para degradar al complejo polímero de la lignina (Hatakka, 1994; Papinutti et al., 2003).

Lignino peroxidasa (LiP)

La LiP (EC 1.11.1.14) es una hemoproteína (contiene 1 mol de protoporfirina IX de hierro por mol de proteína) que posee la capacidad de oxidar la lignina y otros compuestos fenólicos a expensas de la reducción de H_2O_2 . Por su alto poder oxidativo, pH óptimo bajo y baja especificidad de sustrato es capaz de actuar sobre sustratos fenólicos y no fenólicos (Lalwani et al., 2014). Fue la primera enzima ligninolítica estudiada a principios de los años 80. Si bien la metodología para la medición de esta actividad enzimática no es compleja, no es fácil su detección en cultivos de hongos de

pudrición blanca (Hatakka, 1994; Tekere et al., 2001; Levin et al., 2004). Esta controversia puede deberse a que producen una proteína inactiva o debido a que poseen un mecanismo de regulación aún desconocido (Rajakumar et al., 1996).

Mn-peroxidasa (MnP)

La enzima MnP (EC 1.11.1.13) es una hemoproteína, que además de depender de H₂O₂ necesita de Mn⁺² (catalizando la oxidación de Mn⁺² a Mn⁺³) (Ikehata et al., 2004).

Oxida compuestos fenólicos, aunque también puede actuar sobre compuestos no fenólicos (Ziegenhagen y Hofrichter, 2000). La MnP se caracterizó bioquímicamente a partir de sobrenadantes de *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn y Gold, 1985).

Solo ha sido hallada en ciertos órdenes de *Basidiomycota* (*Agaricales*, *Corticiales*, *Polyporales*, *Hymenochaetales*) y hasta ahora, no se han reportado otros organismos que expresen y secreten MnP, o que contengan sus genes (Hilden et al., 2008; Morgenstern et al., 2010). Desde su descubrimiento, el interés en la MnP ha ido en aumento principalmente debido a su potencial aplicación en biopulpado, bioblanqueo y biorremediación. Su peso molecular oscila en un rango de entre 38 a 62,5 kDa (Hofrichter et al., 2010). La producción de MnP también puede ser inducida por compuestos aromáticos (Gill y Arora, 2003). A diferencia de la LiP, la MnP es muy común en hongos causantes de pudrición blanca (Hofrichter, 2002).

Lacasa (Lac)

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son polifenoloxidases con átomos de cobre en su sitio activo, catalizan la oxidación de sustratos fenólicos y aromáticos y la reducción de oxígeno molecular a agua (Augustine et al., 2008; Kjaergaard et al., 2012; Majeau et al., 2010). Según análisis filogenéticos la mayoría de lacasas se encuentran en los *Basidiomycota* (Lettera et al., 2010). Se han reportado altos niveles de producción en cultivos de esta familia, como por ejemplo *Pleurotus ostreatus* (Hou et al. 2004); *Ganoderma adspersum* (Songulashvili et al. 2007), *Pycnoporus sanguineus* (Pointing y Vrijmoed, 2000) y *Trametes trogii* (Levin et al., 2004; Grassi et al., 2011)

También es producida por plantas superiores y bacterias (Mayer y Staples, 2002; Brijwani et al., 2010; Santhanam al., 2011).

Además de su rol en la ligninolísis, las lacasas cumplen diversas funciones en los hongos, incluyendo síntesis de melanina y otros pigmentos, y la formación de estructuras reproductivas como cuerpos fructíferos y conidios (Kües y Liu, 2000; Chen et al., 2004; Baldrian, 2006; Giardina et al., 2010). Por otro lado, las enzimas implicadas en la escisión de la lignina producen especies altamente reactivas (y por lo tanto muy tóxicas) de las cuales el micelio fúngico debe ser protegido. Se cree que una de las funciones de la lacasa es compactar estos compuestos mediante la promoción de polimerización antes de que puedan entrar en la hifa (Alcalde 2007).

La selectividad de las lacasas hacia la lignina y sus derivados, se atribuye al sustrato en el medio de cultivo y/o a factores ambientales que regulan las actividades lignocelulolíticas (Blanchette, 1995; Martínez et al., 2005). La concentración y naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo son importantes reguladores de la producción de lacasas (Kang et al., 2009).

Las lacasas oxidan los compuestos de lignina que contienen grupos fenólicos libres, sin embargo, en presencia de mediadores también pueden oxidar ciertos compuestos no fenólicos (Eggert et al., 1996; Collins y Dobson, 1997).

Propiedades bioquímicas de las lacasas

Las lacasas son proteínas muy estables, con temperaturas óptimas de actividad entre 50 y 70 °C (Morozova et al., 2007a), aunque se pueden encontrar enzimas muy termoestables como la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, con un tiempo de inactivación de 3 horas a 75 °C (Litthauer et al., 2007). Smirnov et al., (2001) hacen referencia que en *Trametes sp.* la vida media a 50° C es de 50 a 70 horas como máximo.

Su actividad varía en un amplio rango de pH, entre 2,0 y 8,5, aunque el máximo se encuentra entre 3,0 y 5,0 (Thurston 1994; Leonowicz et al., 2001; Morozova et al., 2007b). El peso molecular de la mayoría de las lacasas fúngicas reportadas oscila entre los 43 y los 110 kDa (Gutiérrez-Soto et al., 2011; Martínez-Morales et al., 2015).

Las lacasas pueden oxidar sustratos con potenciales redox menores a 1 V, ricos en electrones tales como fenoles y anilinas, acoplado a la reducción de oxígeno a agua. Dado que estas oxidaciones ocurren en el agua a una temperatura ambiente (20-40°C), podrían considerarse como un método de oxidación ecológico para las moléculas xenobióticas (Morozova et al., 2007a).

Mecanismo Catalítico de las lacasas

La lacasa cataliza la reducción de O₂ a H₂O utilizando compuestos fenólicos como donantes de hidrógeno (Palmer et al., 2001; Augustine et al., 2008; Wong, 2009; Kjaergaard et al., 2012; Majumdar et al., 2014). Para la actividad catalítica, la unidad de proteína activa son cuatro átomos de Cu distribuidos en tres sitios de unión diferentes (**Figura 6**). El Cu Tipo 1 en su estado de reposo oxidado transfiere el electron que gana al oxidar al sustrato fenólico, hacia el Cu Tipo 2 y Tipo 3, para luego reducir el oxígeno molecular en agua. Los productos iniciales de oxidación son bastante inestables, pudiendo sufrir reacciones espontáneas de hidratación y desprotonación, dando lugar a compuestos insolubles de tipo melanina o produciendo radicales que pueden reaccionar entre si originando dímeros, oligómeros o polímeros unidos covalentemente mediante enlaces C-C, C-O y C-N (Claus, 2004).

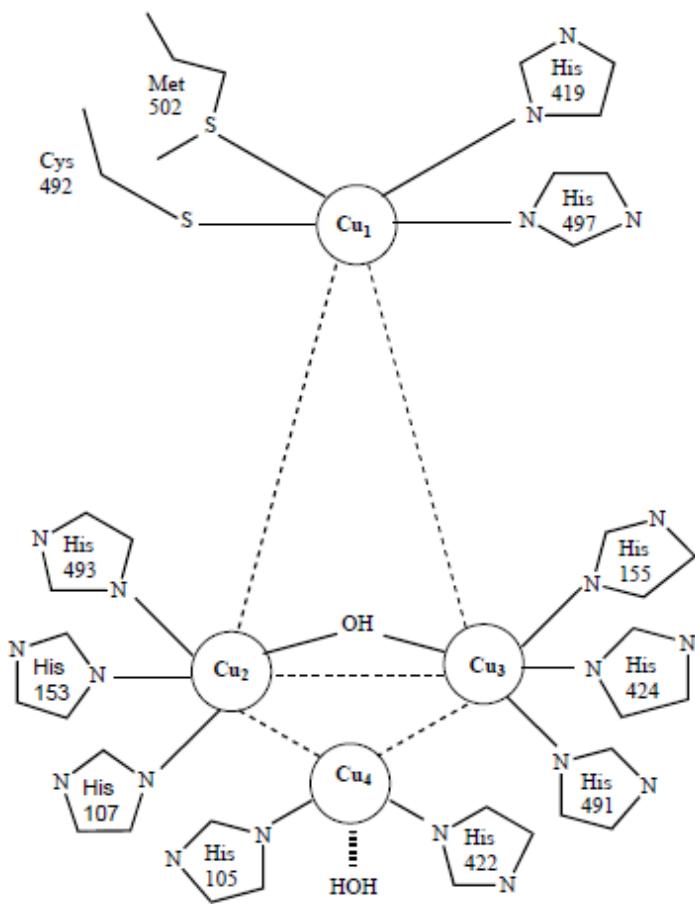


Figura 6: Ilustración del sitio activo de la lacasa mostrando la orientación relativa de los átomos de cobre (Enguita et al. 2003)

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA Y SUS ENZIMAS

La baja especificidad de los mecanismos que usan los hongos de podredumbre blanca para transformar y mineralizar el polímero de lignina y otros compuestos aromáticos sustenta la base de la aplicabilidad biotecnológica de este tipo de hongos y de las enzimas del sistema ligninolítico.

Biorremediación

Los basidiomicetos de la pudrición blanca de la madera son organismos promisorios para ser aplicados en procesos de biorremediación, ya que producen exoenzimas oxidativas que pueden degradar compuestos xenobióticos (Pozdnyakova et al, 2004). Pertenece a este grupo de enzimas las peroxidases ligninolíticas con alto potencial redox (lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil) y las oxidases como la lacasa (Martinez et al, 2005). La capacidad degradativa de estos hongos ha sido ampliamente estudiada, tanto actuando sobre hidrocarburos aromáticos, algunos altamente tóxicos o cancerígenos y de prolongada persistencia en el medio ambiente, tales como nitrobenceno o antraceno, bifenilos policlorados (PCBs) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (APHs) (Mori y Kondo, 2002; Levin et al., 2003; Rao et al., 2014; Kües, 2015), colorantes industriales como verde de malaquita (Papinutti y Forchiassin, 2004), y en la reducción de contaminantes derivados de la industria del papel (Ali y Sreekrishnan, 2001; Raghukumar, 2004). Los hongos causantes de pudrición blanca de la madera presentan una serie de ventajas no asociadas a otros sistemas de biorremediación:

- a- Secretan extracelularmente sus enzimas ligninolíticas, no siendo necesario el contacto entre la hifa y el compuesto contaminante.
- b- Actúan sobre un amplio rango de xenobióticos.
- c- Pueden tolerar ambientes que contengan metales tóxicos y adsorberlos contribuyendo a la detoxificación (Baldrian y Gabriel, 2003).

La presencia de compuestos fenólicos en el agua potable y de riego representa un riesgo significativo para la salud y/o el medio ambiente. Strong y Burges (2008) encontraron que el cultivo del hongo *Trametes pubescens*, productor de lacasa, logró reducir los niveles de fenoles totales y el color de diferentes aguas residuales de destilería. Jaouani et al. (2005) encontraron que el tratamiento del alpechín con lacasa de *Pycnoporus coccineus* mostró resultados similares a los reportados con el hongo, lo que indica que la lacasa desempeña un importante papel en el proceso de degradación. Loto (2017) informó acerca de la capacidad de varias cepas de hongos de pudrición blanca de la madera para degradar el alpechín.

Quarantino et al. (2007) informaron que los fenoles fueron los principales determinantes para fitotoxicidad del alpechín y mostraron que el uso de una preparación de lacasa comercial (DenibLite, Novo Nordisk, Dinamarca) podría ser muy prometedor para un seguro uso agronómico de las aguas residuales.

La degradación de pesticidas utilizados en agricultura mediante enzimas ligninolíticas, ha sido estudiado con el fin de mitigar sus efectos adversos, entre los cuales se destaca la marcada disminución en la diversidad de peces, aves, reptiles y mamíferos de la comunidad lindante (Gibbons et al., 2015; Wolfand et al., 2016).

La utilización de hongos en la degradación derivados de la industria farmacéutica como ibuprofeno, es un tema aún poco conocido, pero de interés puntual en zonas donde estos contaminantes se encuentran acumulados en suelos o ríos (Anasonye et al., 2015; Caracciolo et al., 2015).

La eliminación de colorantes industriales utilizando hongos ligninolíticos, resulta de gran interés y ha sido objeto de numerosas investigaciones (Levin et al., 2005; Mechichi et al., 2006; Grassi et al., 2011; Zucca et al., 2014; Deveci et al., 2016). Las enzimas ligninolíticas son capaces de decolorar y en muchos casos degradar el contaminante generando compuestos menos tóxicos (Levin et al., 2012).

Propiedades funcionales para fines medicinales

Trametes versicolor destaca su contenido en dos polisacáridos: la cresina y el tracetano que parecen ser los que le confieren sus propiedades medicinales. Un suplemento dietético patentado preparado a partir de extractos de *Trametes versicolor* fue evaluado para reducir el crecimiento de células promotoras del cáncer de próstata (Hsieh y Wu, 2001; Grube et al., 2001).

Actualmente, se cultivan comercialmente más de 15 especies de hongos comestibles, a través de procesos biotecnológicos altamente eficientes. El cultivo en medios líquidos del micelio, como parte de esta tecnología ha permitido una reducción del tiempo y aumento en la producción de sus metabolitos, lo que ha impulsado aún más el estudio de estos compuestos (Suárez-Arango y Nieto, 2013).

En Japón, los oncólogos creen que la inmunoterapia micológica ayuda al sistema inmunológico del propio paciente a destruir las células cancerígenas (Llauradó et al.,

2011). Estudios efectuados en la Universidad de Hong Kong y en el Instituto Xijing de Xi'an, China, postularon que distintos extractos del *Coriolus Versicolor* fueron capaces de inhibir la proliferación de hepatomas celulares humanos en un 50 % (Cai et al., 2010). Los efectos inmunomoduladores de extractos acuosos obtenidos a partir del micelio de *Pleurotus spp.* han sido demostrados en biomodelos de inmunodeficiencias secundarias (Morris et al., 2007).

Maitake (*Grifola frondosa*), es un hongo japonés estrechamente relacionado con el hongo *Polyporus* utilizado en la medicina tradicional china. Gracias a su contenido en beta-glucanos, tiene la habilidad de desintoxicar carcinógenos del cuerpo de forma natural (Kodama et al., 2004).

Industria papelera

El principal problema de la fabricación de papel es la eliminación de la lignina de la madera, más conocido como proceso Kraft, en el cual se utilizan grandes cantidades de sustancias químicas cloradas (Polaina y MacCabe, 2007). Los efluentes por lo tanto son tóxicos y altamente coloreados. Se ha comprobado que el tratamiento de estos efluentes con hongos ligninolíticos tales como *T. versicolor* y *P. chrysosporium*, no sólo produce la decoloración (hasta el 80%) sino también la detoxificación de los clorofenoles (Nilsson et al., 2006; Blánquez et al., 2008; Da Re et al., 2010; Kaur et al., 2016).

En el pulpado mecánico se ha demostrado que el uso de enzimas provenientes de algunos hongos de pudrición blanca eliminan parte de la lignina, reduciendo el consumo de energía hasta un 30-50% como así también el uso de compuestos clorados, con considerables mejoras en las propiedades de resistencia de la pulpa (Valls et al., 2009; Giles y Dixon, 2014).

Sin embargo, el método enzimático más promisorio en bioblanqueo lo constituye el sistema lacasa-mediador, junto a la utilización de crudos enzimáticos (Silva, 2006).

La inclusión de lacasa antes del blanqueo químico podría reducir el uso de productos químicos a base de cloro en las industrias de papel (Singh et al., 2010; Virk et al., 2012).

Un menor uso de productos químicos de blanqueo significa una menor necesidad de agua fresca para lavar los productos químicos de la pulpa blanqueada. La búsqueda de nuevos sistemas lacasa-mediador ha centrado su atención en que sea rentable, tolerante a pH alcalinos y de alta estabilidad térmica debido a que varias etapas de la fabricación de papel pasan por condiciones de altas temperaturas en condiciones alcalinas (Singh et al., 2015).

Bioetanol

La conversión de biomasa vegetal en azúcares fermentables, mediante microorganismos para la producción de etanol, es una alternativa prometedora para satisfacer la demanda mundial de biocombustibles. Esta biomasa representa la fuente más abundante de materia orgánica en la tierra, es biodegradable y renovable (Gonçalves et al., 2011). Los biocombustibles producidos a partir de sustratos lignocelulósicos, que incluyen residuos agrícolas y cultivos no alimenticios, se denominan de *segunda generación*. Las enzimas lignocelulolíticas liberan los azúcares que son fermentados posteriormente por levaduras a etanol (Hori y Cullen, 2016).

Existen diversos procesos (físicos, químicos y/o biológicos) para el pre tratamiento de materiales lignocelulósicos. El pre-tratamiento de hidrólisis convencional es rápido, sin embargo incluye la utilización de ácidos diluidos a altas temperaturas, y genera inhibidores tóxicos de la sacarificación y/o fermentación, como por ejemplo: ácido acético proveniente de las hemicelulosas, furfurales a partir de xilosa, hidroximetilfurfural de las hexosas y fenoles provenientes de la lignina. Estos compuestos tóxicos tienen un efecto negativo en el metabolismo de las levaduras encargadas del proceso de fermentación, y consecuentemente en la producción de bioetanol.

El pre-tratamiento biológico de lignocelulosas con hongos causantes de pudrición blanca aplica para disminuir el contenido de lignina y es un paso crucial en la conversión de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables y combustibles; esto se utiliza hace décadas para el alimento de rumiantes (Millati et al., 2011; Salvachúa et al., 2013).

El pre-tratamiento biológico con microorganismos ofrece numerosas ventajas respecto de los tratamientos físico-químicos: bajas inversiones de capital y bajo requerimiento de energía y de productos químicos (Wan y Li, 2012).

Industria Textil

Una de las aplicaciones con mayor proyección a escala industrial de las enzimas ligninolíticas es su empleo en el blanqueo de fibras de algodón y colorantes textiles como el índigo en prendas vaqueras (Riva, 2006), existiendo preparaciones comerciales de lacasa y mediador como DeniLite® (Novozymes, Dinamarca).

Las lacasas han reemplazado el blanqueo con peróxido para mejorar la blancura del algodón. Los productos con lacasa son comercializados en todo el mundo y solicitados para blanqueo denim (Rodriguez-Couto et al., 2012; Iracheta-Cardenas et al., 2016;).

Nanobiotecnología

Se han desarrollado biosensores basados en lacasas para el análisis de diferentes compuestos fenólicos (Freire et al., 2001), oxígeno, azidas, narcóticos (Bauer et al., 1999), pesticidas (Zherdev et al., 1999) o para electroinmunoensayos (Kuznetsov et al., 2001).

Di Fusco et al. (2010) informaron el desarrollo de un biosensor amperométrico basado en lacasas de *Trametes versicolor* y *Trametes hirsuta* para la determinación del índice de polifenoles en vinos.

Ibarra-Escutia et al. (2010) han desarrollado y optimizado un biosensor amperométrico basado en lacasa de *T. versicolor* para monitorear el contenido de compuestos fenólicos en infusiones de té.

INDUSTRIA ALIMENTARIA

La lacasa se ha investigado para el procesamiento de bebidas (vinos, jugos de frutas y cerveza), en panadería, en la gelificación de pectina, para mejorar los atributos sensoriales de algunos alimentos y como biosensor, entre otros (Witayakran y

Ragauskas, 2009; Majeau et al, 2010; Kudanga et al, 2011; Bezerra et al, 2015; Lettera et al, 2016). Además, se ha demostrado que las enzimas reductoras de oxígeno, como la glucosa oxidasa y la lacasa, tienen el potencial de catalizar la eliminación de oxígeno en envases activos de alimentos (Nestorsson et al., 2008; Johansson et al., 2011; Chatterjee et al., 2011).

Estabilización del vino

La estabilización del vino es una de las principales aplicaciones de lacasa en la industria alimentaria como alternativa a adsorbentes físico-químicos. Mediante la eliminación de ciertos fenoles, se reduce la interacción de estos con proteínas, causante de la formación de sedimentos en los vinos (Minussi et al 2002).

Las propiedades organolépticas del vino pueden mantenerse eliminando los compuestos fenólicos no deseados. Estos están presentes en alta concentración y afectan sabor, color y sensaciones gustativas del vino. La lacasa se ha propuesto como alternativa para reducir estos compuestos (Tanri et Eks, 2005; Main y Morris, 2007; Osma et al., 2010; Ducasse et al., 2011).

Además, el tratamiento de tapones de corcho para botellas de vino, comercializado por Novozymes, utiliza lacasa producida por el hongo *Myceliophthora thermophila*. La enzima reduce oxidativamente el característico olor a corcho y/o astringencia, que es frecuentemente impartido al vino envejecido (Javed et al, 2017).

Estabilización de Cerveza

La vida útil de la cerveza depende de diferentes factores tales como la formación de turbidez, el contenido de oxígeno y la temperatura. El primero es producido por pequeñas cantidades de proantocianidinas de origen natural, polifenoles que generan precipitación de proteínas y, por lo tanto, la formación de neblina (Ray y Rosell, 2017). Este tipo de complejo aparece durante los procesos de enfriamiento pero puede volver a presentarse a temperatura ambiente o superior (Minussi et al, 2002). A su vez, productos que son libres de turbidez en el momento del embalaje pueden desarrollar este complejo durante el almacenamiento a largo plazo. Así, la formación

de sedimentos ha sido un problema persistente en la industria cervecera (McMurrough et al, 1999).

La compañía Novozymes desarrolló una preparación comercial basada en la lacasa de *Myceliophthora thermophila* "Flavourstar", para prevenir la formación de compuestos de mal sabor (por ejemplo, trans-2-nonenal) mediante el barrido del oxígeno, que de otro modo reaccionaría con ácidos grasos, aminoácidos, proteínas y alcohol para formar precursores de sabor desagradable (Mate y Alcalde, 2016).

Horneado

Las lacasas son actualmente de interés en la cocción debido a su capacidad para reticular biopolímeros. Renzetti et al. (2010) demostraron que una lacasa comercial mejoró significativamente el rendimiento de la harina de avena en panificación y la calidad de textura de pan de avena mediante el aumento de volumen específico y la reducción de la dureza de la miga. Las actuaciones de panificación mejoradas podrían estar relacionadas con el aumento de la suavidad y elasticidad de las masas de avena con la suplementación de lacasa (Labat et al., 2000; Renzetti et al., 2010).

Mejora de los parámetros sensoriales de alimentos

Takemori et al (1992) utilizaron un extracto crudo de lacasa de *Coriolus versicolor* para mejorar el sabor de la semilla de cacao y sus productos. El amargor y otros sabores desagradables fueron retirados por el tratamiento con lacasa, y el chocolate fabricado a partir de la masa de cacao sabía mejor que el control.

Bouwens et al (1997; 1999) informaron que el color de los productos a base de té mejoraron cuando se trataron con lacasa de *Pleurotus sp.* De la misma manera, aceitunas picadas en una mezcla de agua y aceite oliva se trataron con lacasa de *Trametes villosa*, en este caso, el amargor fue considerablemente reducido mientras que el color se volvió más oscuro en comparación con el control (Novo Nordisk A/S, 1995).

HIPÓTESIS GENERALES

- Las cepas de *Coriolus versicolor f. antarcticus BAFC 266*, *Trametes villosa BAFC 2755*, *Trametes trogii BAFC 463* y *Trametes versicolor BACF 2234* producen enzimas lacasas.
- Los extractos enzimáticos con lacasa de las cepas evaluadas son capaces de degradar colorantes industriales de distinta naturaleza química.
- Las enzimas lacasas contenidas en los extractos de las cepas seleccionadas permiten mejorar la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales.
- Las enzimas lacasas contenidas en los extractos de las cepas seleccionadas contribuyen al proceso de clarificación de jugos de fruta natural.

OBJETIVOS GENERALES

- 1- Valorar la capacidad de producción de lacasa por diferentes cepas de hongos de pudrición blanca y analizar el efecto de estas enzimas para degradar colorantes de distinta naturaleza química.
- 2- Evaluar el efecto de un extracto de lacasa de *Trametes versicolor* sobre la estabilidad oxidativa de aceites vegetales
- 3- Estudiar el efecto de un extracto de lacasa de *Trametes villosa* en el proceso de clarificación de jugos de fruta.

CAPITULO 1

“Producción de lacasa por especies del genero *Trametes* y *Coriolus ver. f. antarcticus* y análisis del efecto de la enzima sobre la degradación de colorantes de diferente naturaleza química”

INTRODUCCIÓN

La producción de lacasa depende de una serie de factores, que incluyen la cepa del microorganismo y la manipulación del mismo, la composición del medio de cultivo (compuestos que proporcionan una fuente de nitrógeno y carbono o que actúan como inductores), el método de cultivo (sustrato sólido o sumergido/liquido), y las condiciones de cultivo (disponibilidad de oxígeno, oscuridad, pH, temperatura) (Wong 2009).

Los cultivos de hongos producen aumento de la biomasa y de la concentración enzimática en el medio cuando se adecua la provisión de nutrientes ofreciendo el suficiente aporte de carbono y el inductor adecuado, por ejemplo CuSO₄ (Saparrat, 2004).

Muchas enzimas importantes de producción industrial, incluida la lacasa, son obtenidas utilizando fermentación. De manera general, este proceso se puede definir como una operación unitaria que consiste en la transformación biológica de materias primas a productos a través de microorganismos. La fermentación sumergida es uno de los procesos más utilizados en la obtención de enzimas extracelulares debido a que es sencillo, pueden controlarse muchas variables y el producto final es fácil de recuperar. En ella los microorganismos se desarrollan flotando en el medio de cultivo y en el caso de los hongos miceliares, estos forman pequeñas esferas de micelio denominadas «pellets». El desarrollo del microorganismo se presenta de una forma típica, dando origen a una fase de latencia, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y, la última, la fase de muerte (Fazenda et al, 2008)

Existen evidencias que indican la incidencia de la luz sobre la actividad ligninolítica. En *Pygnoporus sanguineus*, se observó una disminución de la actividad lacasa por exposición a la luz, particularmente esta actividad disminuyó el 85,2% al exponerse el cultivo a la longitud de onda correspondiente al verde (Hernandez et al, 2016). Esto podría explicarse como un mecanismo ecológico de reconocimiento ambiental, dado que el micelio se desarrolla dentro de sustratos lignocelulósicos (ejemplo madera en descomposición) en condiciones de oscuridad, la presencia de luz le indicaría al

organismo que se encuentra en el exterior, sin lignina, y por lo tanto la síntesis de enzimas ligninolíticas no sería necesaria (Hernandez et al., 2016)

Se ha demostrado además que la producción de la enzima lacasa puede ser inducida por numerosos y diferentes compuestos, como colorantes industriales (Levin et al., 2005; Revankar y Lele, 2006; Minussi et al., 2007a; Quarantino et al., 2008; Elisashvili et al., 2010), ácido ferúlico (Chen et al., 2003), 2,6-dimetoxifenol (Myasoedova et al., 2008), pirogalol (Elisashvili et al., 2010), determinados aminoácidos y vitaminas (Dhawan y Kuhad, 2002), compuestos aromáticos (principalmente vainillina), metales como cobre, manganeso y plata (De la Rubia et al., 2002; Galhaup et al., 2002; Baldrian, 2006; Zhuo et al., 2011; Grassi et al., 2011; Kuhar y Papinutti, 2014; Yan et al., 2014), etanol (Lomascolo et al., 2003), compuestos fenólicos (Levin et al., 2005; Lo et al., 2001), shock térmico o stress oxidativo (Janusz et al., 2013). De todos ellos, el cobre ha sido el inductor más potente para la mayoría de los hongos causantes de pudrición blanca.

El Cu⁺², necesario para la biosíntesis de lacasa, la cual contiene cobre en su estructura (Kumar et al., 2011), incrementó la producción de lacasa en hongos de pudrición blanca tales como *Trametes trogii* (Levin et al., 2002), *Trametes pubescens* (Galhaup et al., 2002), *Lentinus tigrinus* (Shutova et al., 2008) y otras especies del género *Lentinus*, grupo hermano de *Polyporellus* (Khammuang et al., 2013).

La investigación acerca de las variables que afectan diversos aspectos de la fisiología fúngica tales como el crecimiento y la producción enzimática lignocelulolítica, en especies de hongos degradadores de madera, constituye un aporte tendiente a incrementar la producción de dichas enzimas, para su aplicación en diferentes procesos biotecnológicos (Flores et al., 2009).

Antecedentes en decoloración de colorantes industriales

Alrededor del 10-15% de los colorantes que se utilizan en la industria de los plásticos, papelera, alimenticia y textil, se derraman en los efluentes. Suelen ser de origen sintético y poseen complejas estructuras moleculares aromáticas, que los

hacen más estables y muy resistentes al ataque microbiano. El color es uno de los factores más importantes en el análisis de contaminantes, por muchas razones:

- 1) es visible incluso en cantidades pequeñas de colorante ($\geq 0,005 \text{ mg/L}$)
- 2) el color puede interferir en la trasmisión de luz solar dentro de corrientes naturales
- 3) muchos de los colorantes y sus productos intermediarios como aminas aromáticas son tóxicos para la vida acuática, carcinogénicos y mutagénicos en los humanos (Figueroa, et al., 2009).

Las principales aplicaciones de colorantes se encuentran en el sector textil. La presencia de concentraciones muy bajas de colorantes en el efluente es altamente visible e indeseable (Nigam et al., 2000). Kirby (1999) ha demostrado que *Phanerochaete chrysosporium* tiene la capacidad de decolorar el efluente textil hasta un 99% en 7 días. Los colorantes azoicos, son la clase más grande de colorantes producidos comercialmente y no se degradan fácilmente por los microorganismos, pero puede ser degradado por *Phanerochaete chrysosporium* (Paszczynski y Crawford, 1995).

Los hongos de la pudrición blanca, como *Trametes versicolor*, son capaces de degradar los colorantes utilizando las mismas enzimas empleadas para la degradación de la lignina, como la peroxidasa de lignina (LiP), peroxidasa dependiente de manganeso (MnP) y la lacasa (Thurston, 1994; Schliephake y Lonergan, 1996; Robinson et al., 2001).

Trametes hirsuta y una lacasa purificada de este organismo pudieron degradar los colorantes indigoides, azoicos y antraquinónicos. Las velocidades iniciales de decoloración dependieron de los sustituyentes en los anillos fenólicos de los colorantes (Abadulla et al., 2000).

La similitud existente entre la estructura química de los monómeros de la lignina y de algunos colorantes industriales hace posible la aplicación de las enzimas extracelulares de los hongos de la pudrición blanca de la madera en la degradación de dichos colorantes (Robinson et al, 2001; Jarosz-Wilkolazka et al, 2002; Yang et al, 2003).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener extractos enzimáticos con actividad lacasa, utilizando diferentes cepas de hongos de pudrición blanca de la madera crecidos en distintos medios líquidos.
- Evaluar el porcentaje de decoloración de colorantes químicos utilizando los extractos de lacasa obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Organismos seleccionados:

Los hongos de pudrición blanca fueron aportados y caracterizados por el Dr. Emanuel M. Grassi, director del Instituto Misionero de Biodiversidad (IMiBio), Puerto Iguazú, Misiones. Estos hongos fueron obtenidos en distintas campañas de recolección y aislamiento (12/2011; 06/2012; 08/2013) en la Provincia de Misiones. Los hongos del género *Trametes* de interés fueron aislados a partir de secciones del cuerpo fructífero (pie), los cuales fueron inoculados en tubos *éppendorf* o placas de *petri* con medio de cultivo para aislamiento, extracto de malta y agar, suplementado con cloranfenicol (200 mg/mL) para inhibir el crecimiento de bacterias, y benomil (1% v/v) para inhibir el crecimiento de otros hongos. Luego los aislamientos fueron incubados a 28°C, observados y repicados durante un mes para obtener cultivos puros. El material colectado fue depositado en la colección de hongos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires (BAFC).

Los aislamientos puros son considerados cepas según la definición del diccionario de los hongos, que indica que una cepa es un grupo de individuos o células clonadas (Kirk et al., 2008).

Las cepas fueron: *Coriolus versicolor f. antarcticus* BAFC 266, *Trametes villosa* BAFC 2755, *Trametes trogii* BAFC 463 y *Trametes versicolor* BACF 2234.

1.2. Cultivos de mantenimiento:

Placas de Petri fueron inoculadas en el centro, utilizando un inóculo de aproximadamente 0,5 cm² retirado del borde de una colonia de un cultivo puro. Se realizaron tres réplicas de cada cepa y como control negativo de contaminación se utilizaron placas con medio de cultivo sin inocular. Las placas se cubrieron de micelio en 8 días promedio.

1.3. Medios de cultivo líquido para la expresión de lacasa:

Los medios de cultivo se seleccionaron buscando variedad en sus componentes, en relación a la fuente de nitrógeno y compuestos promotores de la producción de lacasa,

con estructura similar a la lignina. La fuente carbonada fue glucosa en todos los casos. La composición y las condiciones de cultivo se seleccionaron mediante una revisión crítica de estudios previos que consideraron múltiples factores para lograr una producción eficiente de lacasas fúngicas (Galhaup et al., 2002; Papinutti et al., 2003; Levin et al., 2004; Sathishkumar et al., 2010; Piscitelli et al., 2011; Grassi et al, 2011; Chan Cupul et al., 2014).

Se evaluaron dos medios sintéticos (con medio basal) y tres medios naturales. Dos de los medios naturales ensayados fueron elaborados para éste estudio, ellos son el medio YPG y el medio GAP. La composición de los cinco medios analizados se detalla en la **Tabla 1**.

Todos los medios se supplementaron con sulfato de cobre 0.4 mg L^{-1} para inducir la expresión de la enzima. El cobre es un reconocido inductor de la actividad lacasa que forma parte del sitio activo de la enzima (Kuhar y Papinutti, 2014; Ling et al, 2015). En todos los casos el medio se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 min.

Tabla 1. Medios de cultivo líquido utilizados para la expresión de lacasa.

Medios Naturales	Medios Sintéticos				
<u>GALHAUP</u> (autor del medio) Glucosa 40 g Extracto de levadura 5 g Peptona de carne 5 g $\text{SO}_4\text{Mg. 7 H}_2\text{O}$ 1 g Agua destilada hasta 1000 mL (Galhalup, 2002) + CuSO₄ 0.4 mg L⁻¹	<u>GA</u> (Glucosa/Asparagina) Glucosa 10 g Asparagina 4 g <u>Medio Basal</u> : $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g HK_2PO_4 : 0.6 g H_2KPO_4 : 0.5 g Agua destilada hasta 1000 mL Solución de micronutrientes A*: 2 mL Solución de micronutrientes B*: 2 mL Tiamina**: 100 mL Biotina**: 50 mL * Micronutrientes: <table border="1"> <tr> <td>Soluciones madre en 1L:</td> </tr> <tr> <td>A: CuSO₄.5H₂O 200 mg $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 45 mg H_3BO_3 35 mg $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg $\text{ZnCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.75 g B: FeCl₃ 500 mg</td> </tr> </table> ** Vitaminas: <table border="1"> <tr> <td>Soluciones madre en 1L:</td> </tr> <tr> <td>Hidrocloruro de tiamina: 1 mg/mL Biotina: 100 ug/mL</td> </tr> </table> (Galvagno, 1976) + CuSO₄ 0.4 mg L⁻¹	Soluciones madre en 1L:	A: CuSO ₄ .5H ₂ O 200 mg $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 45 mg H_3BO_3 35 mg $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg $\text{ZnCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.75 g B: FeCl ₃ 500 mg	Soluciones madre en 1L:	Hidrocloruro de tiamina: 1 mg/mL Biotina: 100 ug/mL
Soluciones madre en 1L:					
A: CuSO ₄ .5H ₂ O 200 mg $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 45 mg H_3BO_3 35 mg $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg $\text{ZnCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.75 g B: FeCl ₃ 500 mg					
Soluciones madre en 1L:					
Hidrocloruro de tiamina: 1 mg/mL Biotina: 100 ug/mL					
<u>GAP</u> (Glucosa, Aserrín, Peptona) Glucosa 15g peptona de carne 5g Aserrín de pino 5g Salvado de trigo 5g Agua destilada hasta 1000 mL + CuSO₄ 0.4 mg L⁻¹	<u>CZAPEK</u> (autor del medio) NaNO ₃ 2 g HK_2PO_4 1 g KCl 0,5 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g Sacarosa 30 g Agua destilada hasta 1000 mL (The Merck Index. 12° Edition. 1996). + CuSO₄ 0.4 mg L⁻¹				

1.4. Obtencion de los extractos enzimáticos

La inoculación se realizó en cámara de flujo laminar. El pH inicial del medio en todos los tratamientos fue de aprox. $6,35 \pm 0,4$. Se incubó en frascos Erlenmeyers de 250 mL con 25 mL de medio en condiciones estáticas y de oscuridad, a 28°C en estufa, por 21 días.

El micelio fue separado por filtración a presión reducida, a través de un papel de filtro Whatman utilizando un embudo Büchner. Los sobrenadantes de cultivo se reservaron hasta ser concentrados y ultrafiltrados.

1.5. Determinación de la actividad lacasa:

Fue determinada usando 2,6-DMP (Dimetoxifenol) 5 mM (77.1 mg/ 100 mL buffer acetato, pH 3.6) como sustrato. La reacción se llevó a cabo en tubos con 2,5 mL de sustrato, incubados en baño maría a 30°C por 10 min. Luego se adicionó una alícuota (10 a 50 μL) del sobrenadante de cultivo y se incubó unos pocos segundos hasta la aparición del color anaranjado (cerulignona). Inmediatamente se coloca en el espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a 469 nm. (Paszzczynski y Crawford, 1991). Una unidad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmoL de sustrato en 1 min.

1.6. Concentración de los extractos enzimáticos:

Las proteínas presentes en el líquido de cultivo se concentraron mediante diálisis frente a sacarosa utilizando tubos de diálisis de celulosa de 25 mm x 16 mm, de Sigma-Aldrich (Walker, 2009).

El producto obtenido se filtró mediante un filtro de jeringa con poro de 0,45 μm y área efectiva de filtración de 25 mm, de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de Biopure. Estos extractos concentrados se tomaron como fuente de lacasa y se conservaron en freezer a -18°C hasta su utilización, permaneciendo las enzimas estables durante meses.

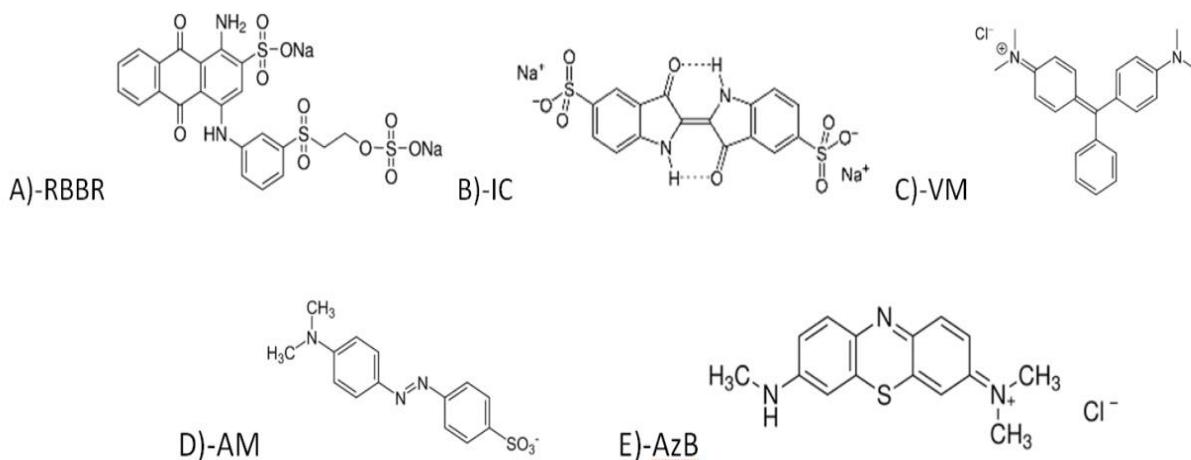


Figura 7: Estructura química de colorantes industriales (Grassi et al, 2011).

1.7. Colorantes seleccionados:

Se seleccionaron colorantes de distinta naturaleza química para ampliar los conocimientos acerca de la afinidad enzima-sustrato por parte de las lacasas en estudio. En la **figura 7** se muestran las estructuras químicas de los colorantes.

La concentración de cada colorante fue la adecuada para permitir su lectura en el espectro visible, según la bibliográfica, y se detallan en la **tabla 2**. La solución madre de cada colorante se preparó en buffer acetato de sodio a pH 4.6, para beneficiar la acción enzimática. Por otro lado, la longitud de onda para medir a cada colorante se corroboró determinando las curvas de absorbancia espectral y los máximos obtenidos se registraron también en la **tabla 2**.

Las **figuras 8, 9, 10, 11 y 12** muestran los espectros de absorbancia vs tiempo de los cinco colorantes frente al extracto del hongo *Trametes versicolor*, a modo de ejemplo. Con los extractos enzimáticos de los demás hongos se obtuvieron figuras similares.

Tabla 2. Colorantes de distinta naturaleza química seleccionados para el ensayo de decoloración con las enzimas lacasas.

Colorante	Abrev.	Nat. química	Concentración	Abs Max.
Remazol Brillant Blue R	RBBR	antraquinonico	1, 50 mg/L	609 nm
Verde de Malaquita	VM	trifenilmetanoico	1, 6 mg/L	618 nm
Índigo Carmín	IC	indigoico	23 mg/L	608 nm
Anaranjado de Metilo	AM	azoico	10 mg/L	455 nm
Azure B	AzB	heterocíclico	4 mg/L	650 nm

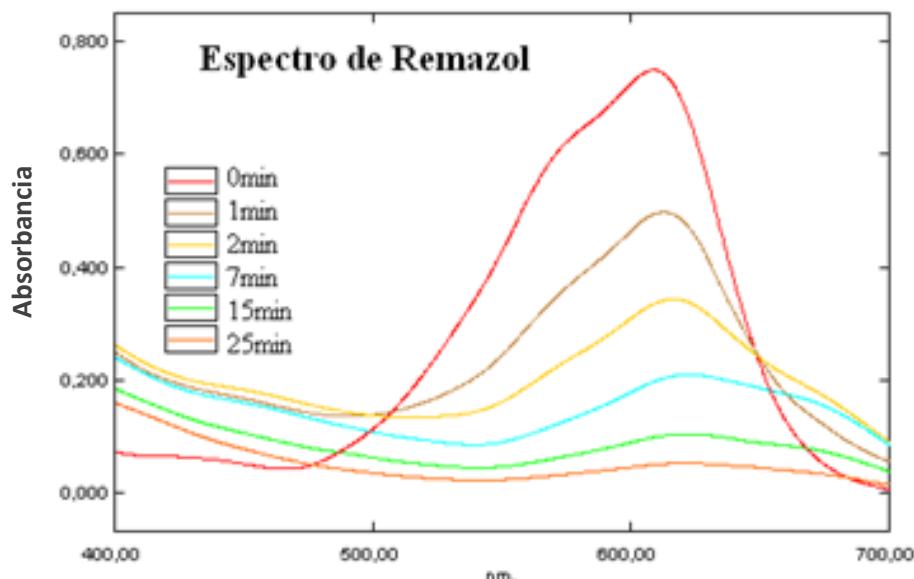


Figura 8: Espectro de absorbancia del colorante Remazol Brillant Blue R, durante la decoloración causada por la enzima lacasa (0,5 U/ml) proveniente del hongo *Trametes versicolor*, medido durante 25 min, correspondiente con la desaparición del color. El máximo de absorción re registró a los 609 nm.

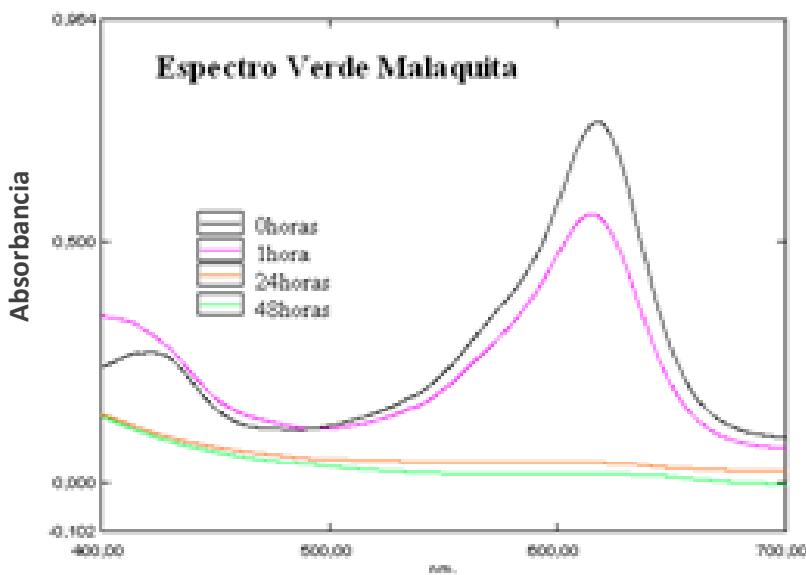


Figura 9: Espectro de absorbancia del colorante Verde de Malaquita, durante la decoloración causada por la enzima lacasa (0,5 U/ml) proveniente del hongo *Trametes versicolor*, medido durante 48 h correspondiente con la desaparición del color. El máximo de absorción se registró a los 618 nm.

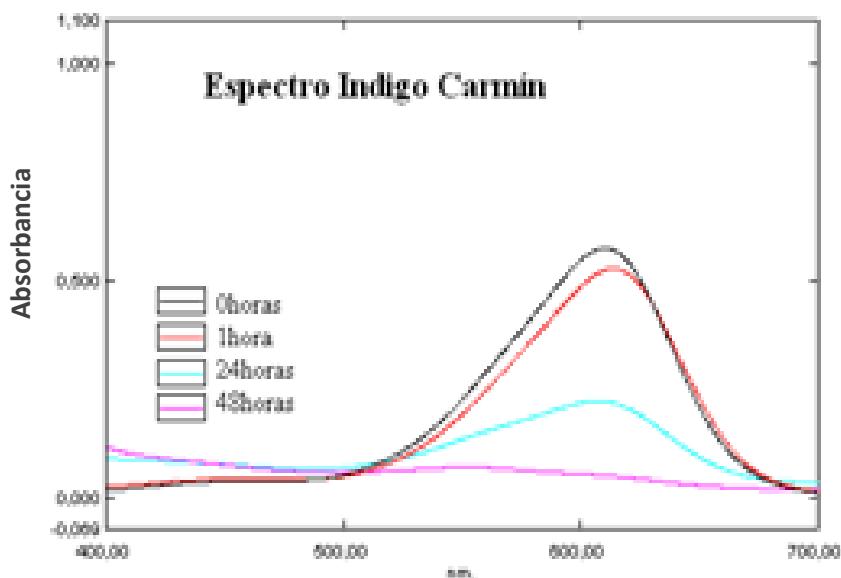


Figura 10: Espectro de absorbancia del colorante Índigo Carmín, durante la decoloración causada por la enzima lacasa (0,5 U/ml) proveniente del hongo *Trametes versicolor*, medido durante 48 h correspondiente con la desaparición del color. El máximo de absorción se registró a los 608 nm.

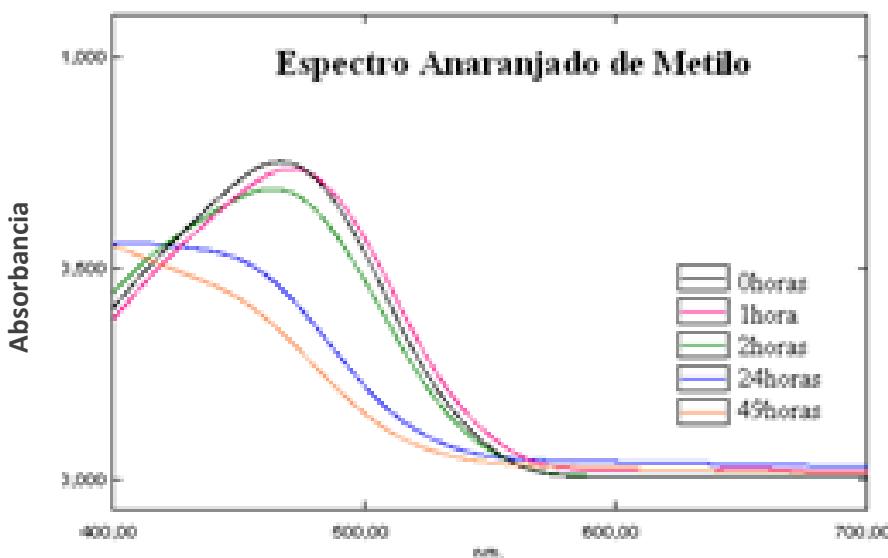


Figura 11: Espectro de absorbancia del colorante Anaranjado de Metilo, durante la decoloración causada por la enzima lacasa (0,5 U/ml) proveniente del hongo *Trametes versicolor*, medido durante 48 h. El máximo de absorción se registró en la longitud de onda de 455 nm.

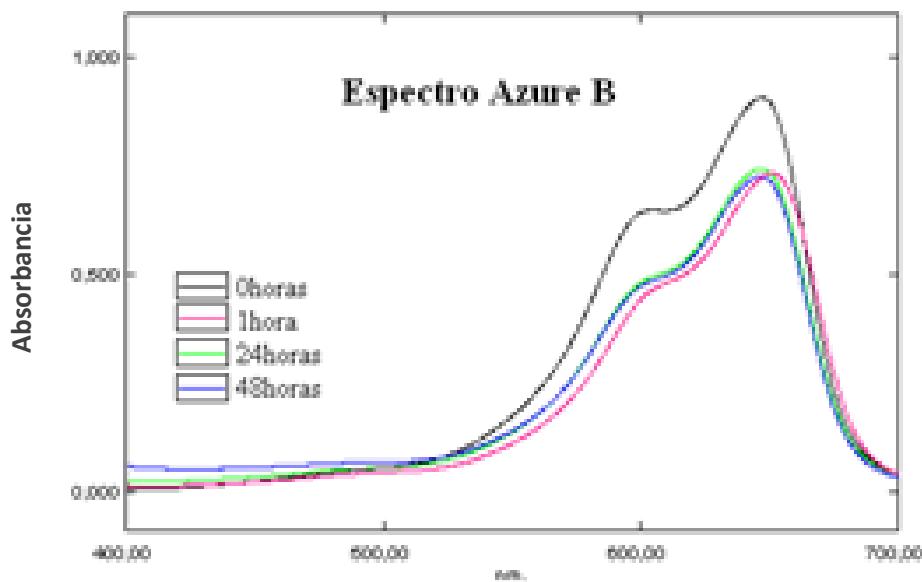


Figura 12: Espectro de absorbancia del colorante Remazol Brillant Blue R, durante la decoloración causada por la enzima lacasa (0,5 U/ml) proveniente del hongo *Trametes versicolor*, medido durante 48 h. El máximo de absorción se registró a los 650 nm.

1.8. Ensayo de decoloración:

La mezcla de reacción estuvo constituida por 3 mL de la solución colorante/buffer y extracto enzimático suficiente para alcanzar 0,5 U de lacasa por mL de la solución. Las muestras se incubaron a 45°C en estufa, durante 48 horas, y se tomaron muestras a distintos tiempos teniendo en cuenta los espectros de decoloración de cada colorante.

La temperatura óptima suele ubicarse entre 40-60°C para la oxidación de compuestos fenólicos (Stoilova et al., 2010). Particularmente, en cepas del género *Trametes* las temperaturas óptimas de acción enzimática oscilan entre 45 y 50°C (Hoegger et al., 2006; Stoilova et al., 2010; Gutiérrez Soto et al., 2011). Con relación al pH, la mayoría de las lacasas fúngicas muestran un rango de actividad óptimo a pH ácido, entre 3,0-4,0; pero esto depende mucho del sustrato fenólico con el cual se valora la actividad. Por ejemplo, el pH óptimo para la oxidación de ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) es generalmente inferior a 4,0, en cambio, compuestos fenólicos como el DMP, guayacol y siringaldazina presentan óptimos más altos de entre 4,0 y 7,0 (Shleev et al., 2004).

La decoloración se siguió espectrofotométricamente midiendo la disminución de la absorción del colorante en su longitud de onda visible máxima a distintos intervalos de tiempo. Los resultados fueron expresados como porcentaje de decoloración.

$$\text{Ecuación 1: } \% \text{ de decoloración} = \frac{\text{Abs } t_0 - \text{Abs } t_n}{\text{Abs } t_n}$$

Donde: **Abs t_0** : Absorbancia a tiempo cero; **Abs t_n** : Absorbancia a tiempo n.

9-Velocidad de decoloración:

Mediante el diferencial de absorbancia entre control y tratamiento y según el tiempo transcurrido (ecuación 2), se calculó la velocidad inicial para una cinética de primer orden (ecuación 3).

$$\text{Ecuación 2: } \text{Velocidad de decoloración}_a = \frac{\text{Abs} (\text{control } t_n) - \text{Abs} (\text{tratamiento } t_n)}{T_n}$$

$$\text{Ecuación 3: } \text{Velocidad de decoloración}_b = y = a \cdot x + b$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1. Efecto de los diferentes medios y condiciones de cultivo en la producción de lacasa por las cepas seleccionadas.

La actividad lacasa (U/mL) de las cuatro cepas crecidas cada una en los cinco medios de cultivo ensayados, se detallan en la **Tabla 3**.

Todas las cepas ensayadas en este trabajo mostraron los valores más altos de actividad lacasa cuando fueron cultivadas en los medios Galhaup y GA. Los medios naturales GAP e YPG permitieron un buen crecimiento del hongo, sin embargo ellos mostraron baja actividad lacasa. Otros autores informaron resultados similares utilizando sustratos naturales lignocelulósicos como aserrín de pino en el medio de cultivo, con el objetivo de estimular la producción de lacasa (Hatakka 1994; Papinutti et al., 2003;). En el medio Czapek sólo se desarrolló *T. villosa* pero con baja productividad de enzima lacasa. Levin y Forchiassin (2001) encontraron que los medios de cultivo conteniendo limitada cantidad de nitrógeno como el medio Czapec, permitieron producir bajas concentraciones de lacasa comparado con el medio GA; en cultivos del hongo *Trametes trogii*.

La técnica de diálisis con sacarosa permitió triplicar la concentración de lacasa de los extractos.

Tabla 3: Concentración de lacasa expresada en U/mL, en los distintos extractos enzimáticos luego de 21 días de incubación y posterior diálisis con sacarosa.

Extractos/ UmL ⁻¹	Medios de Cultivo				
	GA	GALHAUP	YPG	GAP	CZAPEC
<i>Trametes versicolor</i> (UmL ⁻¹)	22 ± 0,4	32 ± 1,1	1 ± 0,1	--	--
<i>Trametes villosa</i> (UmL ⁻¹)	25 ± 1,2	14 ± 0,5	--	--	0,5 ± 0,1
<i>Trametes trogii</i> (UmL ⁻¹)	9 ± 0,9	0,5 ± 0,1	3 ± 0,5	0,3 ± 0,2	--
<i>Coriolus antarcticus</i> (UmL ⁻¹)	4,1 ± 0,6	7 ± 0,5	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,1	--

*Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones.

--: sin actividad.

1.2. Efecto de los extractos enzimáticos en la decoloración de los colorantes seleccionados.

Remazol Brillant Blue R (RBBR)

RBBR es un colorante de la familia de las antraquinonas, es uno de los más utilizados en las industrias textiles y también es tóxico y recalcitrante (Palmieri, et al., 2005; Sumandono et al., 2015).

Mediante el registro de la absorbancia a 609 nm se observó que el tratamiento con lacasa de las cepas *T. versicolor*, *T. villosa* y *Coriolus ver. antarcticus* lograron decolorar más del 80% y hasta un 98% del colorante RBBR en solo 15 minutos (0,25h) (**fig. 13-A**). El extracto de *T. trogii* no tuvo efecto en la decoloración de RBBR. Debido a la rapidez de la degradación, las muestras se tomaron cada cinco minutos, durante 15 minutos (0,25 h).

Las velocidades de decoloración durante el tiempo ensayado, fueron diferentes para los tres extractos, y se representan en la figura **13-B**. Ademas, se muestran las diferencias cuantitativas de las velocidades iniciales, para cada hongo en la **Tabla 4**. Resultados similares informaron Deveci et al (2004), quienes evaluaron la decoloración del RBBR utilizando un cultivo filtrado de *Funalia trogii*, atribuyendo la decoloración a la actividad de la enzima lacasa presente en el medio.

Tabla 4: Velocidades iniciales de decoloración, expresadas mediante la ecuación de la recta de los diferentes colorantes con las cuatro cepas de hongos ensayadas.

	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Trametes villosa</i>	<i>Coriolus ver. antarcticus</i>	<i>Trametes trogii</i>
RBBR	$-50,62x + 13,44$ $R^2 = 0,90$	$-17,8x + 6,70$ $R^2 = 0,97$	$-24,37x + 8,10$ $R^2 = 0,94$	---
VM	$-6,4 x + 0,01$ $R^2 = 0,89$	$-4,0 x + 0,03$ $R^2 = 0,97$	$-2,3 x + 0,11$ $R^2 = 0,88$	$-1,1 x + 0,05$ $R^2 = 0,89$
IC	$-8,2 x + 0,05$ $R^2 = 0,90$	$-2,7 x + 0,12$ $R^2 = 0,90$	$-3,3 x + 0,10$ $R^2 = 0,85$	$-0,01 x + 0,55$ $R^2 = 0,97$
AN	$-2,7 x + 0,12$ $R^2 = 0,86$	$0,01 x + 0,28$ $R^2 = 0,80$	$-1,2 x + 0,06$ $R^2 = 0,82$	---
AzB	$-4,4 x + 0,02$ $R^2 = 0,79$	$-2,8 x + 0,12$ $R^2 = 0,79$	----	---

Remazol Brillant blue (RBBR), Verde de malaquita (VM), Índigo carmín (IC), Anaranjado de metilo (AM) y Azure B (AzBR), (---) sin efecto.

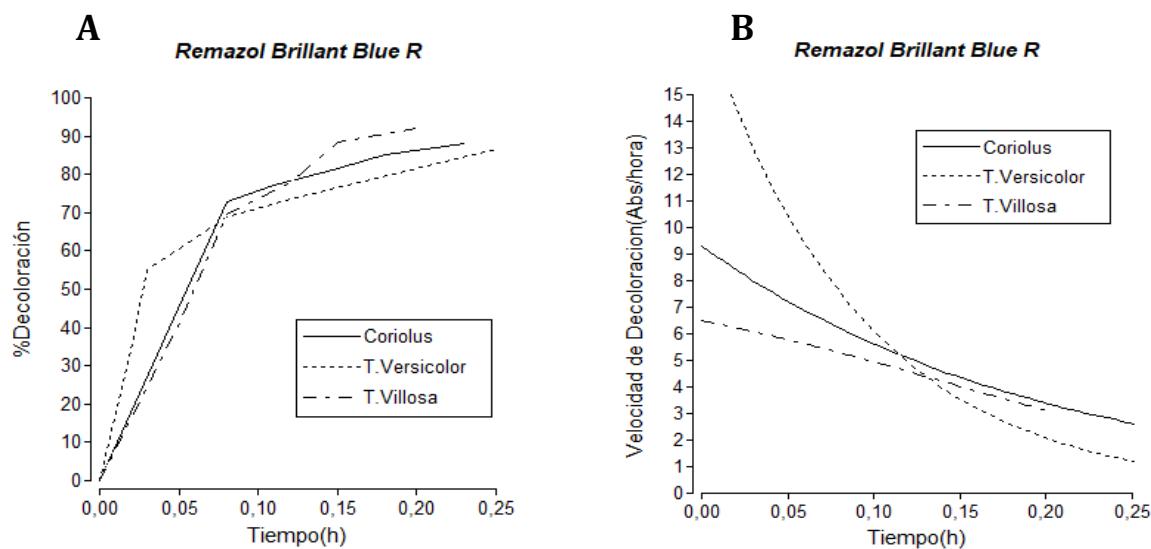


Figura 13: A-Porcentaje de decoloración de RBBR en función del tiempo con lacasa proveniente de tres extractos enzimáticos (*Coriolus ver. antarticus*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). B- Velocidades de decoloración para cada tiempo, del RBBR con lacasa de tres extractos enzimáticos (*Coriolus ver. antarticus*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). Cada experiencia contiene 0,5 U/mL de lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas.

Verde de Malaquita (VM)

El VM, de estructura química trifenilmetanoica, se degrada de la misma forma que lo hace la lignina, mediante enzimas ligninolíticas (Papinutti y Forchiassin, 2004).

En nuestro ensayo, el extracto enzimático de *Trametes versicolor* logró decolorar 93% en 24 horas (**Fig. 14-A**). Ling et al., (2015) utilizando también 0,5 U/mL de lacasa de la cepa *Trametes sp.* informaron un 70% de degradación a las 24 horas de reacción. *Coriolus ver. antarcticus* y *Trametes villosa* pudieron decolorar el 80% del VM a las 48 horas del ensayo; *Trametes trogii* en cambio, degradó hasta un 50% en este tiempo. (**Fig. 14-A**).

Las velocidades de decoloración en el tiempo de reacción, se muestran en la figura **14-B**. La velocidad inicial mostró mayor pendiente utilizando el extracto de *T. Versicolor* luego con menor velocidad le siguió *T. Villosa*. Las cepas de *Coriolus ver. ant.* y *T. trogii* mostraron velocidades mucho menores (**Tabla 4**).

En otros reportes de actividad decolorante sobre VM se necesitaron concentraciones mayores de enzima. Con extractos crudos de *Pleurotus ostreatus* se requirieron 30 U/mL de lacasa para obtener degradación (Hou et al, 2004).

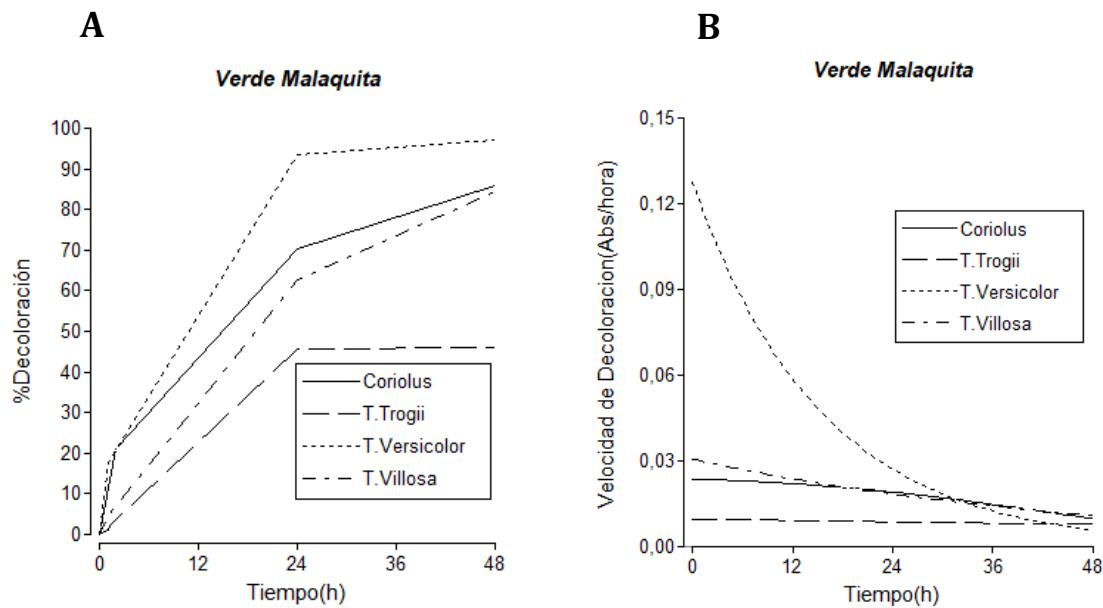


Figura 14 A- Porcentaje de decoloración de VM en función de tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). **B-** : Velocidades de decoloración del VM en función del tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). Cada experiencia contiene 0,5 U/mL de lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas.

Índigo Carmín (IC)

Índigo carmín es un colorante aniónico de la familia de los indigoides. *Trametes versicolor* logró degradar el 99% (**Fig. 15-A**), le siguió *Coriolus ver. antarcticus* y *Trametes trogii* con 90% y luego *Trametes villosa* con 75 % de decoloración en 48 horas (**Fig. 15-A**).

Las diferencias en las velocidades se muestran en la figura **15-B**. La velocidad inicial mostró una alta pendiente en *T. versicolor*, le siguió *Coriolus ver. ant.* y *T. villosa*. *Trametes trogii* mostró velocidad más constante (**Tabla 4**).

Resultados similares se observaron en un estudio donde evaluaron la degradación de este colorante con lacasa proveniente de *Trametes Hirsuta* y *Sclerotium rolfsii* (Campos et al, 2001; Camarero et al, 2005).

La decoloración enzimática de Índigo Carmín (50 mg/L) fue evaluada utilizando lacasa inmovilizada proveniente de *Trametes modesta*, mostrando una degradación del 88% en las primeras 2 h (Kandelbauer et al, 2004).

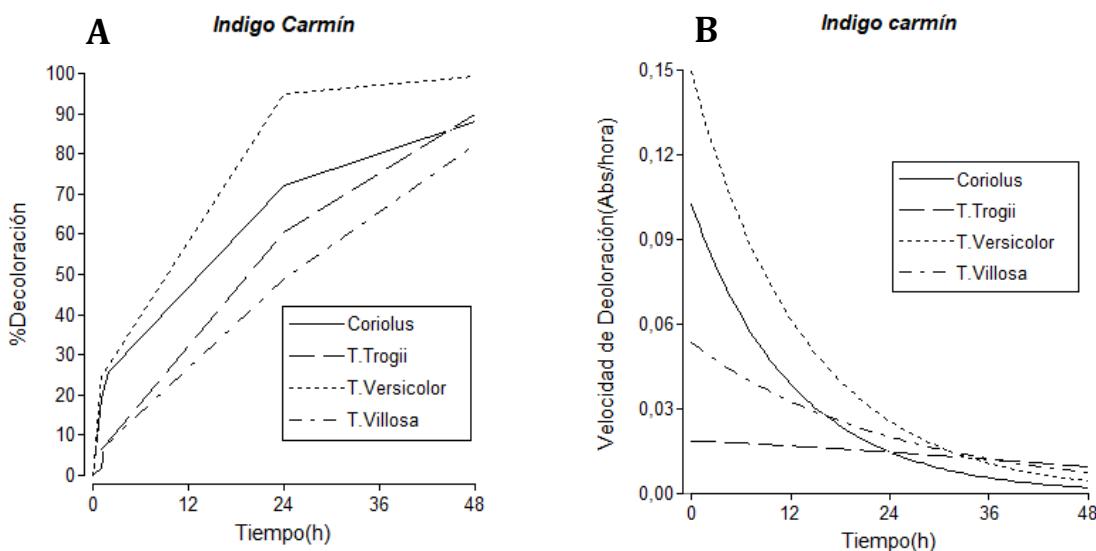


Figura 15: A- Porcentaje de decoloración de IC en función de tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). B- Velocidades de decoloración del IC en función del tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). Cada experiencia contiene 0,5 U/mL de lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas.

Anaranjado de Metilo (AM)

Los compuestos azo constituyen el grupo más grande y más diverso de tintes sintéticos y son ampliamente utilizados en varias industrias tales como textiles, alimentos, cosméticos e impresión en papel. Generalmente son muy recalcitrantes (Pandey, et al., 2007).

AM fue decolorado parcialmente (entre 52 y 79%) por todos los sobrenadantes de cultivo. La lacasa de *Trametes versicolor* produjo mayor decoloración, la cual fue de 79%. Los extractos de *Coriolus antarticus* y *Trametes villosa* degradaron alrededor de

un 65% del colorante azoico. *Trametes trogii* consiguió un 52% de decoloración final (**Fig. 16-A**).

En cuanto a la velocidad, los extractos *Trametes versicolor* y de *Coriolus ver. ant.* mostraron una importante pendiente hasta las 24 h. (**Fig. 16-B**). La velocidad inicial corroboró estas conclusiones (**Tabla 4**).

La lacasa de *Trametes trogii* presentó una velocidad de decoloración baja y se estimó que con mayor tiempo de reacción lograría igualar las decoloraciones de las otras cepas aquí analizadas. Otros trabajos encontraron también que los colorantes azoicos se decoloran menos y más lentamente por los hongos que los colorantes antraquinónicos (Jarosz-Wilkolazka et al, 2002).

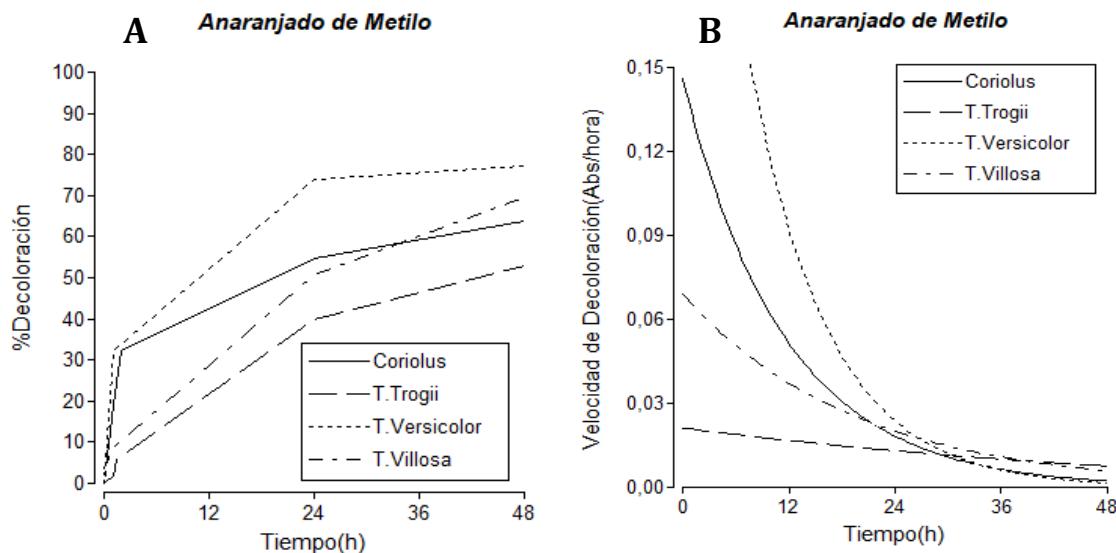


Figura 16: A- Porcentaje de decoloración de AM en función de tiempo con cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarcticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). B- Velocidades de decoloración del AM en función del tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). Cada experiencia contiene 0,5 U/mL de lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas.

Azure B (AzB)

La decoloración obtenida fue alrededor del 10% para todos los extractos, con excepción del *Trametes trogii* que no logró decoloración (**Fig. 17-A**). Las velocidades se ilustran en la **Fig.17-B** y los cálculos de las velocidades iniciales se muestran en la **Tabla 4**. Estudios previos, informaron que utilizando mediadores fenólicos de estructura similar a la lignina, el AzB alcanzó una decoloración casi completa (80 a 100%) (Camarero, et al., 2005).

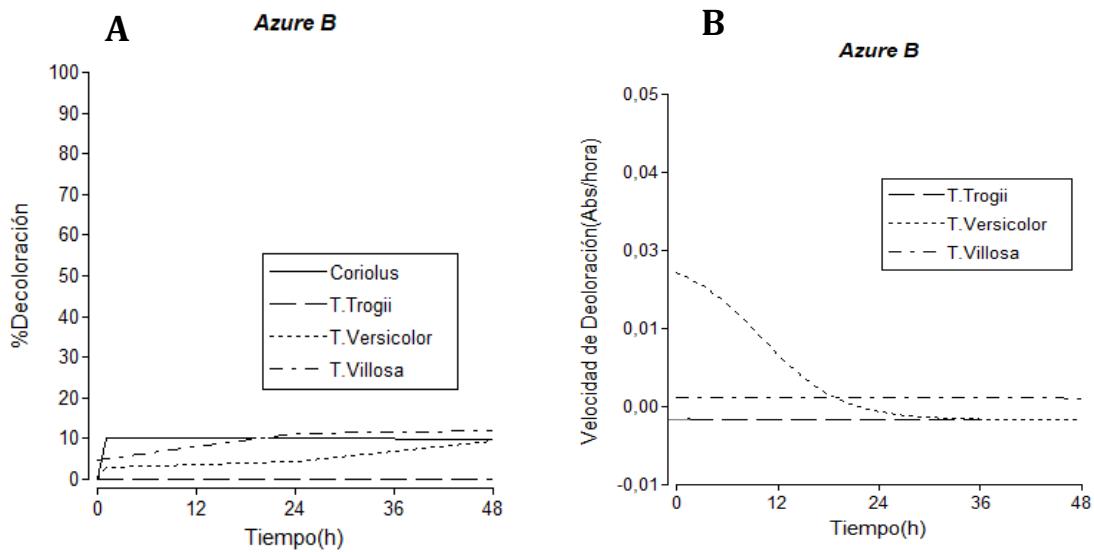


Figura 17: A- Porcentaje de decoloración de AzB en función de tiempo con cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarcticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). B- Velocidades de decoloración del AzB en función del tiempo con lacasa de cuatro extractos enzimáticos (*Coriolus antarticus*, *Trametes trogii*, *Trametes versicolor* y *Trametes Villosa*). Cada experiencia contiene 0,5 U/mlL de lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas.

Análisis comparativo

La **Figura 18** muestra las decoloraciones finales logradas por las tres cepas más sobresalientes de las estudiadas, sobre cada colorante. Se observó que las diferencias entre cepas, no son estadísticamente significativas, en cambio se hallaron diferencias en el efecto sobre el colorante tratado. Se observó una degradación mayor al 70% en todos los colorantes, excepto Azure B que solo decoloró un 10%.

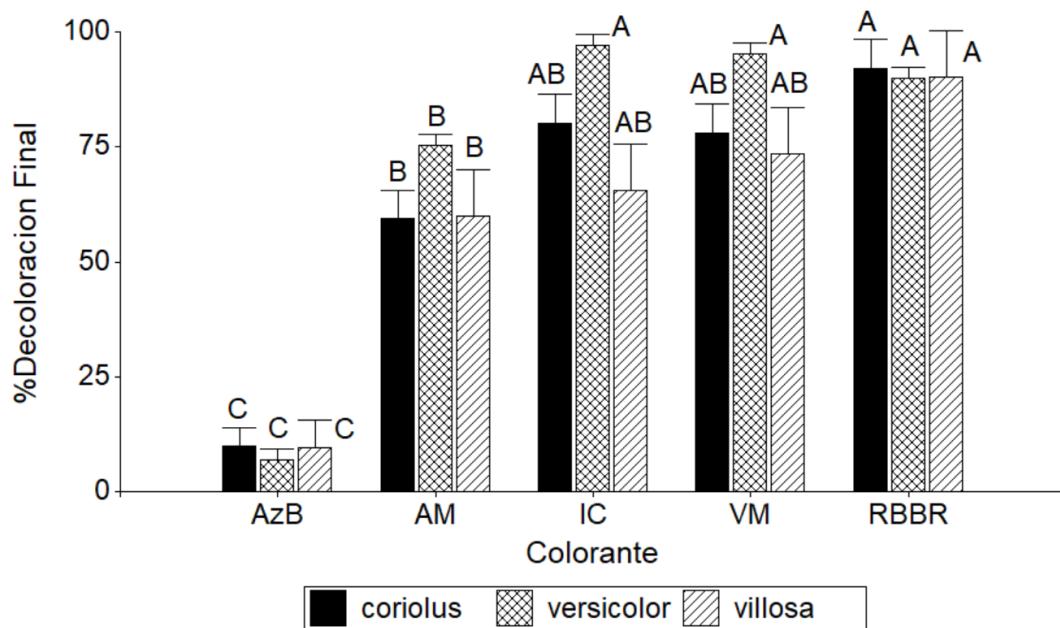


Figura 18: Porcentajes de decoloración final alcanzados por cada colorante (AzB, AM, IC, VM y RBBR) con los diferentes extractos enzimáticos (*Coriolus ver. antarcticus* BAFC 266, *Trametes villosa* BAFC 2755 y *Trametes versicolor* BACF 2234). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según Test de Fisher. Las barras representan la media más el error standar.

CONCLUSIONES PARCIALES

El presente estudio demostró que los hongos de pudrición blanca, tales como *T. versicolor*, *T. villosa*, *T. trogii* y *C. ver. f. antarcticus*, producen lacasa extracelular, en concentraciones que varían según la cepa y el medio de cultivo.

Los medios de cultivo GA y Galhalup obtuvieron los mayores títulos de lacasa para todas las cepas, destacándose la cepa *T. versicolor* en el medio Galhaup con 32 U/mL y *T. villosa* en el medio GA con 25 U/mL.

En relación al proceso de concentrado de proteínas mediante diáisisis con sacarosa, se concluye que es una técnica adecuada para aumentar la concentración de enzimas.

Mediante el ensayo de decoloración, llevado a cabo durante 48 horas a 45 °C, se observó que las enzimas lacasas pudieron degradar más del 80% (y hasta 98%) a todos los colorantes, excepto Azure B que decoloró solo un 10%. Las diferencias entre cepas no fueron significativas sobre el mismo colorante, en cambio sí hubo diferencias entre los colorantes. Los colorantes de estructura antraquinónica (quinonas tricíclicas), indigoica (heterocílicos) y trifenilmetanoica (tres anillos fenilos) mostraron los porcentajes mas alto de degradación (mayor al 90%), posiblemente por tener mayor similitud con la estructura de la lignina. En cambio el colorante azoico (con un grupo funcional azo) mostro valores más bajos de degradación (70%).

Los máximos observados fueron a las 48 horas para los colorantes Verde de Malaquita, Índigo Carmín y Anaranjado de Metilo, y a los 15 min para el colorante Remazol Blue R. La velocidad de la decoloración demostró que la cepa de *T. versicolor* decolora más rápido que las demás, en todos los colorantes.

Las diferencias halladas en el efecto sobre cada colorante podrían deberse a la afinidad enzima-sustrato, ya que hay variación en sus estructuras.

A partir de este estudio se encontró que las cepas de *Trametes villosa* BAFC 2755 y *Trametes versicolor* BACF 2234 producen mayores títulos de lacasa, en comparación con *T. trogii* BAFC 463 y *Coriolus ver.f. antarcticus* BAFC 266, en el mismo medio y condiciones de cultivo.

CAPÍTULO 2

“Evaluación de la estabilidad oxidativa de
aceites vegetales tratados con la caza de
Trametes versicolor”

INTRODUCCIÓN

Los desafíos en la prevención de la rancidez han aumentado en los últimos años debido a la presencia de más ácidos grasos poliinsaturados en los productos alimentarios. Muchos alimentos se preparan con aceites vegetales los cuales contienen una gran cantidad de ácidos grasos insaturados que reaccionan con el oxígeno disuelto generando olores y sabores extraños, disminuyendo la vida útil, alterando la textura y el color y disminuyendo el valor nutricional (Pignitter y Somoza, 2012). Estos productos degradados tienen efectos nocivos en la salud humana (Simopoulos, 1999; Lee et al, 2008). Además, la demanda de los consumidores por los alimentos naturales ha limitado el uso de métodos tradicionales para controlar la oxidación de los lípidos, como los antioxidantes sintéticos y la hidrogenación.

El proceso de oxidación de los lípidos en los alimentos ocurre a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres. La ruta clásica de autooxidación incluye reacciones de iniciación (producción de radicales libres de lípidos), propagación y terminación (producción de productos no radicales). Este proceso comienza con pequeñas cantidades de oxígeno, que es difícil de evitar; sin embargo, se puede controlar o retrasar usando adecuadamente las diferentes técnicas de conservación, combinadas con el uso de antioxidantes (Alamed et al., 2009).

Las prácticas como el envasado al vacío y atmósfera controlada de nitrógeno han sido parcialmente efectivas en la reducción del contenido de oxígeno en los alimentos.

La incorporación de antioxidantes a alimentos es útil para prevenir el deterioro asociado a los lípidos mejorando la estabilidad oxidativa. Entre los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria alimentaria se encuentran el Butil-hidroxianisol (BHA), Butil-Hidroxi-Tolueno (BHT) y Terc-butil-hidroquinona (TBHQ). El uso de estos compuestos está siendo cada vez más cuestionado dado que se le atribuyen efectos negativos sobre la salud (Shahidi & Zhong 2005). Por tal motivo, en los últimos años, ha surgido un interés creciente en el estudio y aplicación de antioxidantes

naturales o la incorporación de componentes naturales no tóxicos para el procesamiento de los alimentos (Waraho y Decker, 2011).

Petersen y Mathiasen (1996) demostraron que la lacasa puede mejorar particularmente los atributos sensoriales de los alimentos con alto contenido de grasas al reducir el oxígeno disponible. Los aceites de semillas prensadas en frío contienen fenoles endógenos, que son el sustrato de la lacasa, en un rango de concentración de 18 a 99 ppm de equivalentes de ácido cafeico (Koski et al., 2003).

El agotamiento de los fenoles intrínsecos en aceites vegetales, catalizados por enzimas exógenas en contacto con el aceite, fue también informado (Silva et al., 2010; De Leonardis y Macciola, 2011).

Para este trabajo se utilizaron aceites de chía, sésamo, girasol y maní, por su alto y variado contenido de ácidos grasos insaturados. La compocision de cada uno se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Composición estimada de los principales ácidos grasos en los aceites vegetales, expresados en porcentaje promedio por peso de aceite.

Ac. Graso	Nomenclatura	Aceite de Girasol	Aceite de Maní	Aceite de Sésamo	Aceite de Chía
Mirístico	C14:0	<0,1	<0,5	<0,1	
Palmítico	C16:0	6%	5%	8%	7%
Palmitolélico	C16:1	<0.5	<1	<0.5	
Esteárico	C18:0	4%	5%	5%	3%
Oléico	C18:1	35%	65%	35%	10%
Linoléico	C18:2	55%	30%	45%	20%
Linolénico	C18:3	<0.7	<1	<1	60 %

Van Niekerk y Burger, 1985; Ullah et al, 2015.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la lacasa fúngica contenida en el extracto de *Trametes versicolor* BACF 2234, sobre la estabilidad oxidativa de aceites frescos de chía, sésamo, girasol y maní, en condiciones controladas de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Aceites vegetales seleccionados

Los aceites vegetales se obtuvieron por prensado en frío a partir de semillas de sésamo, chía, maní y girasol. Se utilizó una prensa hidráulica manual de 20 toneladas. Los aceites prensados en frío contienen niveles más altos de antioxidantes naturales que pueden perderse durante los pasos de refinamiento en el procesado convencional. Además, el prensado en frío no involucra solventes orgánicos, lo que resulta en un producto libre de contaminantes químicos (Singer et al, 2008).

2.2. Extracto enzimático seleccionado

Se utilizó el extracto de *Trametes versicolor* BACF 2234 crecido en el medio “Galhalup” con 32 U mL⁻¹ de lacasa.

2.3. Extracto con lacasa inhibida

Se utilizó azida de sodio 0,1 mM para inhibir la actividad lacasa en el extracto de *T. Versicolor*, con el fin de ser utilizado en las muestras controles.

Johannes et al (2000), evaluaron numerosos inhibidores sobre un extracto de lacasa de *Trametes versicolor*, entre ellos ditiotreitol, ácido tioglicólico, cisteína, ácido dietilditiocarbámico, fluoruro de sodio y azida de sodio. Estos autores encontraron que solo la azida sódica alcanzó la inhibición total de la actividad lacasa de un extracto de *Trametes versicolor*, utilizando 0,1 mM, luego de dos minutos de reacción.

2.4. Estabilidad oxidativa de los aceites

2.4.1. Valor de peróxidos (VP)

Los peróxidos se forman en la fase primaria de oxidación. Es el valor utilizado con mayor frecuencia durante el control de calidad en el proceso de producción de aceites vegetales (Farhoosh et al, 2008). El valor de peróxidos (VP) se determinó de acuerdo con el método establecido por la Asociación de Comunidades Analíticas -AOAC 965.33.

En este caso, se disolvieron 0,025 g de la muestra del aceite en una mezcla de cloroformo-metanol (7: 3) y se agregaron 50 μ L de NH₄SCN y 50 μ L de FeCl₂. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La Absorbancia del complejo rojo se leyó en un espectrofotómetro Shimadzu UV 1800 a 500 nm contra un blanco que contenía todo el reactivo, excepto la muestra. El procedimiento ocurrió en condiciones de poca luz y se completó en 10 min. La cuantificación se refiere a una curva de calibración estándar hecha con FeCl₃. El PV se expresó como miliequivalentes de peróxidos por kilogramo de aceite (meq Px kg⁻¹).

$$\text{Ecuación 1: } VP = \frac{(As - Ab) \times m}{55.84 \times W} \times 2$$

Dónde:

As = absorbancia de la muestra; Ab = absorbancia del blanco; m = pendiente de la curva de calibración; 55,84 = peso atómico de hierro; W = gramos de aceite en la muestra. La multiplicación por el factor 2 es necesaria para expresar el valor de los peróxidos como miliequivalentes de peróxidos en lugar de miliequivalentes de oxígeno.

2.4.2. Dienos conjugados (K232) y trienos conjugados (K270)

Además de la formación de peróxidos, en la fase primaria de oxidación, el reordenamiento de los dobles y triples enlaces de los ácidos grasos origina los dienos y trienos conjugados, respectivamente (Hamilton, 1994). En esta experiencia, se colocó una alícuota (20 μ L) de la mezcla en un matraz volumétrico y se pesó con precisión. Se preparó con 10 ml de hexano y se agitó durante 5 minutos, y luego se registró el espectro de absorción (Antolin y Meneses, 2000). Los resultados se expresaron como coeficientes de extinción específicos, este cálculo se realiza a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 2: } K_\lambda = \frac{A_\lambda}{b.c.}$$

Donde:

K_λ = coeficiente de extinción específica a la longitud de onda de 232 y 270 nm.

A_λ = absorbancia leída en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 232 y 270 nm.

c= concentración de aceite en la disolución en g/100 mL.

b= espesor en cm de la cubeta.

2.5. Diseño experimental

Las muestras tratadas con lacasa (LAC) contenían 3 mL de aceite vegetal y 100 μ L de extracto enzimático de *Trametes versicolor* BACF 2234 (32 U mL^{-1}) con 100 μ L de buffer citrato-fosfato pH 5, para favorecer la actividad de la enzima (Thurston 1994; Morozova et al., 2007b). Las muestras control (fresco) se prepararon del mismo modo, excepto que se utilizó el extracto inhibido (punto 2.3).

Según las condiciones de reacción, se plantearon dos tratamientos:

-**Tratamiento 1 “condiciones ambientales”**: las muestras se incubaron a temperatura ambiente de 28 °C durante 18 días; En condiciones estáticas y de oscuridad, tapadas. Además se evaluó la presencia/ausencia de oxígeno atmosférico (aire) con fines analíticos sobre la acción de la enzima.

-**Tratamiento 2 “condiciones aceleradas”**: las muestras se mantuvieron en un horno a 60 °C durante 72 horas. Hipotéticamente, un día a 60–65 °C debe corresponder a un mes de almacenamiento a temperatura ambiente de un aceite vegetal (Abou-Gharbia et al., 1996).

2.6 Análisis estadístico

El conjunto de determinaciones analíticas se realizó por triplicado. Todos los datos se presentan como medias \pm DE y se obtuvieron con el software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2017). La diferencia entre medias fue realizada por ANOVA. El nivel de significancia estadística fue aceptado en $P \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

2.1. Valor de peróxidos (VP)

2.1.1. Tratamiento 1

Los valores de peróxido observados en los aceites vegetales se recogieron en la **Tabla 6**. Como se puede observar, el aumento en los valores de peróxidos fue gradual hasta el día 11 y fue significativo en el día 18, para las muestras tratadas y no tratadas.

En cuanto al efecto de la enzima, el valor de peróxidos aumentó sorprendentemente. Las diferencias entre LAC y Fresco fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) desde el día 18 de reacción.

En detalle, en las muestras con lacasa la cantidad de peróxidos estuvo entre 8 y 17 mEqPx Kg⁻¹ el día 18, mientras que en los aceites frescos, los valores estuvieron entre 7 y 14 mEqPx Kg⁻¹ aprox.

El aceite de chía mostró los valores de peróxidos más altos, estos fueron 13,9 y 16,7 mEqPx Kg⁻¹ en Fresco y LAC, respectivamente. Esto puede deberse a su alto contenido de ácido linolénico (C18: 3) (60% de los ácidos grasos totales) que confiere susceptibilidad a la oxidación (Ullah et al, 2015).

El efecto de la ausencia de oxígeno, mediante aplicación de vacío, también se determinó en este tratamiento. Las muestras LAC y Fresco no mostraron diferencias significativas en el valor de peroxidos con respecto a ellas en presencia de oxígeno (**Tabla 6**).

Otros autores también encontraron resultados contrarios a los esperados. Ellos estudiaron la oxidación del ácido linoléico en presencia de lacasa y ácidos p-hidroxicinámicos, sinapico, ferúlico y p-cumarico, que son sustratos de la enzima y también antioxidantes potentes, sin embargo, los resultados mostraron que el ácido p-cumarico tiene una alta capacidad para peroxidar lípidos insaturados una vez que es oxidado por la lacasa (Camarero et al, 2008).

Tabla 6. Valor de Peroxidos (mEqPx Kg^{-1}) en aceites vegetales tratados con lacasa (LAC) y sus controles correspondientes (Fresco).

Aceites	Muestras	Días			
		0	3	11	18
Chía	LAC c/aire (mEqPx Kg^{-1})	$2,1 \pm 0,4^{\text{a}}$	$3,3 \pm 0,7^{\text{a}}$	$5,4 \pm 0,6^{\text{a}}$	$16,7 \pm 0,1^{\text{a}}$
	LAC s/aire (mEqPx Kg^{-1})	$1,9 \pm 0,1^{\text{a}}$	$2,9 \pm 0,2^{\text{a}}$	$5,3 \pm 0,8^{\text{a}}$	$15,8 \pm 0,5^{\text{a}}$
	Fresco c/aire(mEqPx Kg^{-1})	$1,9 \pm 0,2^{\text{a}}$	$2,3 \pm 0,3^{\text{a}}$	$4,8 \pm 0,1^{\text{a}}$	$12,9 \pm 0,9^{\text{b}}$
	Fresco s/aire(mEqPx Kg^{-1})	$1,9 \pm 0,2^{\text{a}}$	$2,2 \pm 0,3^{\text{a}}$	$4,2 \pm 0,4^{\text{a}}$	$12,0 \pm 0,9^{\text{b}}$
Girasol	LAC c/aire (mEqPx Kg^{-1})	$1,5 \pm 0,4^{\text{a}}$	$1,7 \pm 0,1^{\text{a}}$	$3,2 \pm 0,1^{\text{a}}$	$8,1 \pm 0,4^{\text{a}}$
	LAC s/aire (mEqPx Kg^{-1})	$1,5 \pm 0,3^{\text{a}}$	$1,6 \pm 0,5^{\text{a}}$	$3,0 \pm 0,3^{\text{a}}$	$7,8 \pm 0,3^{\text{a}}$
	Fresco c/aire(mEqPx Kg^{-1})	$1,2 \pm 0,6^{\text{a}}$	$1,4 \pm 0,1^{\text{a}}$	$2,7 \pm 0,1^{\text{a}}$	$6,8 \pm 0,3^{\text{b}}$
	Fresco s/aire(mEqPx Kg^{-1})	$1,2 \pm 0,4^{\text{a}}$	$1,4 \pm 0,1^{\text{a}}$	$2,7 \pm 0,1^{\text{a}}$	$7,0 \pm 0,3^{\text{b}}$
Maní	LAC c/aire (mEqPx Kg^{-1})	$3,5 \pm 0,3^{\text{a}}$	$4,6 \pm 0,1^{\text{a}}$	$5,3 \pm 0,5^{\text{a}}$	$11,1 \pm 0,5^{\text{a}}$
	LAC s/aire (mEqPx Kg^{-1})	$3,5 \pm 0,1^{\text{a}}$	$4,4 \pm 0,1^{\text{a}}$	$5,2 \pm 0,5^{\text{a}}$	$10,9 \pm 0,4^{\text{a}}$
	Fresco c/aire(mEqPx Kg^{-1})	$3,3 \pm 0,5^{\text{a}}$	$4,2 \pm 0,1^{\text{a}}$	$5,1 \pm 0,5^{\text{a}}$	$9,7 \pm 0,3^{\text{b}}$
	Fresco s/aire(mEqPx Kg^{-1})	$3,4 \pm 0,4^{\text{a}}$	$4,0 \pm 0,1^{\text{a}}$	$5,0 \pm 0,5^{\text{a}}$	$9,2 \pm 0,3^{\text{b}}$
Sésamo	LAC c/aire (mEqPx Kg^{-1})	$4,0 \pm 0,4^{\text{a}}$	$6,6 \pm 0,1^{\text{a}}$	$8,5 \pm 0,4^{\text{a}}$	$11,8 \pm 0,6^{\text{a}}$
	LAC s/aire (mEqPx Kg^{-1})	$3,7 \pm 0,1^{\text{a}}$	$6,6 \pm 0,2^{\text{a}}$	$8,1 \pm 0,9^{\text{a}}$	$10,4 \pm 0,2^{\text{a}}$
	Fresco c/aire(mEqPx Kg^{-1})	$3,5 \pm 0,1^{\text{a}}$	$6,4 \pm 0,3^{\text{a}}$	$8,1 \pm 0,1^{\text{a}}$	$10,0 \pm 0,2^{\text{b}}$
	Fresco s/aire(mEqPx Kg^{-1})	$3,5 \pm 0,1^{\text{a}}$	$5,9 \pm 0,3^{\text{a}}$	$7,8 \pm 0,1^{\text{a}}$	$9,5 \pm 0,2^{\text{b}}$

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Leyendas: LAC c/aire, aceite con lacasa y con aire; LAC s/aire, aceite con lacasa y sin aire; Fresco c/aire, aceite sin lacasa con aire; Fresco s/aire, aceite sin lacasa y sin aire.

Cada muestra "LAC" contenía $3,2 \text{ U mL}^{-1}$ de lacasa de *Trametes versicolor*

El ANOVA fue entre LAC y Fresco (c /aire y s / aire) en cada aceite y cada tiempo.

2.1.2. Tratamiento 2

Los resultados relativos al valor de peróxidos en las condiciones de oxidación acelerada llevadas a cabo a 60 ° C y 72 h se expresan en la **Figura 19**.

Las muestras con la enzima mostraron valores de peróxidos más altos, con diferencias significativas ($p \leq 0,05$) a las 72 h, para los aceites de chia, girasol y mani. Los aceites de chia y girasol mostraron la mayor pendiente de oxidación en las condiciones de reaccion acelerada, versus mayor estabilidad en los aceites de mani y sesamo, sin embargo estos ultimos iniciaron con mayor valor de peróxidos.

De Leonardis et al, informaron en 2013 sobre el efecto de la lacasa en la estabilidad oxidativa del aceite de oliva y el papel de los fenoles endógenos en el proceso de oxidación de estos aceites. Ellos descubrieron que el aceite de oliva con lacasa tenía una menor resistencia a la oxidación en temperaturas más altas, como consecuencia del agotamiento parcial de los polifenoles endógenos; en comparación con el mismo aceite a temepratura ambiente. Sin embargo, la estabilidad oxidativa fue aún menor en los aceites con lacasa que en los aceites químicamente desfenolizados. Estos autores sugirieron que la presencia de radicales fenoxilos recién formados en aceites tratados con lacasa podría promover un efecto prooxidante, por un mecanismo de radicales libres. Además estos autores cuestionan el papel antioxidante atribuido a los polifenoles de los alimentos.

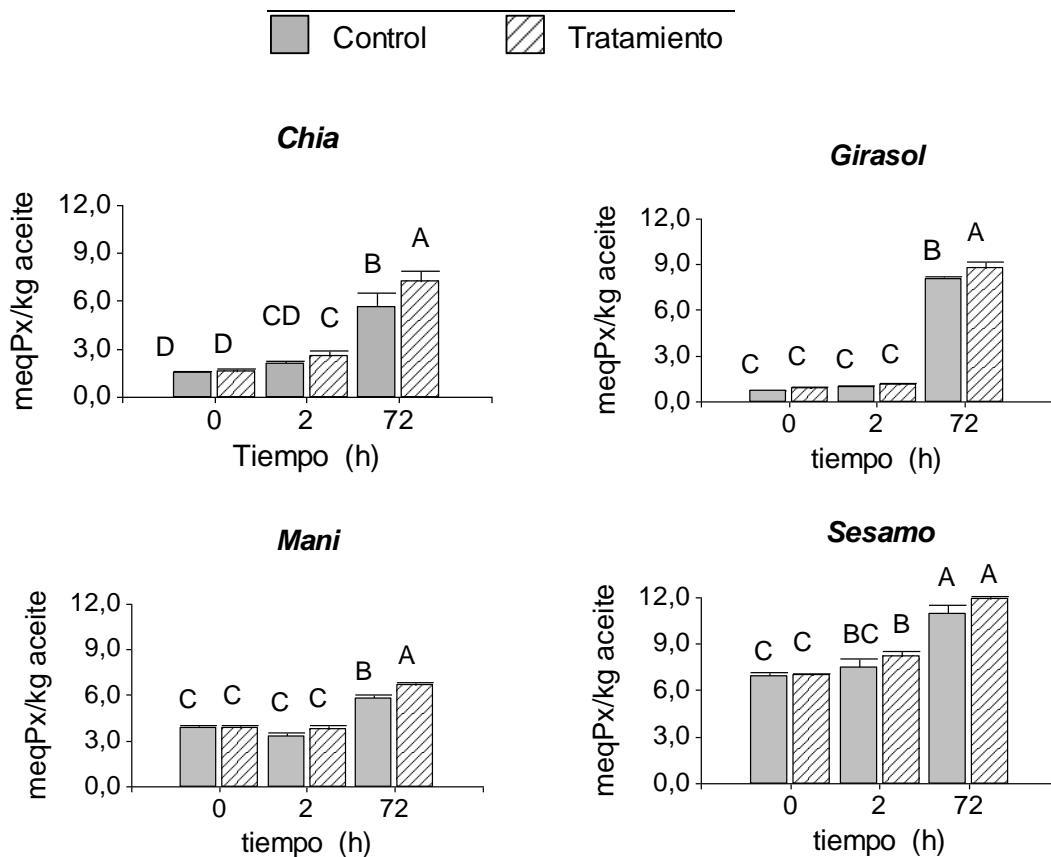


Figura 19: Valor de Peróxidos en aceites vegetales tratados con lacasa y sus controles correspondientes en un periodo de reacción de 72 hs, a 60 °C. Los datos representan la media de tres repeticiones y las barras representan el error. Cada muestra tratada contenía 3,2 U mL⁻¹ de lacasa de *Trametes versicolor*. Diferente letra indica diferencias significativas ($p < 0,05$) según Test de Fisher.

2.2. Dienos conjugados (K232) y Trienos conjugados (K270)

2.2.1. Tratamiento 1

La evolución de la oxidación a 28 °C a través de los coeficientes de extinción específicos a 232 nm y 270 nm se muestra en la **tabla 7** y la **tabla 8**, respectivamente.

Tabla 7: Evolución de los dienos conjugados (K232) en aceites vegetales (chia, girasol, maní, sésamo) tratados con lacasa (LAC) y sus controles correspondientes (fresco), almacenados durante 18 días a 28 °C.

Aceites	Muestras	Días			
		0	3	11	18
Chía	LAC (K232)	1,3 ± 0,4 ^a	1,3 ± 0,5 ^a	1,4 ± 0,6 ^a	4,7 ± 0,1 ^a
	Fresco(K232)	1,2 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,3 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	3,5 ± 0,9 ^b
Girasol	LAC (K232)	0,8 ± 0,4 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	2,2 ± 0,1 ^a	4,3 ± 0,5 ^a
	Fresco (K232)	0,8 ± 0,6 ^a	0,9 ± 0,2 ^a	1,9 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,3 ^b
Maní	LAC (K232)	1,5 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,5 ^a	2,7 ± 0,6 ^a
	Fresco (K232)	1,4 ± 0,4 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	1,8 ± 0,5 ^a	2,0 ± 0,3 ^b
Sésamo	LAC (K232)	1,8 ± 0,2 ^a	2,1 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,4 ^a	3,8 ± 0,6 ^a
	Fresco (K232)	1,7 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,3 ^a	2,8 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,2 ^b

Letras diferentes en la misma columna, por cada tipo de aceite, indican una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) segun test de Fisher. Leyenda: LAC, aceite con lacasa; Fresco, aceite fresco. Cada muestra "LAC" contenía 3,2 U mL⁻¹ de lacasa de *Trametes versicolor*.

Tabla 8: Evolución de los trienos conjugados (K270) en aceites vegetales (chia, girasol, maní, sésamo) tratados con lacasa (LAC) y sus controles correspondientes (fresco), almacenados durante 18 días a 28 °C.

Aceites	Muestras	Días			
		0	3	11	18
Chia	LAC (K270)	0,4 ± 0,05 ^a	0,7 ± 0,07 ^a	1,0 ± 0,3 ^a	1,7 ± 0,2 ^a
	Fresco (K270)	0,4 ± 0,04 ^a	0,6 ± 0,06 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,4 ^b
Girasol	LAC (K270)	0,2 ± 0,05 ^a	0,3 ± 0,05 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,3 ^a
	Fresco (K270)	0,2 ± 0,04 ^a	0,2 ± 0,04 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,2 ^b
Maní	LAC (K270)	0,1 ± 0,06 ^a	0,1 ± 0,05 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,6 ^a
	Fresco (K270)	0,1 ± 0,05 ^a	0,1 ± 0,03 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,2 ^b
Sésamo	LAC (K270)	0,1 ± 0,02 ^a	0,3 ± 0,06 ^a	0,6 ± 0,6 ^a	1,9 ± 0,4 ^a
	Fresco (K270)	0,1 ± 0,03 ^a	0,2 ± 0,05 ^a	0,4 ± 0,5 ^a	1,3 ± 0,2 ^b

Letras diferentes en la misma columna, por cada tipo de aceite, indican una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) segun test de Fisher. Leyenda: LAC, aceite con lacasa; Fresco, aceite fresco. Cada muestra "LAC" contenía 3,2 U mL⁻¹ de lacasa de *Trametes versicolor*

K232 mostró valores más altos en las muestras con la enzima. Las diferencias fueron significativas el día 18, como fue el caso de los peróxidos. Los aceite de chía y girasol, mostraron la mayor alteración sobre este coeficiente; en detalle, estos fueron 4,7 y 4,3 respectivamente. Esto podría explicarse por el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en estos aceites, que son 90% para el aceite de girasol y 80% para el aceite de chía, aproximadamente (Chowdhury et al, 2007; Ullah et al, 2015).

Otros autores midieron la relación entre la composición de los ácidos grasos, VP y K232 durante la oxidación de varios aceites de girasol y encontraron una pendiente más baja para el aceite con un menor grado de insaturación (Marmesat et al, 2009).

K270 también mostró un mayor aumento en las muestras con la enzima, con diferencias significativas hacia el día 18 (Tabla 8). El aceite de sésamo obtuvo los valores más altos de trienos conjugados en LAC (1,9 ± 0,4).

2.2.2. Tratamiento 2

Los datos experimentales de la prueba de horno a 60 ° C, relativo a dienos y trienos conjugados, se analizaron de acuerdo con la ecuación 2 y se ilustran en la **figura 20** y **figura 21** respectivamente.

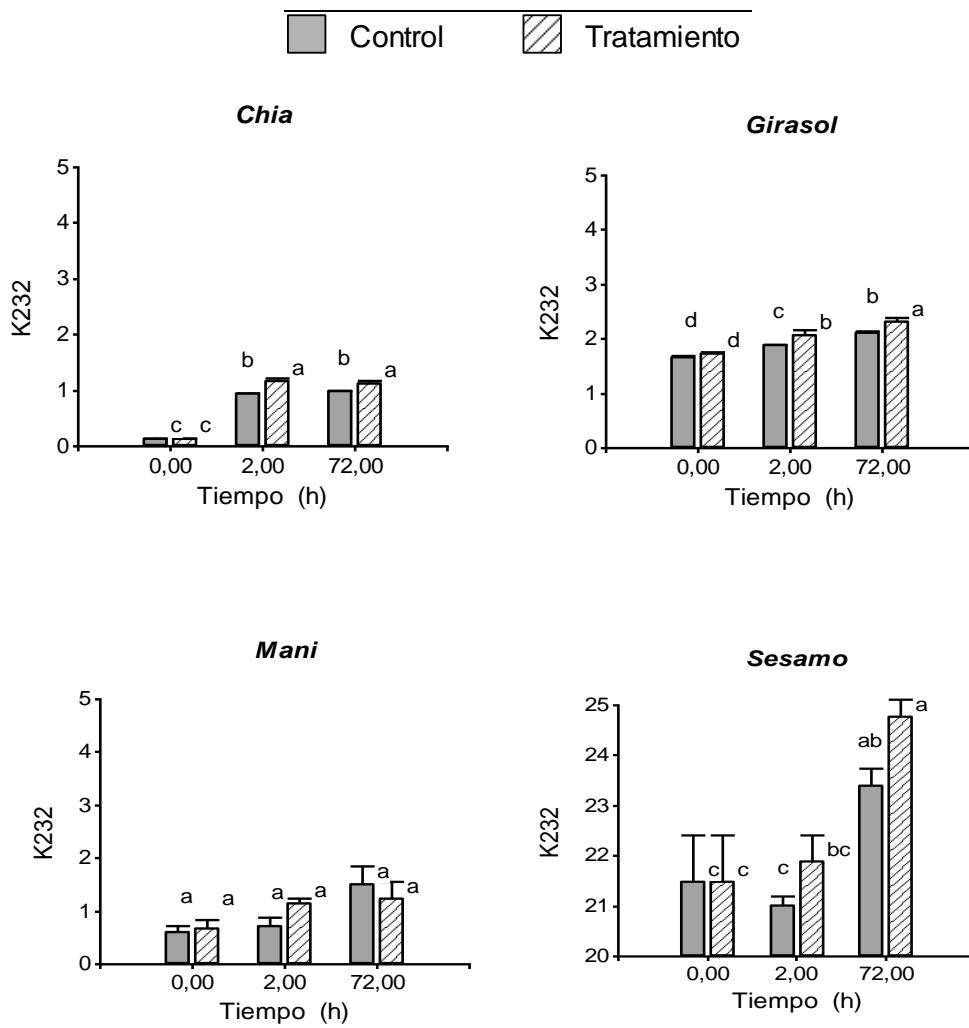


Figura 20: Dienos conjugados (K232) en aceites vegetales (chía, girasol, maní, sésamo) tratados con lacasa y sus controles correspondientes, almacenados durante 72 horas a 60 °C. Las letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) de acuerdo con la prueba de Fisher. Los resultados se basan en mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media.

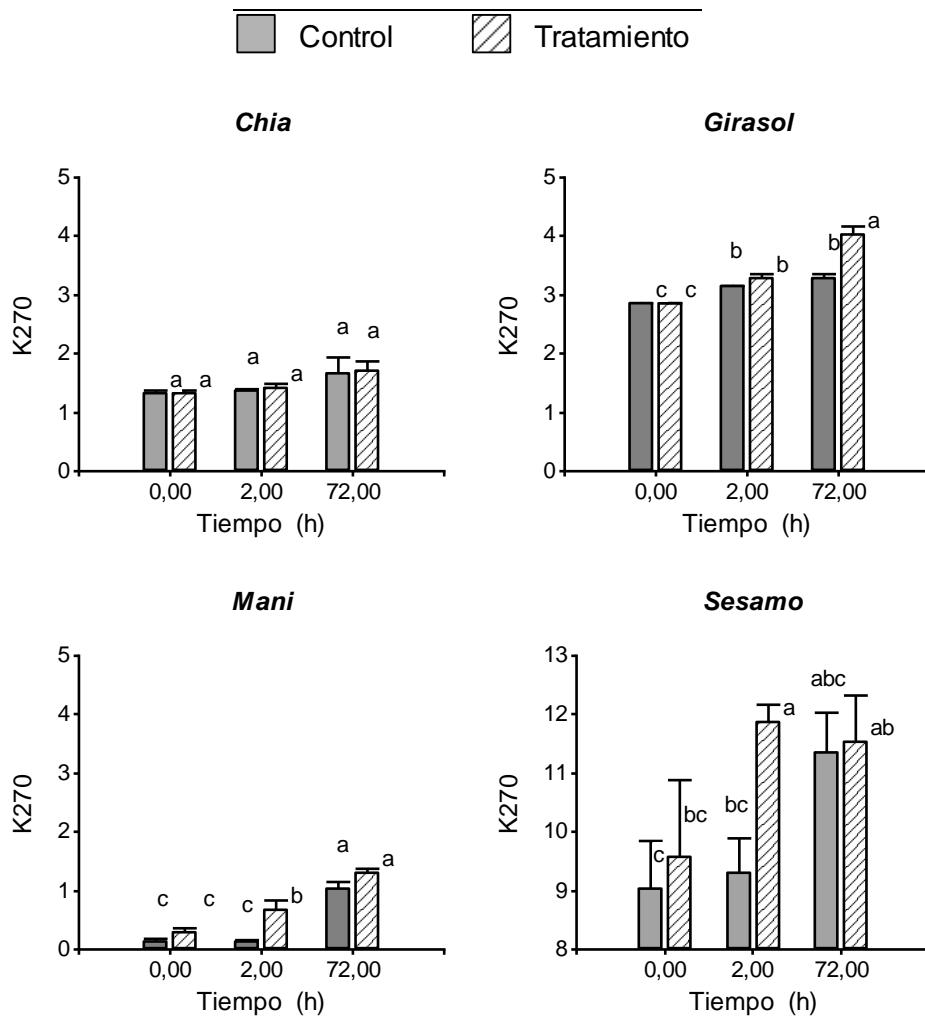


Figura 21: Trienos conjugados (K270) en aceites vegetales (chía, girasol, maní, sésamo) tratados con lacasa y sus controles correspondientes, almacenados durante 72 horas a 60° C. Las letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) de acuerdo con la prueba de Fisher. Los resultados se basan en mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media.

El aumento de dienos conjugados fue mayor en las muestras tratadas con la enzima y las diferencias fueron estadísticamente significativas en los aceites de chía y girasol después de 2 h de reacción ($p \leq 0,05$). Sin embargo, el aceite de sésamo mostró los coeficientes más altos a 232 nm (> 21), lo que sugiere que tiene una baja resistencia al almacenamiento a altas temperaturas (figura 15).

La formación de trienes conjugados (K270) mostró la misma tendencia que para K232 (figura 16). Esto confirmó el efecto negativo de la lacasa sobre la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales.

Petersen y Mathiasen (1999) demostraron que la enzima lacasa es efectiva para extraer el oxígeno disuelto en alimentos con alto contenido de aceites vegetales, sin embargo, estos autores no midieron el efecto directo sobre la estabilidad oxidativa de los aceites, es decir los productos de la oxidación.

CONCLUSIONES PARCIALES

Contrariamente a lo esperado, la enzima lacasa fúngica aumentó los niveles de los indicadores de oxidación en todos los aceites evaluados:

En condiciones ambientales, el valor de peróxidos aumentó en todos los aceites tratados con lacasa, con diferencias significativas a partir del día 18 de almacenamiento. En condiciones aceleradas de reacción (60 °C), las mismas diferencias se observaron a partir de las 72 h.

La presencia de dienos y trienos fue mayor en las muestras con lacasa, en ambas condiciones de estudio y para todos los aceites. Las diferencias fueron significativas el día 18, como fue el caso de los peróxidos. Los aceite de chía y girasol, mostraron la mayor alteración sobre estos coeficientes, posiblemente debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados.

Los resultados del estudio de la presencia/ausencia de oxígeno permiten inferir que la oxidación observada podría estar promovida por una ruta distinta al oxígeno del aire y relacionada con los fenoles oxidados por la enzima.

El estudio con la aplicación de vacío para retirar el oxígeno del aire, afirmó los resultados obtenidos en este estudio, en relación a la baja implicancia del oxígeno en la oxidación de los aceites vegetales, en comparación con el aparente papel de los radicales libres derivados de la oxidación de los fenoles por parte de la lacasa.

CAPITULO 3

“Efecto de la caza de *T. villosa* en el procesado
de Jugos de fruta”.

INTRODUCCION

La tendencia de bienestar en muchos países ofrece un gran potencial para el aumento del mercado de los jugos, debido a los beneficios bien conocidos asociados al consumo de zumos de frutas (Bharate y Bharate, 2014).

La producción de jugos de frutas a nivel internacional, busca maximizar la preservación de las características sensoriales y nutricionales mediante un menor uso de productos químicos exógenos, temperaturas de procesos más bajas (reduciendo el daño térmico al alimento) y diseño más simple del proceso. Entre los productos químicos utilizados en la industria de jugos de fruta con riesgo para la salud se encuentran los sulfitos. Los sulfitos incluyen varios aditivos inorgánicos que contienen dióxido de azufre (SO_2). Estos conservantes se emplean para controlar la proliferación de microbios en bebidas fermentadas y su uso ha sido generalizado durante más de 2000 años en vinos, cervezas y productos transformados a base de frutas. En personas sensibles (asmáticos), los sulfitos pueden provocar asma, que se caracteriza por las dificultades respiratorias, la respiración entrecortada, la sibilancia y la tos (Moneret et al, 2002). También dermatitis, dolor de cabeza, irritación del tracto gastrointestinal, urticarias, exacerbación del asma e incluso shock anafiláctico, y en el caso del trastorno metabólico hasta lesiones oculares y daño cerebral grave (Marenco Arellano et al, 2011).

Las tendencias actuales indican un uso decreciente de colorantes y sulfitos. Además, las sales de eritorbato (isómero del ácido ascórbico) han desplazado en parte a los nitratos y nitritos; el beta-caroteno ha sustituido a otros carotenoides y la etil-vainilla ha sustituido a los extractos de vainilla. El uso de aditivos alimentarios artificiales es un hecho indiscutible pero a su vez controvertido. Ello hace que, en la práctica, la innovación sea en el campo de los aditivos naturales, esto además acompaña la progresiva implantación de los llamados *productos mínimamente procesados* (Duran, 2001).

Hay muchos antecedentes respecto del uso de enzimas en la industria alimenticia, las cuales son componentes naturales consideradas como no tóxicos, de allí que son preferidas por los consumidores en el procesamiento de los alimentos frente a los tratamientos con reactivos químicos (Aehle, 2007).

Los preparados enzimáticos se han estudiado desde la década de 1930 para la clarificación del jugo (Minussi et al., 2007b). Durante el procesamiento de los jugos, los tejidos vegetales se desintegran y se liberan cantidades importantes de pectinas, las cuales son capaces de formar geles viscosos. Las primeras enzimas empleadas en la industria de jugos de frutas, fueron las pectinonas, las cuales se añaden con la finalidad de facilitar el filtrado y la clarificación del producto, seguido de ultrafiltración (Del Moral et al., 2015). Varios estudios han informado acerca del efectivo aclaramiento de jugos de frutas utilizando el tratamiento enzimático con pectinonas (Grassin y Fauquembergue, 1996; Alvarez et al., 1998; Vaillant et al., 1999; Kashyap et al., 2001). Sin embargo las pectinonas liberan alcohol metílico; por ello, quienes los consumen regularmente podrían estar ingiriendo un producto tóxico durante gran parte de su vida. (Camperi et al., 1996).

Por otro lado, los jugos ultrafiltrados no son siempre estables, más bien tienden a producir una nueva turbidez durante el almacenamiento, causada por los fenoles reactivos que no han podido ser retenidos por la membrana filtrante (Stutz, 1999).

Los polifenoles en los jugos de frutas son una fuente natural de antioxidantes, y son responsables de los beneficios de salud reportados (Pandey y Rizvi, 2009). Sin embargo, los mismos compuestos son también los principales factores involucrados en el proceso de maderización causando turbidez, intensificación del color, aroma y alteración del sabor y formación de neblina o sedimentos, que afectan el producto final, la vida útil y percepción del consumidor (Agcam et al., 2014).

Los polifenoles en los jugos de frutas se polimerizan, a través de reacciones oxidativas, en moléculas más grandes que precipitan de la solución y dan turbidez, este fenómeno ocurre mediante una polifenol-oxidasa (PFO) presente naturalmente en las frutas. Estas reacciones modifican las características organolépticas y nutricionales del alimento depreciando su calidad (McEvily et al., 1992; Friedman, 1996; Sanchez-

Ferrer et al., 1995). La actividad de la PFO presente en frutas y vegetales, puede ser inhibida por calentamiento o por remoción de alguno de sus componentes necesarios: O₂, enzima, Cu²⁺ o sustrato, es decir polifenoles (Guerrero-Beltrán et al., 2005).

Alternativamente, los polifenoles también pueden formar complejos con otras macromoléculas tales como proteínas, almidón e iones metálicos divalentes, que se traducen a su vez en turbidez o neblina en los productos, por ello es necesario reducir el contenido fenólico por debajo de cierto nivel para evitar la formación de turbidez (Schobinger et al., 1995)

La investigación se ha abocado a encontrar formas efectivas y económicas de reducir este fenómeno; y en este sentido, las enzimas han ganado importancia. Entre las enzimas útiles en este proceso, distintos autores han propuesto el uso de lacasas como agentes estabilizadores, debido a su capacidad de oxidar la mayoría de los fenoles presentes en los jugos, causando su polimerización y en consecuencia facilitando su remoción (Lettera et al., 2016; Bezerra et al., 2015; Gassara-Chatti et al., 2013; Pezzella et al., 2015; Neifar et al., 2011).

Un pretratamiento enzimático de hiperoxidación del jugo crudo con lacasa y pectinasa ha sido introducido en un paso previo a la ultrafiltración como una alternativa al tratamiento con adsorbentes. (Liew Abdullah et al., 2007).

Para este trabajo, se seleccionó el extracto enzimático de *Trametes villosa* BAFC 2755 crecido en el medio sintético GA, por contener alta concentración de lacasa (25 Uml⁻¹).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Valorar el contenido de polifenoles totales en jugos de manzana, pera y naranja tratados con lacasa contenida en el extracto de *Trametes villosa* BAFC 2755.
- Determinar el efecto de la lacasa contenida en el extracto de *Trametes villosa* BAFC 2755 sobre el color de jugos de manzana, pera y naranja.
- Evaluar el efecto sobre la turbidez de jugos de manzana, pera y naranja tratados con lacasa de *Trametes villosa* BAFC 2755.

MATERIALES Y METODOS

3.1. Extracto enzimático seleccionado

En base a los resultados obtenidos en el capítulo 1, se seleccionó para este trabajo el extracto de *Trametes villosa* BAFC 2755 crecido en el medio sintético GA que contenía 25 U de lacasa por mL de extracto.

3.2. Jugos de Fruta seleccionados

Los jugos sometidos a tratamiento fueron: jugo de manzana, jugo de pera y jugo de naranja. Se seleccionaron manzanas var. *Red delicius*, peras var. *Roma* y naranjas var. *Citrus cinensis* del mercado local, el día anterior a la elaboración del jugo. Los criterios de muestreo fueron: madurez homogénea y sin rastros de deterioro. Las frutas fueron lavadas y peladas, y el jugo se obtuvo mediante una juguera eléctrica. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min recuperándose el sobrenadante que luego se filtró utilizando un filtro de nitrato de celulosa 1,2 µm.

3.3. Diseño experimental

Cada muestra estuvo constituida por 4 mL de jugo (de manzana, de pera o de naranja), diluidos 1:3 con buffer citrato/fosfato pH 4,6 recién preparado, con la cantidad adecuada de enzima proveniente de la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755. Para la medición de fenoles totales, se trabajó con tres concentraciones de lacasa por ml de Jugo: 0,6 U/ml, 0,9 U/ml y 1,2 U/mL. La medición de la turbidez y el color se hizo con las muestras que contenían 1,2 U/mL de la enzima.

Las muestras control se diferenciaron por llevar el extracto enzimático con lacasa inhibida mediante el agregado de azida sódico 0,1 mM (Johannes et al., 2000).

Todas las muestras fueron incubadas a 40 °C en baño maría, durante 24 horas. Para clarificación de jugos con lacasa, la temperatura óptima encontrada por otros autores fue de 40 °C (Dogor et al., 2004; Gassara-Chatti et al., 2013).

3.4. Análisis Fisicoquímicos de los Jugos

3.4.1. Fenoles Totales

El contenido total de polifenoles en los jugos con y sin tratamiento con lacasa fue determinado por el método de Folin-Ciocalteau (FC).

Fundamento del método:

El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y es de color amarillo. El ácido fosfomolibdotungstico (formado por las dos sales en el medio ácido) al ser reducido por los grupos fenólicos (reacción redox) da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es indicador del contenido de polifenoles. La oxidación de los fenoles, presentes en la muestra, causa la aparición de la coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm y se cuantifica en base a una curva patrón de ácido gálico. Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción (Kaur y Kapoor, 2001).

Preparación de disoluciones patrón de ácido gálico

En este trabajo se hizo una disolución de ácido gálico de 10 mg/100mL (disolución concentrada o madre), a partir de esta disolución se prepararon 10 mL de disoluciones diluidas de concentraciones crecientes de ácido gálico, según se detalla en la siguiente tabla:

	Concentración (mg/L) de la curva patrón de ácido gálico								
Ácido gálico (mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6
Agua (mL)	10	9,8	9,6	9,4	9,2	9	8,8	8,6	8,4

Preparación de cada muestra de jugo para la medición de los compuestos fenólicos

Para la extracción de los compuestos fenólicos de las muestras de jugos, se siguió la metodología propuesta por Tomás-Barberán et al. (2001).

Se tomaron 2 mL de muestra de jugo tratado o control en un tubo y se añadió NaF 2mM para inactivar la enzima lacasa. Luego se agregaron 4 mL de una mezcla de metanol: agua (20:80), se homogeneizó el contenido de los tubos en el vortex y se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos.

Reacción:

Se tomaron 250 mL del extracto metanólico de la muestra y se adicionaron 2,5 mL del reactivo de Folin- Ciocalteau diluido 1:10, se homogenizó en vortex y se incubó 10 min en oscuridad. Luego se añadieron 2 mL Solución de $\text{Na}_2\text{CO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ al 7,5%, se homogenizó en vortex y se dejó incubar 10 min a 45 °C en tubos tapados. Se leyó en espectrofotómetro, antes de 30 minutos a 765 nm (Kaur y Kapoor, 2001).

Cuantificación e interpretación de resultados

A partir de los valores de absorbancia obtenidos de cada concentración de ácido gálico se construyó una recta de calibrado.

Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 mL de jugo, para lo cual se tuvo en cuenta la cantidad de disolvente empleado en la extracción y la cantidad de muestra que se tomó para realizar el análisis, en el siguiente orden:

$$\text{Fenoles totales} = [\text{mg Ácido gálico/mL jugo}] \times [\text{mL de disolvente/mL de jugo}] \times 100.$$

3.4.2. Turbidez en jugos de fruta

La turbidez en los jugos de fruta fue determinada utilizando un turbidímetro Hach y los resultados se informaron como unidades de turbidez nefelométrica (NTU) (Sin et al., 2006). El instrumento mide la intensidad de la luz dispersada a 90 grados cuando un rayo de luz pasa a través de una muestra acuosa (Tajchakavit et al., 2001).

Preparación y toma de las muestras

La turbidez se midió sobre las muestras de jugo de manzana, pera y naranja que contenían 1,2 U/mL de lacasa, elaboradas como se detalla en el punto 3.3. Las muestras control fueron preparadas también como se describe en el punto 3.3.

Condiciones de reacción

Todas las muestras fueron incubadas a 40 °C en baño maría durante 24 horas. Previo a las mediciones, las muestras fueron filtradas utilizando nitrato de celulosa 3 µm.

3.4.3. Determinación de Color

El primer juicio de la calidad de un jugo clarificado es a menudo su color, por lo tanto es un atributo sensorial muy importante. La absorbancia entre 400 y 450 nm es una medida del color que está en la n. Los pigmentos de melanoidina de color amarillo-marrón corresponden a los fenoles poliméricos oxidados en los jugos de fruta (Brimelow y Groesbeck, 1993).

Mediante un espectrofotómetro (Shimadzu UV 1800) se registró la absorbancia de las muestras de jugo tratadas y sus controles, en la longitud de onda de 400 nm, la cual fue corroborada previamente, observando los máximos de absorbancia para cada jugo.

3.5. Análisis Estadístico de Resultados

Los datos se procesaron con el software Infostat y Sigma Plot, y se realizó un ANOVA; el *p* valor fue de <0,05. Los datos representan el promedio de tres repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Efecto de la lacasa en el jugo de manzana

Los fenoles totales, expresados mediante la concentración de ácido gálico, mostró un valor de 910 mg AG/100mL a tiempo cero. La disminución del contenido de polifenoles fue significativa ($p < 0,05$) tanto en las muestras testigo (50% de reducción) (**Fig.22-sábana superior**) como en las tratadas con la enzima (80% de reducción) (**Fig.22-sábana inferior**), mostrando mayor velocidad en estas últimas (25% de reducción en diez min y 80% a los 80 min).

Otro autores encontraron una reducción del 40% de fenoles totales durante la clarificación de jugo de granada usando lacasa (Neifar et al., 2011).

No se observaron diferencias relacionadas con la concentración enzimática, lo cual podría deberse a que esta actúa como un catalizador, cuyo contenido está en exceso (**Fig.22-eje z**). Gokmen y col (1998) han demostrado que una concentración de lacasa de 500 U/L oxida satisfactoriamente los polifenoles a 50° C medido durante 6 h.

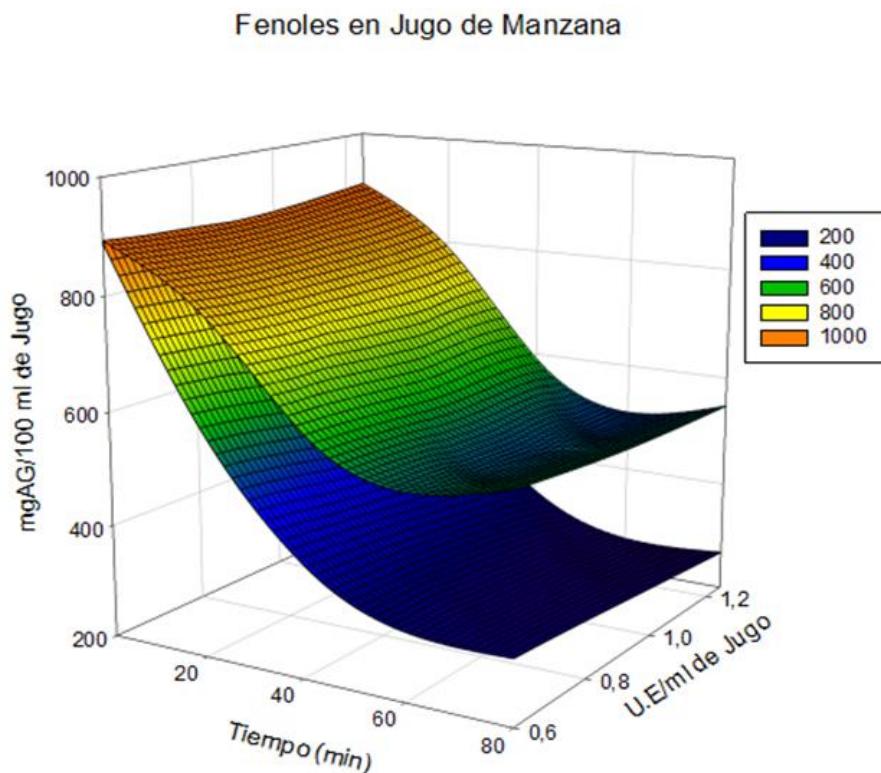


Figura 22: Fenoles Totales (expresado en mg de Ácido Gálico por cada 100 mL de Jugo) en jugo de manzana tratado (sábana inferior) con lacasa proveniente de *Trametes villosa* BAFC 2755, en diferentes concentraciones de la enzima (eje z); y sus correspondientes testigos (sábana superior); en un periodo de reacción de 80 min, a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado.

La **turbidez** del jugo de manzana (**Fig. 23**) aumentó significativamente (40%) por acción de la lacasa.

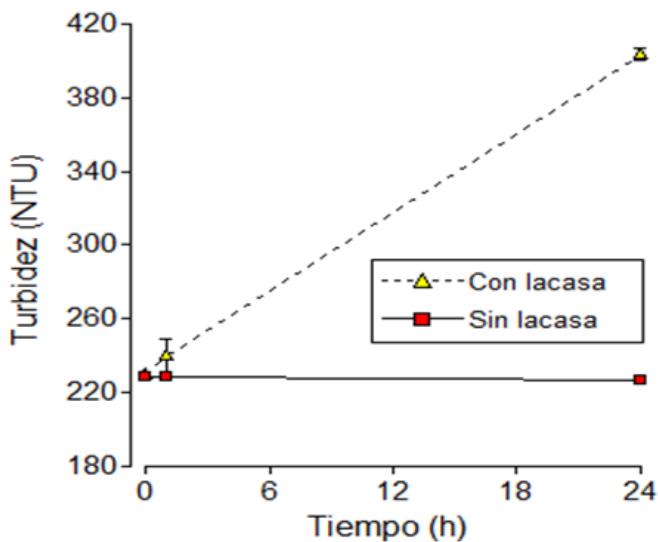


Figura 23: Turbidez (expresado en NTU) en jugo de manzana tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado de tres tiempos de muestreo: 0, 2 y 24 horas.

El **color** (**Fig. 24**) por su parte, mostró un aumento aún más importante (400% de aumento en 24 h) en los jugos tratados, sugiriendo que la filtración posterior realizada no fue suficiente para retirar los productos coloreados formados en la reacción con la enzima. Además, cabe mencionar que los productos iniciales de oxidación de la lacasa, descriptos en el mecanismo catalítico de la enzima, son bastante inestables pudiendo sufrir reacciones espontáneas de hidratación y desprotonación, dando lugar a compuestos insolubles de tipo melanina (Thurston, 1994).

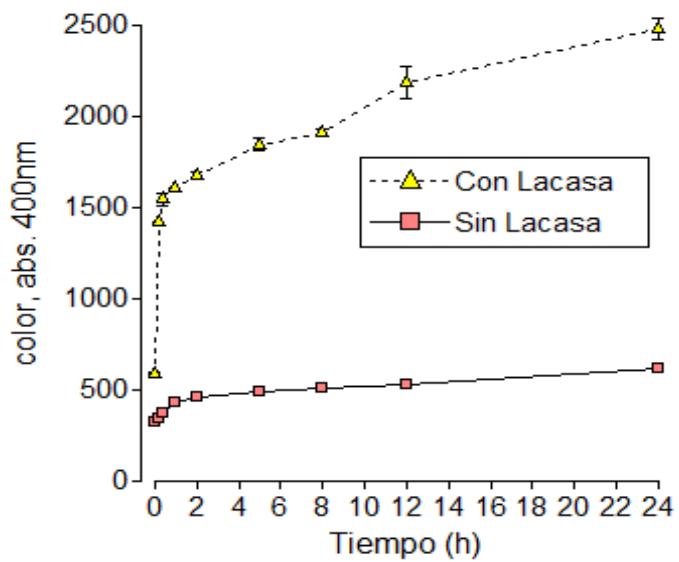


Figura 24: Color (expresado en Absorbancia) en jugo de manzana tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado.

Otros autores también encontraron resultados contrarios a los esperados; Sammartino y col (1998) compararon un tratamiento convencional de zumo de manzana con el uso de lacasa libre e inmovilizada y observaron que el jugo tratado enzimáticamente era menos estable.

Gokmen y col (1998) informaron un aumento de la susceptibilidad al “dorado” (color entre amarillo y marrón) durante el almacenamiento en muestras de jugo de manzana tratadas con lacasa.

Giovanelli y Ravasini (1993) por su parte, concluyeron que la oxidación de los fenoles por la lacasa produce una disminución significativa en el contenido fenólico de los jugos, asociado con un notable aumento de color en estos alimentos.

Pourcel y col (2006) atribuyen estos efectos al alto contenido de fenoles en estos jugos los cuales por acción de la lacasa, como así también de la PFO natural, se oxidan convirtiéndose en especies reactivas de oxígeno (ROS) y quinonas, las cuales conducen a polimerización espontánea no enzimática en agua dando lugar a la

decoloración de la superficie debido a la formación de un polímero marrón y estable llamado melanina.

Otros autores, analizaron la composición química de la turbidez del jugo de manzana comercial e informaron un contenido entre 3-49 % de proteína y 3-60% de polifenoles; estos últimos a su vez, resultaron de la polimerización de ciertos polifenoles sencillos tales como catequina (0-20 ug/mL) o epicatequina (20-30 ug/mL) a procianidina B2 (40-600 ug/mL), que pueden complejarse irreversiblemente entre ellos o con proteínas formando complejos insolubles que causan neblina (Beveridge et al, 1997; Ray y Rosell, 2017).

3.2. Efecto de la lacasa en el jugo de pera

El jugo de pera tenía 645 mg AG/100 mL a tiempo cero. Las muestras testigo (**Fig. 25-sábana superior**) mostraron mayor estabilidad a las condiciones de reacción que el jugo de manzana, ya que la reducción de fenoles fue menor al 10%. Por otro lado, el jugo de pera con la enzima (**Fig. 25-sábana inferior**) disminuyó hasta un 70% su contenido de polifenoles (190 mgAG/100ml) al final de la reacción (80 min). Se observó un descenso rápido (25 % de la reducción total en los primeros diez minutos), al igual que en el jugo de manzana (**Fig. 25- eje x**).

Las diferencias registradas sobre la concentración de la enzima (**Fig. 25 eje z**), no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$), según el ANOVA realizado.

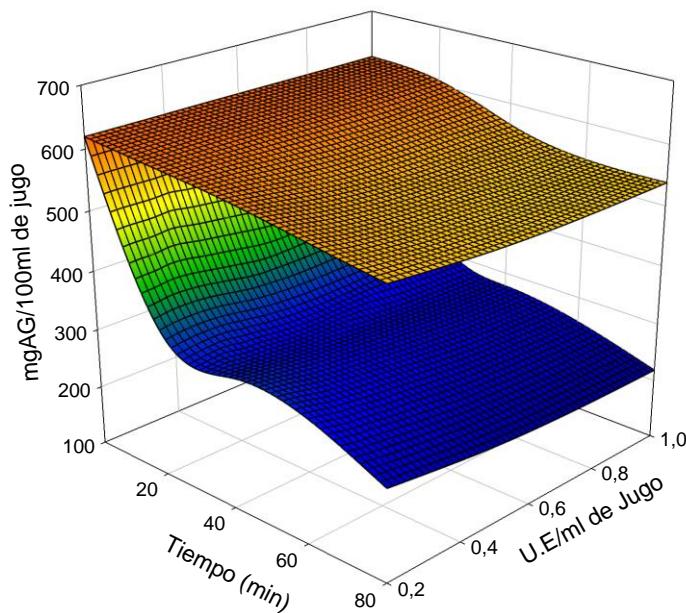


Figura 25. Fenoles Totales (expresado en mg de Ácido Gálico por cada 100 mL de Jugo) en jugo de pera tratado (sábana inferior) con extracto concentrado de lacasa proveniente de la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755, en diferentes concentraciones de la enzima (expresadas en U de Lac por ml de Jugo); y sus correspondientes testigos (sabana superior); en un periodo de reacción de 80 min a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado y las barras representan el error estándar de la media.

La **turbidez** (Fig. 26) del jugo tratado con lacasa disminuyó un 20% más que la disminución del jugo sin la enzima. Este efecto positivo de la lacasa en la turbidez del jugo de pera puede deberse al tipo de fenoles contenidos en esta fruta, con menor implicancia en la formación de neblina. Según Spanos y Wrolstad (1992), los principales compuestos fenólicos encontrados en el jugo de pera son ácido clorogénico (30-70 ug/ml), epicatequina (5-30 mg/ml), procyanolidinas (11-74 ug/ml) y quercetinas (0-30 ug/ml).

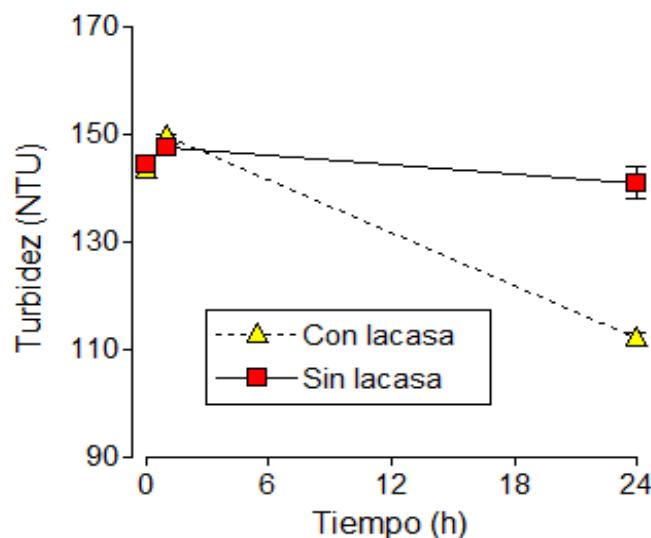


Figura 26. Turbidez (expresado en NTU) en jugo de pera tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado de tres tiempos de muestreo: 0, 2 y 24 horas.

El **color** del jugo de pera sin lacasa (**Fig.27**) aumentó un 30% en 24 horas, bajo las condiciones de reacción analizadas (40 °C). Las muestras tratadas con lacasa registraron un pico de aproximadamente 30 % de aumento en el color, en los primeros diez minutos de reacción, siguiendo una curva menos pronunciada que alcanzo un aumento del 200% aproximadamente a las 24 h.

Los productos iniciales de oxidación son bastante inestables, pudiendo sufrir reacciones espontáneas de hidratación y desprotonación, dando lugar a compuestos insolubles de tipo melanina (Thurston, 1994), o produciendo radicales que pueden reaccionar entre si originando dímeros, oligómeros o polímeros covalentemente unidos mediante enlaces C-C, C-O y C-N (Claus, 2004).

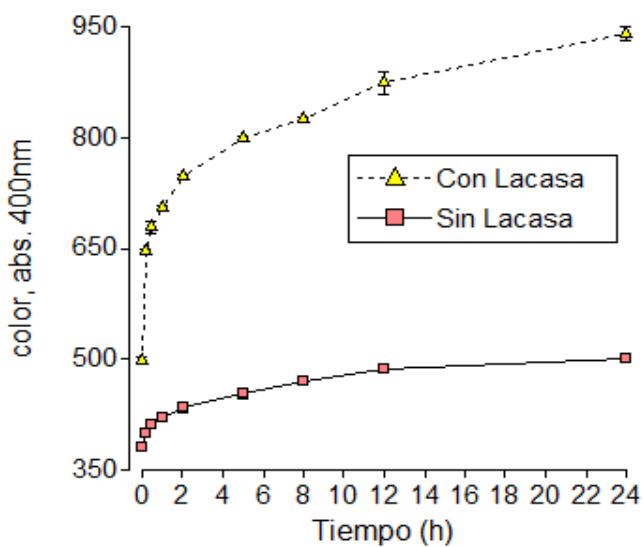


Figura 27. Color (expresado en Absorbancia) en jugo de pera tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los resultados se basan en mediciones por triplicado.

3.3. Efecto de la lacasa en el jugo de naranja

El jugo de naranja mostró menor contenido de polifenoles totales en tiempo cero que los demás jugos analizados, siendo el valor promedio de 562 mg AG/100mL (**Fig. 28**). En el jugo sin tratamiento (**Fig. 28-sábana superior**), la reducción de fenoles con el paso del tiempo y en las condiciones ensayadas, fue del 15% al final del estudio (480 mgAG/100mL de jugo). Por otra parte, el jugo con lacasa (**Fig. 28-sábana inferior**), obtuvo una rápida reducción del contenido fenólico llegando a valores de 189 mgAG/100mL (reducción del 70%) a los 40 min, sin cambios luego de este tiempo. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones enzimáticas evaluadas (**Fig. 28-eje z**).

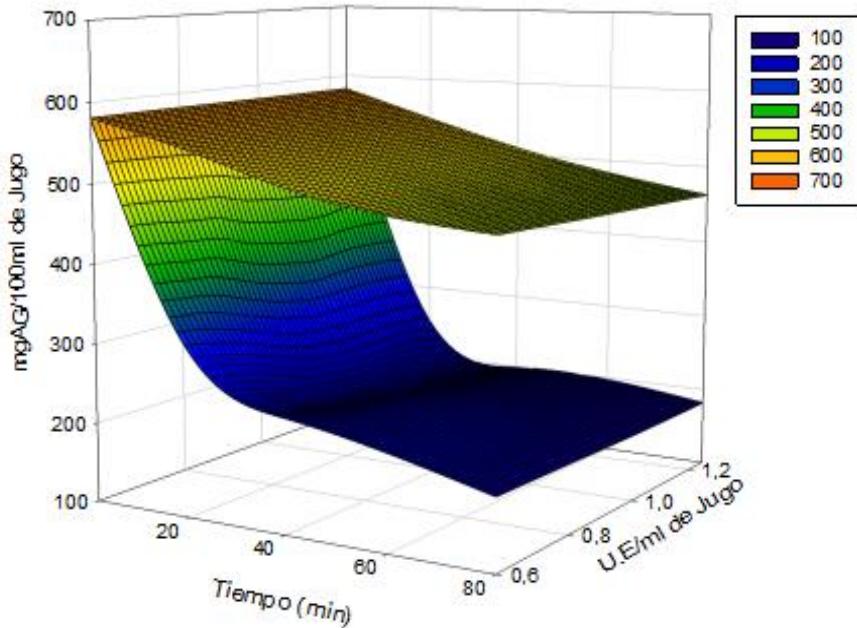


Figura 28. Fenoles Totales (expresado en mg de Acido Gálico por cada 100 mL de Jugo) en jugo de naranja tratado (sábana inferior) con extracto concentrado de lacasa proveniente de la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755, en diferentes concentraciones de la enzima (expresadas en U de Lac por mL de Jugo); y sus correspondientes testigos (sabana superior); en un periodo de reacción de 80 min, a 40 °C. Los datos representan la media de tres réplicas.

La **turbidez** (Fig. 29) aumentó a partir de la primera hora de reacción en el jugo con lacasa, y alcanzo un 75% de aumento aproximadamente, a las 24 horas.

Para este jugo, los resultados obtenidos son positivos ya que el mercado de consumidores de jugo de naranja, prefiere el jugo “turbio”, por lo que se usan las mismas enzimas que en el jugo de manzana y pera para causar un efecto contrario al aclaramiento (Camperi et al, 1996).

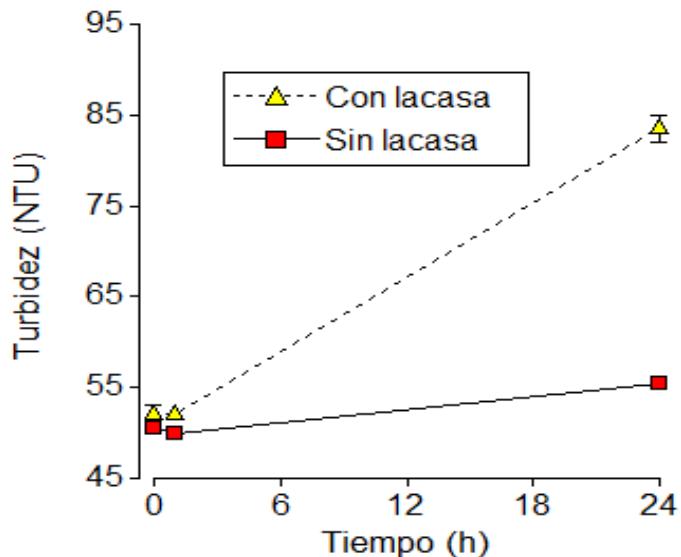


Figura 29. Turbidez (expresado en NTU) en jugo de naranja tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los datos representan la media de tres réplicas de tres tiempos de muestreo: 0, 2 y 24 horas.

El **color** (Fig. 30) del jugo de naranja sin tratamiento, mostró una absorbancia de 0,260 en tiempo cero y aumentó un 20% en 24 h. Las muestras tratadas con la enzima aumentaron gradualmente el color, llegando a 0,410 de Absorbancia a las 24 h, representando esto un aumento del 70% aprox.

Por otro lado, se informó que la lacasa puede mejorar el perfil sensorial del jugo de naranja, debido a la reducción de vinil-guayacol, un fenol responsable del potente aroma desagradable descripto como picante/especiado (Lettera et al., 2016).

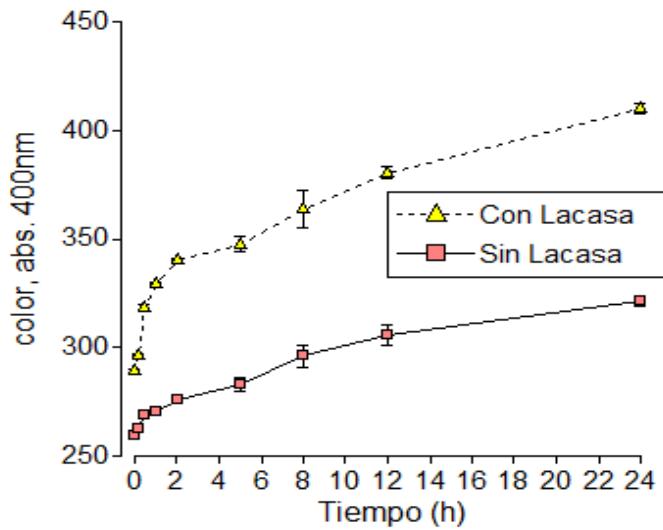


Figura 30. Color (expresado en Absorbancia a 400 nm) en jugo de naranja tratado con 1,2 U/mL de lacasa por muestra, proveniente de la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755, y sus correspondientes testigos; en un periodo de reacción de 24h a 40 °C. Los datos representan la media de tres réplicas.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los fenoles son compuestos de bajo peso molecular que permanecen en el sobrenadante de jugos de fruta y conducen a jugos oscuros y turbios durante el almacenamiento de los mismos. El principal propósito durante el procesado de jugos, es la reducción del color y de la astringencia del producto, ambos mediante la reducción de compuestos fenólicos.

A través del tratamiento con lacasa se logró disminuir la concentración de fenoles en los distintos jugos de fruta ensayados, los cuales por oxidación se convierten en compuestos (o-quinonas) que por polimerización o por reacción con proteínas podrían ser descartados por centrifugado y ultrafiltración.

El color y la turbidez aumentaron en el jugo de manzana y naranja y disminuyeron levemente en el jugo de pera. Los resultados son positivos para el caso del jugo de naranja, ya que el consumidor busca el efecto contrario a la clarificación (jugo con pulpa estable). En cuanto al jugo de manzana, el gran aumento en el color podría deberse a la necesidad de utilizar equipos de ultrafiltración, los cuales implican la utilización de membranas menores a 100 nm y presión de 1 a 10 Bar, entre otros procesos de alto costo.

CONCLUSION GENERAL

A fines de considerar nuevos aditivos naturales para el procesado de alimentos, como las enzimas provenientes de hongos de pudrición blanca dela madera; en este trabajo de investigación se propuso la obtención de extractos de hongos con presencia de la enzima lacasa y la evaluación del efecto de su aplicación en el procesado de aceites vegetales y jugos de fruta.

Producción de lacasa

Del total de cepas y medios evaluados, se destacó el medio de cultivo GA (suplementado con 10 g/L de glucosa, 4g de asparagina y 0.4 mg L⁻¹ de CuSO₄) con la cepa *Trametes villosa* BAFC 2755 y el medio de cultivo Galhalup (40 g de glucosa, 5g de extracto de levadura, 5 g de peptona de carne, 1 g de SO₄.Mg.7H₂O y 0.4 mg L⁻¹ de CuSO₄) con la cepa de *Trametes versicolor* BACF 2234; luego de una incubación en oscuridad durante 21 días. Se obtuvieron respectivamente máximos de 25 y 32 U/mL de lacasa, luego del proceso final de concentrado mediante diálisis.

Estos resultados corroboran y extienden lo ya expresado por otros autores en cuanto a los componentes y condiciones óptimas para lograr la producción de enzima lacasa extracelular.

Degradación de colorantes

Los ensayos de decoloración de algunos colorantes, en medio líquido, por parte de los extractos con lacasa, demostraron ser eficientes para develar la capacidad degradativa de los hongos estudiados. En las condiciones evaluadas (45 °C) las diferencias entre las cepas no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Sin embargo, sobresalió la cepa de *T. versicolor* la cual logró decolorar casi totalmente al colorante Remazol brillant blue (98%) en tan solo 15 min, tambien el Índigo carmín (99%) en 48 h y el Verde malaquita (93%) en 24 h. Es decir que los colorantes de estructura

antraquinónica (quinonas tricíclicas), indigoica (heterocílicos) y trifenilmetanoica (tres anillos fenilos) parecen tener mayor afinidad por la lacasa, posiblemente por su similitud con la estructura de la lignina.

Estos resultados sugieren que los hongos lignocelulósicos y sus enzimas tienen alto potencial para ser usados en el tratamiento de biorremediación de colorantes recalcitrantes, debido a los altos porcentajes de decoloración alcanzados, la rapidez del proceso y el bajo costo implicado.

Oxidación de aceites vegetales

Nuestros resultados indican que la enzima lacasa perjudica la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales comestibles, debido al aumento de los valores de peróxidos, dienos y trienos conjugados, luego de la aplicación de un extracto enzimático de *Trametes versicolor* que contiene lacasa.

Se puede argumentar que varios subproductos parcialmente oxidados producidos por la actividad enzimática podrían ser responsables del comportamiento oxidativo observado.

Los hallazgos relacionados con el efecto de la lacasa de *Trametes versicolor* en el proceso de oxidación de aceites vegetales, son especialmente relevantes ya que hay pocos estudios que informen acerca de los cambios ocurridos sobre los indicadores de oxidación de aceites tratados con lacasa.

Se concluye que la aplicación de polifenol-oxidases en aceites vegetales puede explotarse tanto con fines analíticos como para comprender mejor el papel que desempeñan los compuestos fenólicos naturales contenidos en los aceites.

Clarificación de Jugos de fruta

Un jugo clarificado es un jugo natural que no tiene pulpa y no tiene una apariencia nubosa. Los polifenoles son los principales factores involucrados en el proceso de

turbidez, intensificación del color y alteración del sabor en los jugos fruta, durante el almacenamiento, por ello es necesario reducir el contenido fenólico por debajo de cierto nivel. A través del tratamiento con lacasa de *Trametes villosa* BAFC 2755 se logró disminuir el contenido fenólico en un 80% sobre el jugo de manzana y 70% en jugo de pera y naranja.

El color y la turbidez aumentaron en el jugo de manzana y naranja y disminuyeron levemente en el jugo de pera. Los resultados son positivos para el caso del jugo de naranja, ya que el consumidor busca el efecto contrario a la clarificación (jugo con pulpa estable). En cuanto al jugo de manzana, el gran aumento en el color podría deberse a la necesidad de utilizar equipos de ultrafiltración que retengan mejor la gran cantidad de fenoles oxidados.

Las implicaciones químicas de estos hallazgos contribuyen a la comprensión de la relación entre las enzimas fúngicas y sus aplicaciones en alimentos. Un estudio más detallado del mecanismo regulador subyacente de la lacasa actuando sobre diversos sustratos contribuirá a aumentar nuestro conocimiento sobre la acción de esta enzima y sus potenciales aplicaciones.

El estudio de enzimas fúngicas en el procesamiento de alimentos tiene una enorme importancia debido a que son compuestos estables a altas temperaturas, a diversos pH y menos dependientes de iones metálicos. Particularmente la lacasa presenta bajo impacto ambiental en todo su proceso por lo que mediante un sistema adecuado de aplicación podría ayudar a cambiar la industria alimentaria hacia procesos biotecnológicos en los que se empleen hongos o sus enzimas.

REFERENCIAS

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 3357-3362.
- Abou-Gharbia HA, Shahidi FI, Shehata AA, Youssef MM. Oxidative stability of extracted sesame oil from raw and processed seeds. *J Food Lipids.* 1996; 3: 59–72.
- Aehle W. Enzymes in Industry: Production and Applications. 3rd ed. Wolfgang Aehle John Wiley & Sons. 2007. 516 p.
- Agcam E, Akyıldız A, Evrendilek GA. Comparison of phenolic compounds of orange juice processed by pulsed electric fields (PEF) and conventional thermal pasteurisation. *Food Chem.* 2014; 143: 354-361.
- Alamed J, Chaiyosit WD, McClements J, Decker E A. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *J. Agric. Food. Chem.* 2009; 57: 2969-2976.
- Alcalde M. Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications. In: Polaina J, MacCabe AP. Eds. Industrial Enzymes. Springer, Dordrecht. 2007. 461–476 p.
- Ali M, Sreekrishnan TR. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Adv Environ Res.* 2001; 5: 175-196.
- Alvarez S, Alvarez R, Riera F A, Coca J. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 1998; 138: 377–382.
- Anasonye F, Winquist E, Räsänen M, Kontro J, Björklöf K, Vasilyeva G, Jørgensen KS, Steffen KT, Tuomela M. Bioremediation of TNT contaminated soil with fungi under laboratory and pilot scale conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2015; 105:7-12.
- Antolin PI, Meneses MM. Aplicación de la espectrofotometría UV-visible al estudio de la estabilidad térmica de aceites vegetales comestibles. *Grasas y Aceites.* 2000; 51: 424-428.

AOAC, Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC. 1995.

Augustine AJ, Kragh ME, Sarangi R, Fujii S, Liboiron BD, Stoj CS, Kosman DJ, Hodgson KO, Hedman B, Solomon EI. Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* laccase: allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites. *Biochem J.* 2008; 47:2036-2045.

Baldrian P. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews.* 2006; 30:215-242.

Baldrian P, Gabriel J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology Letters.* 2003; 220:235-240.

Bauer CG, Kuhn A, Gajovic N, Skorobogatko O, Holt PJ, Bruce NC, Makower AA, Lowe CR, Schellern FW. New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1999; 364:179-183

Beveridge T, Harrison JE, Weintraub SE. Procyanidin Contributions to Haze Formation in Anaerobically Produced Apple Juice. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 1997; 30: 594–601.

Bezerra TM, Bassan JC, de Oliveira Santos VT, Ferraz A, Monti R. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. *Process Biochem.* 2015; 50: 417-423.

Bharate SS, Bharate SB. Non-enzymatic browning in citrus juice: chemical markers, their detection and ways to improve product quality. *Journal of Food Science and Technology.* 2014; 51(10): 2271-2288.

Blanchette RA. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany.* 1995; 73:999-1010.

Blánquez P, Sarrà M, Vicent T. Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions. *Process Biochem.* 2008; 43:1-7.

Bouwens EM, Trivedi K, Van Vliet C, Winkel C. Method of enhancing color in a tea based foodstuff. European patent application. 1997. EP 760213 A1.

- Bouwens E M, Trivedi K, Van Vliet C, Winkel C. Method of enhancing color in a tea based foodstuff. 1999. US 5879730 A.
- Brijwani K, Rigdon A, Vadlani PV. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. Enzyme Res. 2010; 149748.
- Cai X, Pi Y, Zhou X, Tian L, Oiao S, Lin J. Hepatoma cell growth inhibition by inducing apoptosis with polysaccharide isolated from Turkey tail medicinal mushrooms, *Trametes versicolor* (L:Fr) Lloyd (Aphyllophoromycetidae). Inter J Med Mushrooms. 2010; 12 (3) :257-63.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez A. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71: 1775–1784.
- Camarero S, Cañas AI, Nousiainen P, Record E, Lomascolo A, Martinez JM, Martinez AT. P-hydroxycinnamic Acids as Natural Mediators for Laccase Oxidation of Recalcitrant Compounds. Environ. Sci. Technol. 2008; 42: 6703-6709.
- Camperi SA, Hours RA, Auday RM, Miranda MY, Cascone O, Navarro del Cañizo A. Jugos de Fruta sin Metanol. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy. 1996; (6): 33.
- Campos R, Kandelbauer A, Robra K.H, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. Journal of Biotechnology. 2001; 89: 131–139.
- Caracciolo AB, Topp E, Grenni J. Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2015; 106: 25-36.
- Chan Cupul W, Heredia Abarca G, Martínez Carrera D, Rodríguez Vázquez R. Enhancement of ligninolytic enzyme activities in a *Trametes maxima*-*Paecilomyces carneus* co-culture: Key factors revealed after screening using a Plackett-Burman experimental design. Electron. J. Biotechnol. 2014; (3)17.
- Chatterjee R, Johansso K, Järnström L, Jönsson LJ, Evaluation of the potential of fungal and plant laccases for active-packaging applications. J. Agric. Food Chem. 2011; 59 (10): 5390–5395.

- Chen S, Ma D, Ge W, Buswell JA. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. FEMS Microbiology Letters. 2003; 218:143-148.
- Claus, H. Laccase: structure, reactions, distribution. Micron. 2004; 35:93-96.
- Da Re V, Papinutti L, Forchiassin F, Levin L. Biobleaching of loblolly pine kraft pulp with *Trametes trogii* culture fluids followed by a peroxide stage. Application of Doehlert experimental design to evaluate process parameters. Enzyme and Microbial Technology. 2010; 46:281-286.
- De la Rubia T, Ruiz E, Pérez J, Martínez J. Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavidо-alba* induced by vanillin. Archives of Microbiology. 2002; 179:70-73.
- De Leonardis A, Macciola V. Polyphenol oxidase from eggplant reduces the content of phenols and oxidative stability of olive oil. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2011; 113: 1124-1131.
- De Leonardis A, Roggero A, Vicenzo Macciola AC. Effects of polyphenol enzymatic-oxidation on the oxidative stability of virgin olive oil. Food Res. Int. 2013; 54: 2001-7.
- Del Moral S, Ramírez-Coutiño L, GarcíaGómez M. Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. Revista Iberoamericana de Ciencias, 2015; 2: (3), 94.
- Deveci EU, Dizge N, Yatmaz HC, Tansel B. Degradation of recalcitrant textile dyes by coupling fungal and photocatalytic membrane reactors. CLEAN–Soil- Air-Water. 2016; 44:1345-1351.
- Dhawan S, Kuhad RC. Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. Bioresource Technology, 2002; 84:35-38.
- Di Fusco M, Tortolini C, Deriu D, Mazzei F. Laccasebased biosensor for the determination of polyphenol index in wine. Talanta, 2010; 1-2(81): 235-240.
- Di Rienzo J A, Casanoves F, Balzarini M G, González L, Tablada M, Robledo C W. [Software de cómputo] 2017 version. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. RA.
- Dodor DE, Hwang H, Ekunwe SIN. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. Enzyme and Microbial Technology, 2004; 35: 210-217.

- Ducasse MA, Williams P, Canal-Llauberes RM, Mazerolles G, Cheynier V, Doco T. Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Merlot red wines. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59 (12): 6558-6567.
- Durán L. Aditivos naturales. Arbor. Ed: CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) (España). 2001; 168 (661): 87-107.
- Eggert C, Temp U, Dean JF, Eriksson K EL. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*, 1996; 391:144-148.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Khardziani T, Agathos SN. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010; 37:1091-1096.
- Enguita FJ, Marcal D, Martins LO, et al. (2004) Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 279: 23472-6.
- Farhoosh R, Niazmand R, Rezaei M, Sarabi M. Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2008; 110: 587-592
- Fazenda M, Seviour R, McNeil B, Harvey L. Submerged culture fermentation of higher fungi: the macrofungi. *Adv Appl Microbiol*. 2008; 63:33-92.
- Figueroa S, Vázquez L, Alvarez-Gallegos A. Decolorizing textile wastewater with Fenton's reagent electrogenerated with a solar photovoltaic cell. *Water Research*, 2009; 43(2): 283-294.
- Filotas E, Parrott L, Burton PJ, Chazdon RL, Coates KD, Coll L, Haeussler S, Martin K, Nocentini S, Puettmann KJ. Viewing forests through the lens of complex systems science. *Ecosphere*, 2014; 5:1-23.
- Flores C, Vidal C, Trejo-Hernández M, Galindo E, Serrano-Carreón L. Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 2009; 106: 249-257.
- Freire RS, Duran N, Kubota LT. Effects of fungal laccase immobilizatin procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta*, 2001; 54:681-686.

- Friedman M. Food Browning and its prevention: an overview. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1996; 45: 1091-1096.
- Fukushima, K. Regulation of syringyl to guaiacyl ratio in lignin biosynthesis. *Journal of Plant Research*, 2001; 114: 499-508.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK, Strauss J, Haltrich D. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, 2002; 148: 2159-2169.
- Galvagno MA. Ensayos de nutrición en *Ascobolus crenulatus* P. Karst. (Fungi: Ascomycetes). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 1976; 17: 95-118.
- Gassara-Chatti F, Brar SK, Ajila CM, Verma M, Tyagi RD, Valero JR. Encapsulation of ligninolytic enzymes and its application in clarification of juice. *Food Chemistry*, 2013; 137: 18-24.
- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010; 67:369-385.
- Gibbons D, Morrissey C, Mineau P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015; 22:103-118.
- Giles MR, Dixon NJ. Process for bleaching pulp. Google Patents US8906199B2. 2014.
- Gill P, Arora D. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003; 30:28-33.
- Giovanelli G, Ravasini G. Apple juice stabilization by combined enzyme-membrane filtration process. *Lebensm-Wiss. u- Technol.* 1993; 26 (1):1-7.
- Glenn JK, Gold MH. Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of biochemistry and Biophysics*, 1985; 242: 329-341.
- Gokmen V, Borneman Z, Nijhuis HH. Improved ultrafiltration for color reduction and stabilization of Apple juice. *Journal of Food Science*, 1998 ; 63 (3): 504-507.
- Gonçalves MA, Gonzaga FB, Fraga ICS, de Matos Ribeiro C, Sobral SP, Borges PP, de Carvalho Rocha WF. Evaluation study of different glass electrodes by an

interlaboratory comparison for determining the pH of fuel ethanol. Sensors and Actuators B: Chemical. 2011; 158: 327-332.

Grassi E, Scodeller P, Filiel N, Carballo R, Levin L. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. International Biodeterioration & Biodegradation. 2011; 65:635-643.

Grassin C, Fauquembergue P. Application of pectinases in beverages. Pectins and pectinases, 1996: 453-462.

Grove, SJ. Saproxylic insect ecology and the sustainable management of forests. Annual review of ecology and systematics. 2002; 33:1-23.

Grube BJ, Eng ET, Kao YC, Kwon A, Chen S. White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. J. Nutr. 2001; 131: 3288-3293

Guerrero-Beltrán JA, Swanson BG, Barbosa-Cánovas GV. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid, LWT, 2005; 38: 625-639.

Gutiérrez-Soto J, Salcedo-Martínez S, Contreras-Cordero J, Hernández-Luna C. Characterization of the major laccase from *Trametes maxima* CU1 and decolorization of nine commercially significant dyes by the enzyme. Water R&D, 2011; 1:10-19.

Hamilton RJ. The chemistry of rancidity in foods, In: Allen JC, Hamilton RJ, Rancidity in foods. 3rd ed. Blackie Academic & Professional, London, 1994: 1-21.

Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews, 1994; 13:125-135.

Hernandez CA, Perroni Y, Perez JA, Rivera BG, Alarcon E. Light-induced inhibition of laccase in *Pycnoporus sanguineus*. Folia Microbiologica, 2016; 61:137-142.

Hilden KS, Bortfeldt R, Hofrichter M, Hatakka A, Lundell TK. Molecular characterization of the basidiomycete isolate *Nematoloma frowardii* b19 and its manganese peroxidase places the fungus in the corticioid genus *Phlebia*. Microbiology, 2008; 154:2371-2379.

- Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kües U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal*. 2006; 273: 2308-2326.
- Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 2002; 30:454-466.
- Hori C, Cullen D. Prospects for bioprocess development based on recent genome advances in lignocellulose degrading basidiomycetes. In *Gene expression systems in fungi: Advancements and applications*. 2016. Springer, New York.
- Hsieh TC, Wu JM. Cell growth and gene modulatory activities of Yunzhi (Windsor Wunxi) from mushroom *Trametes versicolor* in androgen-dependent and androgen-insensitive human prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 2001; 18 (1): 81–8.
- Hou H, Zhou J, Wang J, Du Cuihong, Yan B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem*, 2004; 39: 1415-1419.
- Ibarra-Escutia P, Juarez J, Gomez C, Calas-Blanchard J, Marty L and Ramirez-Silva M T. Amperometric biosensor based on a high resolution photopolymer deposited onto a screen-printed electrode for phenolic compounds monitoring in tea infusions. *Talanta*, 2010; 81 (4-5,): 1636–1642.
- Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science*. 2004; 3:1-19.
- Iracheta-Cardenas MM, Rocha-Peña MA, GalánWong LJ, Arévalo-Niño K, Tovar-Herrera OE. A pycnoporus sanguineus laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic comercial formulation. *J. Environ. Manage*. 2016; 177: 93100.
- Javed A, Ali S, Abid W, Ali N. A review on the potencial industrial applicatios of microbial laccases. *Eur. J. Pharmacol. Med*. 2017; 4 (4): 238-246.
- Janusz G, Sulej J, Jaszek M, Osinska-Jaroszuk M. Effect of different wavelengths of light on laccase, cellobiose dehydrogenase, and proteases produced by *Cerrena unicolor*, *Pycnoporus sanguineus* and *Phlebia lindtneri*. *Acta Biochimica Polonica*. 2016; 63: 223-228.

- Janusz G, Kucharzyk KH, Pawlik A, Staszczak M, Paszczynski AJ. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. Enzyme and Microbial Technology, 2013; 52:1-12.
- Jaouani A, Guillen F, Penninckx MJ, Martínez AT, Martínez MJ. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. Enzyme and Microbial Technology, 2005; 36 (4): 478–486.
- Jarosz-Wilkołazka A, Kochmańska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W, Leonowicz A. Fungi and their ability to decolorize azo and anthraquinonic dyes. Enzyme and Microbial Technology, 2002; 30(4): 566–572.
- Johannes C, Majcherczyk A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. Biotechnol., 2000, 78: 193-199.
- Johansson K, Jönsson LJ, Järnström L. Oxygen scavenging enzymes in coatings – effect of coating procedures on enzyme activity. Nordic Pulp and Paper Research International, 2011; 26: 197–204. diva2:558159.
- Joseleau JP, Ruel K. Wood polysaccharides and their degradation by fungi. In Host Wall Alteration by Parasitic Fungi. American Phytopathological Society, 1994.
- Kadowaki K, Leschen RA, Beggs JR. Competition-colonization dynamics of spore-feeding beetles on the long-lived bracket fungi Ganoderma in New Zealand native forest. Oikos, 2011; 120: 776-786.
- Khammuang S, Yuwa-amornpitak T, Svasti J, Sarnthima R. Copper induction of laccases by *Lentinus polychrous* under liquid-state fermentation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2013; 2: 357-362.
- Kandelbauer A, Maute O, Rudolff WK, Erlacher A, Gübitz M. Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzymereactor using online spectroscopy. Biotechnol Bioeng. 2004; 87:552–563
- Kang YM, Prewitt ML, Diehl SV. Proteomics for biodeterioration of wood (*Pinus taeda* L.): Challenging analysis by 2-D PAGE and MALDI-TOF/TOF/MS. International Biodeterioration & Biodegradation. 2009; 63:1036-1044.
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra Sd, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technology, 2001; 77: 215–227.

- Kaur P, Bhardwaj NK, Sharma J. Application of microbial enzymes in dissolving pulp production. In *Frontier discoveries and innovations in interdisciplinary microbiology*. Springer; 2016. India.
- Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables-The millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 2001; 36(7): 703–725.
- Kirby N. Bioremediation of textile industry wastewater by white rot fungi. DPhil Thesis, University of Ulster, 1999. Coleraine, UK.
- Kirk P, Cannon P, Minter D, Stalpers J. *Dictionary of the Fungi*. CAB International, Wallingford, 2008.
- Kjaergaard CH, Durand F, Tasca F, Qayyum MF, Kauffmann B, Gounel S, Suraniti E, Hodgson KO, Hedman B, Mano N. Spectroscopic and crystallographic characterization of “alternative resting” and “resting oxidized” enzyme forms of bilirubin oxidase: implications for activity and electrochemical behavior of multicopper oxidases. *Journal of the American Chemical Society*, 2012; 134:5548-555.
- Kodama N, Komuta K, Nanba H. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the Activation of NK Cells in Cancer Patients. *Journal of Medicinal Food*, 2004; 6(4): 371-377.
- Koski A, Pekkarinen S, Hopia A, Wahala K, Heinonen M. Processing of rapeseed oil: Effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *Eur. Food Res. Technol.* 2003; 217: 110–114. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0721-4>.
- Kudanga T, Nyanhongo GS, Guebitz GM, Burton S. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011; 48: 195–208.
- Kuhar F, Papinutti L. Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers. *Rev. Argent. Microbiol.* 2014; 46: 144-149.
- Kubicek CP. *Fungi and lignocellulosic biomass*. John Wiley & Sons, Inc. 2013.
- Kües U, Liu Y. Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000; 54:141-152.

- Kuhar F, Papinutti L. Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers. *Revista Argentina de Microbiología*, 2014; 46:144-149.
- Kumar VV, Kirupha SD, Periyaraman P, Sivanesan S. Screening and induction of laccase activity in fungal species and its application in dye decolorization. *African Journal of Microbiology Research*, 2011; 5:1261-1267.
- Kunamneni A, Camarero S, García-Burgos C, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial cell factories*, 2008; 7: 1.
- Kuznetsov BA, Shumakovich GP, Koroleva OV, Yaropolov AI. On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoas: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001; 16:425.
- Labat E, Morel MH, Rouau X. Effects of laccase and ferulic acid on wheat flour doughs. *Cereal Chemistry*, 2000; 77 (6): 823–828.
- Lalwani G, Xing W, Sitharaman B. Enzymatic degradation of oxidized and reduced Graphene Nanoribbons by lignin peroxidase. *Journal of Materials Chemistry*. 2014; 2:6354-6362.
- Larsson S, Cassland P, Jönsson LJ. Development of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001; 67, 1163–1170.
- Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microb.* 2001; 41:185-227.
- Lettera V, Piscitelli A, Leo G, Birolo L, Pezzella C, Sannia G. Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biology*, 2010; 114:724-730.
- Lettera V, Pezzella C, Cicatiello P, Piscitelli A, Valerio G, Giacobelli VE, Galano E, Amoresano A, Giovanni S. Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 2016; 196: 1272-1278.

- Levin L, Forchiassin F. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Acta Biolechnol.* 2001; 179-186.
- Levin L, Forchiassin F, Ramos A. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*. 2002; 94:377-383.
- Levin L, Viale A, Forchiassin A. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003; 52:15.
- Levin L, Papinutti L, Forchiassin F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Process Biochemistry*, 2004.; 94:169-176.
- Levin L, Forchiassin F, Viale A. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochemistry*, 2005; 40:1381-1387.
- Levin L, Villalba L, Da Re V, Forchiassin F, Papinutti L. Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes. *Proc. Biochem.* 2007; 42: 995-1002.
- Levin L, Melignani E, Ramos AM. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology*, 2010.
- Levin L, Grassi E, Carballo R. Efficient azoic dye degradation by *Trametes trogii* and a novel strategy to evaluate products released. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012; 75:214-222.
- Liew Abdullah AG, Sulaiman NM, Aroua MK, Megat Mohd Noor M.J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *J. Food Eng.* 2007; 81; 65-71.
- Ling ZR, Wang SS, Zhu MJ, Ning YJ, Wang SN, Li B, Zhao, XM. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes sp.* LAC-01. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015; 81: 785–793.
- Litthauer D, van Vuuren MJ, van Tonder A, Wolfaardt FW. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme Microb. Technol.* 2007; 40: 563-568.

- Llauradó MG, Morris Quevedo HJ, Albear, JM, Castán Chibás L, Bermúdez Savón R C. Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2011; 30(4): 511-527.
- Lo SC, Ho YS, Buswell JA. Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*, and partial characterization of a major laccase component. Mycologia, 2001; 93:413-421.
- Lomascolo A, Record E, Herpoël-Gimbert I, Delattre M, Robert J, Georis J, Dauvrin T, Sigoillot JC, Asther M. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. Journal of Applied Microbiology, 2003; 94: 618-624.
- Loto L. Decontaminación de efluentes provenientes del procesamiento de aceite de oliva mediante el tratamiento con hongos de pudrición blanca de la madera. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2017; UNLaR.
- Main GL, Morris JR. Effect of Macerating Enzymes and Postfermentation Grape-Seed Tannin on the Color of Cynthiana Wines. Am J Enol Vitic. 2007; 58: 365-372.
- Majeau JA, Brar SK, Tyagi RD. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. Bioresour. Technol. 2010; 101: 2331-2350.
- Majumdar S, Lukk T, Solbiati JO, Bauer S, Nair SK. Roles of Small Laccases from *Streptomyces* in Lignin Degradation, Biochem. 2014; 53: 4047-4058.
- Marencio Arellano V, Reaño Martos M, Rodríguez M, Cabreros B, Fernández A , García Loria J , Rodríguez Mosquera M. La sensibilidad al sulfito en un paciente con alergia-asma. Allergol Immunopathol (Madr). 2011; 39 (5):306-7.
- Marmesat BS, Morales A, Velasco J, Ruiz-Méndez MV, Dobarganes MC. Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. Grasas y Aceites, 2009; 60: 155-160.
- Martínez-Morales F, Bertrand B, Nava AAP, Tinoco R, Acosta-Urdapilleta L, Trejo-Hernández MR. Production, purification and biochemical characterization of two laccase isoforms produced by *Trametes versicolor* grown on oak sawdust. Biotechnology Letters. 2015; 37:391-396.

Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillen F, Martinez MJ, Gutierrez A, del Rio JC. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Journal of Microbiology. 2005; 8:195-204.

Mate DM, Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microb Biotechnol*. 10: 1457–1467. Mathiasen, T E. 1995. Laccase and beer storage. PCT international application, 2016. WO 9521240 A2.

Mayer AM, Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 2002; 60:551–565.

Mechichi T, Mhiri N, Sayadi S. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. *Chemosphere*. 2006; 64:998-1005.

McEvily A, Iyengar R, Otwell S. Inhibition of Enzymatic Browning in Foods and Beverages. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 1992; 32(3): 253-273.

McMurrough I, Madigan D, Kelly R, O'Rourke T. Haze formation shelf-life prediction for lager beer. *Food Technology*, 1999; 53(1): 58–63.

Millati R, Syamsiah S, Niklasson C, Cahyanto MN, Ludquist K, Taherzadeh MJ. 2011. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. *BioResources*, 2011; 6: 5224-5259.

Minussi RC, Pastore GM, Duran N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 2002; 13 (6-7): 205–216.

Minussi RC, Miranda MA, Silva JA, Ferreira CV, Aoyama H, Marangoni S, Rotilio D, Pastore GM, Durán N. Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *African Journal of Biotechnology*, 2007a; 6:1248-1254.

Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Rotilio D, Pastore GM, Duran N. Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B*, 2007b; 45 (3-4): 102–107.

Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Lemery P, Croizier A, Kanny G. Food allergy and IgE sensitization caused by spices: CICBAA data (based on 589 cases of food allergy). *Allergie et immunologie*, 2002; 34(4): 135-140.

- Morgenstern I, Robertson DL, Hibbett DS. Characterization of three mnp genes of *Fomitiporia mediterranea* and report of additional class II peroxidases in the order Hymenochaetales. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010; 76: 6431-6440.
- Mori T, Kondo R. Oxidation of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002; 60: 200-205.
- Morozova OV, Shumakovich GP, Shleev SV, Yaropolov YI. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2007a; 43:523-535
- Morozova V, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI. "Blue" laccases. *Biochemistry-Moscow*, 2007b; 72:1136-1150.
- Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Llauradó G, Marcos J. A note on the in vitro macrophagestimulating activity of water-soluble extracts from mycelium of Pleurotus spp. *Food Agric Immunol*. 2007; 18 (1):31-37.
- Myasoedova N, Chernykh A, Psurtseva N, Belova N, Golovleva L. New efficient producers of fungal laccases. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008; 44:73-77.
- Neifar M, Elleouze-Ghorbel R, Kamoun A, Baklouti S, Mokni A, Jaouani A, Chaabouni S E. Effective clarification of pomegranate juice using laccase treatment optimized by response surface methodology followed by ultrafiltration. *J. Food Eng*. 2011; 34:1199-1219.
- Nestorsson A, Neoh KG, Kang ET, Järnström L. Enzyme immobilization in latex dispersion coatings for active food packaging. *Packaging Technology and Science*, 2008;21: 193–205.
- Nigam P, Armour G, Banat IM, Singh D, Marchant R. Physical removal of textile dyes and solid state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresour. Technol*. 2000; 72: 219-226.
- Nilsson I, Möller A, Mattiasson B, Rubindamayugi M, Welander U. Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006; 38:94-100.
- Novo Nordisk A/S, Norway. Debittering and darkening of olives by laccase treatment. *Research Disclosure*. 1995; 378, 676.

- Osma JF, Toca-Herrera JL, Rodríguez-Couto S. Uses of Laccases in the Food Industry. Enzyme Research, 2010, 918761.
- Palmer AE, Lee SK, Solomon EI. Decay of the Peroxide Intermediate in Laccase: Reductive Cleavage of the O–O Bond. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123 (27): 6591–6599.
- Palmieri G, Cennamo G, Sannia G. Remazol Brilliant Blue R Decolourisation by the Fungus *Pleurotus ostreatus* and Its Oxidative Enzymatic System. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005; 36 (1, 6):17-24.
- Pandey A, Singh P, Iyengar L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007; 59(2): 73–84.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease". *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2009; (2,5): 270.
- Papinutti VL, Forchiassin F. Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Letters*, 2004; 231 (2) 205–209.
- Papinutt V, Diorio L, Forchiassin F. Degradation of poplar wood by *Fomes sclerodermeus*: production of ligninolytic enzymes in sawdust of poplar and cedar. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2003; 20:16-20.
- Paszczynski A, Crawford, R. L. Degradation of azo compounds by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*. Involvement of veratryl alcohol. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1991; 178: 1056-1063.
- Perlman DA. Oxidative stabilization of omega-3 fatty acids in low linolenic acid containing peanut butter. 2005. US Pat.7344747B2.
- Petersen BR, Mathiasen TE, Peelen B, Andersen H. Desoxygenation of an oil product with a laccase. 1999. US Pat.5980956^a
- Petersen BR, Mathiasen TE. Deoxygenation of a food item using a laccase. PCT Int. Appl. 1996. WO 9631133 A1.
- Pezzella C, Guarino L, Piscitelli A. How to enjoy laccases. Multi-Author review. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015; 72:923–940.
- Pignitter M, Somoza V, Critical Evaluation of Methods for the Measurement of Oxidative Rancidity in Vegetable Oils. *J. Food Drug Anal.* 2012; 20: 772-777.

- Piscitelli A, Giardina P, Lettera V, Pezzella C, Sannia G Faraco V. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics*. 2011; 12:104-112.
- Pointing SB, Vrijmoed L. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2000; 16:317-318.
- Polaina J, MacCabe AP. Industrial enzymes structure, function and applications. Springer, Dordrecht. 2007.
- Pourcel L, Routabou J, Cheynier M, Lepiniec ML, Debeaoujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 2006; 12: 29–36.
- Pozdnyakova NN, Rodakiewicz-Nowak J, Turkovskaya OV. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004; 30: 19-24.
- Quarantino DA, D'Annibale F, Federici C, Ceretti F, Rossini F, Fenice M. Enzyme and fungal treatments and a combination thereof reduce olive mill wastewater phytotoxicity on *Zea mays* L. sedes. *Chemosphere*, 2007; 66 (9):1627–1633.
- Raghukumar C, Mohandass C, Kamat S, Shailaja MS. Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat. *Enzyme Microb Technol* 2004; 35: 197-202.
- Rajakumar S, Gaskell J, Cullen D, Lobos S, Karahanian E, Vicuna R. Lip-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispora*, white rot fungi with no detectable lignin peroxidase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996; 62:2660-2663.
- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*, 2004; 3:29-60.
- Rao M, Scelza R, Acevedo F, Diez M, Gianfreda L. Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*, 2014; 107:145-162.
- Ray CR, Rosell CM. *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*. Food biology series. CRC Press; 2017. 520 p.

Renzetti S, Courtin CM, Delcour JA, Arendt EK. Oxidative and proteolytic enzyme preparations as promising improvers for oat bread formulations: rheological, biochemical and microstructural background. *Food Chemistry*, 2010; 119 (4): 1465–1473.

Revankar MS, Lele S. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. *Process Biochemistry*, 2006; 41:581-588.

Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 2006; 24 (5): 219–226.

Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Biores Technol*. 2001; 77: 247-255.

Rodriguez-Couto S. Laccases for denim bleaching: An eco-friendly alternative. *Sigma*, 2012; 1: 10-12.

Salvachúa D, Prieto A, Martínez AT, Martínez MJ. Characterization of a novel DyP-type peroxidase from Irpex lacteus and its application in the enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013; 79: 4316–4324.

Sammartino M, Piacquadio P, De Stefano G, Sciancalepore V. Apple juice stabilization by conventional and innovative methods. *Industrie delle Bevande*, 1998; 27: 367–369.

Sanchez-Ferrer A, Rodríguez-Lopez JN, García-Casanovas F, García-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, *Biochim. Biophys.* 1995; 1-11.

Santhanam N, Vivanco JM, Decker SR, Reardon KF. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends Biotechnol*. 2011; 29: 480–489.

Santos FA, Queiróz JD, Colodette JL, Fernandes SA, Guimarães VM, Rezende ST. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*. 2012; 35:1004-1010.

Schliephake K, Lonergan GT. Laccase variation during dye decolourisation in a 200 L packed-bed bioreactor *Biotechnol. Lett.* 1996; 18: 881- 886.

Schobinger U, Barbic I, Du" rr P, Waldvogel R. Phenol compounds in apple juice-positive and negative effects. *Fruit Processing*, 1995; 5: 171–178.

- Shleev S, Morozova O, Nikitina O, Gorshina E, Rusinova T, Serezhenkov V, Burbaev D, Gazaryan I, Yaropolov A. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie*. 2004; 86: 693-703.
- Shutova V, Revin V, Myakushina YA. The effect of copper ions on the production of laccase by the fungus *Lentinus (Panus) tigrinus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2008; 44: 619-623.
- Spanos GA, Wrolstad RE. Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage. A review. *J. Agric. Food. Chem.* 1992; 40: 1478-87.
- Saparrat MCN, Cabello M, Arambarri AA. Extracellular laccase activity in *Tetraploa aristata*. *Biotechnology Letters*, 2002; 24:1375-1377.
- Saparrat MCN. Optimizing production of extracellular laccase from *Grammothele subargentea* CLPS no. 436 strain. *World J Microbiol Biotechnol*. 2004; 20: 583-6.
- Sathishkumar P, Murugesan K, Palvannan T. Production of laccase from *Pleurotus florida* using agro-wastes and efficient decolorization of Reactive blue 198. *Journal of Basic Microbiology*, 2010; 50:360-367.
- Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects- A review. *J. Functional Foods*. 2015; 18: 820-897.
- Silva L, Garcia B, Paiva-Martins F. Oxidative stability of olive and its polyphenolic compounds after boiling vegetable process. *LWT—Food Science and Technology*, 2010; 43: 1336–1344.
- Silva R. Industrias de celulosa y papel: calidad, medioambiente y biotecnología. *Ambiente forestal, Revista de Extensión*, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. 2006; 1: 26-33.
- Sin HN, Yusof S, Sheikh Abdul Hamid N, Rahman R. Optimization of enzymatic clarification of sаподilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 2006; 73: 313-319.
- Singer A, Nogala-Kaluka M, Lampart-Szczapa E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J. Food Lipids*, 2008; 15: 137–149.

Singh P, Sulaiman O, Hashim R, Rupani P, Peng LC. Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio Technology*. 2010; 9:141-151.

Singh G, Kaur K, Puri S, Sharma P. Critical factors affecting laccase-mediated biobleaching of pulp in paper industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015; 99:155-164.

Songulashvili G, Elisashvili V, Wasser S, Nevo E, Hadar Y. Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. *Biotechnology Letters*. 2006; 28:1425-1429.

Strong PJ, Burgess JE. Treatment methods for winerelated and distillery wastewaters: a review. *Bioremediation Journal*. 2008; 12 (2):70-87.

Stutz C. The use of enzymes in ultrafiltration. *Fruit Processing*, 1993; 3: 248-252.

Suárez Arango C, Nieto IJ. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2013; 30(1, 3): 1-8.

Sumandono T, Saragih H, Migirin, Watanabe T, Amirta R. Decolorization of Remazol Brilliant Blue R by New Isolated White Rot Fungus Collected from Tropical Rain Forest in East Kalimantan and its Ligninolytic Enzymes Activity. *Procedia Environmental Sciences*, 2015; 28: 45-51.

Stoilova I, Krastanov A, Stanchev V. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2010; 1: 208-215.

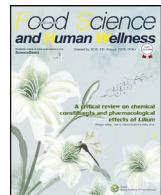
Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A. *Plant physiology and development*. Sinauer Associates, 2015. Inc, Maryland.

Tajchakavit S, Bélanger D, Boye J, Couture R. Kinetics of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice. *Food Research International Volume*; 2001; 34 (5): 431-440.

Takemori T, Ito Y, Ito M, Yoshama M. Flavor and taste improvement of cacao nib by enzymatic treatment. *Japan Kokai Tokkyo Koho*. 1992; JP 04126037 A2.

- Tanri D, Eks A. Phenolic compounds in pear juice from different cultivars. *Food Chemistry*, 2005; 93(1): 89–93.
- Tekere M, Zvauya R, Read JS. Ligninolytic enzyme production in selected sub-tropical white rot fungi under different culture conditions. *Journal of Basic Microbiology*. 2001; 41:115-129.
- Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994; 140: 19-26.
- Tomás-Barberán FA, Gil MI, Paedar Cremin AL, Waterhouse B, Hess-Pierce L, Kader A. HPLC-DAD-ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines, Peaches, and Plums. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001; (49): 4748-4760.
- Ullah R, Nadeem M, Khalique A, Imran M, Mehmood S, Javid A, Hussain J. Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica L.*): a review. *Journal of Food Science and Technology*, 2015; 53(4): 1750–1758.
- Vaillant F, Millan P, O'Brien G, Dornier M, Decloux M, Reynes M. Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering*, 1999; 42: 215–224.
- Valls C, Molina S, Vidal T, José C, Colom JF, Martínez AT, Gutierrez A, Roncero, MB. Influence of operation conditions on laccase-mediator removal of sterols from Eucalypt pulp. *Process Biochemistry*, 2009; 44:1032-1038.
- Vanholme R, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin engineering. *Current Opinion in Plant Biology*. 2008; 11: 278-285.
- Van Niekerk PJ, Burger AEC. The Estimation of the Composition of Edible Oil Mixtures, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1985; 62:531–538.
- Virk AS, Hall W, Summerscales J. Modulus and strength prediction for natural fibre composites. *Materials Science and Technology*, 2012; 28: 864-871.
- Walker JM, Sweeney P. Production of Protein Hydrolysates Using Enzymes. *The Protein Protocols Handbook* third edition. 2009; 989-993.
- Wan C, Li Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, 2012; 30:1447-1457.
- Waraho T, Decker E. Mechanisms of Lipid Oxidation in Food Dispersions. *Trends in Food Science & Technology*, 2011; 22: 3-13

- Wolfand JM, LeFevre GH, Luthy RG. Metabolization and degradation kinetics of the urban-use pesticide fipronil by white rot fungus *Trametes versicolor*. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2016; 18:1256-1265.
- Witayakran S, Ragauskas AJ. Synthetic applications of laccase in green chemistry. *Adv. Synth. Catal.*, 2009; 351: 1187-1209.
- Wong DW. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009 157:174-209.
- Yan J, Chen D, Yang E, Niu J, Chen Y, Chagan I. Purification and characterization of a thermotolerant laccase isoform in *Trametes trogii* strain and its potential in dye decolorization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014; 93:186-194.
- Yang Q, Yang M, Pritsch K, Yediler A, Hang A, Schloter M, Kettrup A. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. *Biotechnol Lett*. 2003; 25: 709-713.
- Zabel RA, Morrell JJ. *Wood microbiology: decay and its prevention*. Academic press, 2012. Londres.
- Zherdev AV, Bizova NA, Yaropolov AI, Lyubimova NV, Morozava OV, Dzantiev BB. Laccase from *Coriolus hirsutus* as alternate label for enzyme immunoassay, *Appl Biochem Biotechnol*, 1999; 76: 203.
- Ziegenhagen D, Hofrichter M. A simple and rapid method to gain high amounts of manganese peroxidase with immobilized mycelium of the agaric white-rot fungus *Clitocybula dusenii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2000; 53:553-557.
- Zucca P, Cocco G, Sollai F, Sanjust E. Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes. *Biocatalysis*, 2000; 1.
- Zhuo R, Ma L, Fan F, Gong Y, Wan X, Jiang M, Zhang X, Yang Y. Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain *Ganoderma* sp. En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene. *Journal of Hazardous Materials*, 2011; 192: 855-873.



Effect of laccase from *Trametes versicolor* on the oxidative stability of edible vegetable oils



G.K. Guerberoff*, C.C. Camusso

Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Valparaíso s/n, Córdoba Capital, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2019

Received in revised form 10 August 2019

Accepted 26 September 2019

Available online 7 October 2019

Keywords:

Laccase

Trametes versicolor

Vegetable oils

Oxidative stability

ABSTRACT

The increasing demand of natural food from consumers has limited the use of traditional methods to control the oxidation of lipids, such as synthetic antioxidants and hydrogenation. Besides, it has been reported that the use of enzymes is efficient to eliminate dissolved oxygen in foods such as vegetable oils. Laccase is a polyphenol oxidase and the reduction of oxygen to water is accompanied by the oxidation, typically, of a phenolic substrate. Laccase have become important, industrially relevant enzymes that can be used for a number of diverse applications such waste detoxification, textile dye transformation, food technologic uses, biosensor and analytical applications, bioethanol production, among others. The target of this study was to evaluate the effect of laccase enzyme from *Trametes versicolor*, on the oxidative stability of sesame, chia, peanut and sunflower oils, measured through the peroxide value (PV) and conjugated dienes (K232) and trienes (K270). The samples of oil with laccase showed higher PV, K232 and K270 than their corresponding controls, under the conditions evaluated (room temperature and 60 °C). The results suggest that fungal laccase has an unexpected pro-oxidant effect on vegetable oils, possibly promoted by products derived from the oxidation of phenols by enzymatic action.

© 2019 "Society information". Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co., Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

A lot of food is prepared with vegetable oils that contain a large amount of unsaturated fatty acids that react with dissolved oxygen generating strange odors and flavors, decreasing shelf life and the nutritional value [1]. These degraded products have harmful effects on human health [2,3].

The process of oxidation of lipids in food occurs through a series of chain reactions of free radicals. The classic route of autoxidation includes initiation (production of lipid free radicals), propagation and termination (production of non-radical products) reactions. This process starts with small amounts of oxygen, which is difficult to avoid; however, it can be controlled or delayed by using properly the different conservation techniques, combined with the use of antioxidants [4]. Among the most used synthetic antioxidants in the

food industry are the BHA (Butylated hydroxyanisole), BHT (Butylated hydroxytoluene) and TBHQ (Tertiary-butyl hydroquinone). The use of these compounds is being increasingly questioned because negative effects on health are attributed to them [5]. For this reason, in recent years, there has been a growing interest in the study and application of natural antioxidants or the incorporation of non-toxic natural components for the processing of food [6].

Laccase (EC 1.10.3.2, p-diphenol oxidase) catalyze the oxidation of phenolic substrates and the reduction of molecular oxygen to water [7–10]. According to phylogenetic analyzes most fungal laccase enzymes are found in white rot fungi [11]. It is one of the main enzymes involved in delignification; furthermore, on occasions, the presence of laccase has been described as the only ligninolytic activity in fungi that degrade lignin or other aromatic compounds with great environmental impact [12].

Many reviews discuss the potential applications of laccase in different forms in the food industry such as wine stabilization, beverage processing, sugar beet pectin gelation, baking and as a biosensor [13–18].

Laccase scavenges O₂ which would otherwise react with fatty acids, amino acids, proteins and alcohols to form off-flavour precursors. This application can be found in the commercial preparation Flavourstar (Novozymes), which was developed for brewing and based on the laccase from *Myceliophthora thermophila* [19]. More-

* Corresponding author.

E-mail address: gguerberoff@agro.unc.edu.ar (G.K. Guerberoff).

Peer review under responsibility of KeAi Communications Co., Ltd.



over, it has been shown that oxygen-reducing enzymes, such as glucose oxidase and laccase, have the potential to catalyze the elimination of oxygen in active packages of food packages [20–22].

Petersen and Mathiasen [23] demonstrated that laccase can particularly improve the sensory attributes of foods that are high in fat and contain endogenous phenolic compounds, by reducing the available oxygen. Cold pressed seed oils contain phenols at a concentration range from 18 to 99 ppm caffeic acid equivalents (CAEs) [24]. The depletion of intrinsic phenols in vegetables oils, catalyzed by exogenous enzymes in contact with the oil, was also reported [25,26].

The objective of this work was to obtain a laccase extract from one strain of white rot fungi belonging to the *Trametes* genus and to analyze the effect of this on the oxidative stability of several vegetable oils.

2. Materials and methods

2.1. Oil samples

The vegetable oils were obtained by cold pressing from sesame, chia, peanut and sunflower seeds. These were obtained by a manual hydraulic press of 20 Tn.

Cold-pressed oils may retain higher levels of natural antioxidants that may be removed during the refining steps of a conventional oil processing procedure. In addition, cold pressing involves no organic solvent, which results in a product that is chemically contaminant free [27].

2.2. Laccase extract

2.2.1. Organism

The fungal strain and culture media were selected taking into account previous data from the working group, and other authors, on the laccase production of some native rot fungi [28]. The fungal strain was *Trametes versicolor* BACF (Buenos Aires Facultad de Ciencias) 2234 belonging to the cepary of the Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires and contributed by the Instituto Misionero de Biodiversidad (IMiBio), Puerto Iguazú, Misiones-Argentina. The inoculum was maintained at 4 °C on 2% (m/V) potato agar solid medium, until required.

2.2.2. Media and culture conditions

Laccase was produced in a liquid medium containing (g L⁻¹): glucose, 40; yeast extract, 5; meat peptone, 5; Mg SO₄·7H₂O, 1 [29]. It was added with (mg L⁻¹) CuSO₄·5H₂O, 0.4; to induce even more laccase activity [30–32]. The pH of the solution was adjusted to 6.3 ± 0.4. Although the optimal pH for oxidation of phenolic substrates is around 4 but *T. versicolor* laccase is most stable at pH 6–7 [33,34]. The medium was sterilized by autoclaving at 120 °C for 20 min.

The inoculation was done in 300 mL of medium contained in 1000 mL Erlenmeyer flasks. Three agar blocks, of 0.5 cm³ each, were removed from edge of a colony grown on solid medium. The cultures were incubated at 28 °C under static and dark conditions for 21 days.

2.2.3. Extract preparation

The culture liquid was separated from the mycelium by gentle filtration through Whatman filter paper and concentrated by dialysis against sucrose through a semi-permeable regenerated cellulose membrane of 25 mm × 16 mm of Sigma-Aldrich [35]. The extract was filtered by syringe filter of 0.45 µm × 25 mm of polyvinyl difluoride (PVDF) from Biopore. This concentrated extract was taken as the source of laccase.

The culture liquid was separated from the mycelium by gentle filtration through Whatman filter paper and concentrated by dialy-

sis against sucrose through a semi-permeable regenerated cellulose membrane of 25 mm × 16 mm of Sigma-Aldrich [35]. The extract was filtered by syringe filter of 0.45 µm × 25 mm of polyvinyl difluoride (PVDF) from Biopore. This concentrated extract was taken as the source of laccase.

2.2.4. Determination of laccase activity

Laccase extract activity assayed using 5 mmol/L 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) (77.1 mg/100 mL acetate buffer pH 3.6) (E469 = 27,500 mol/L·cm) [36]. The enzymatic reaction was carried out at room temperature (25 °C) and one unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme oxidizing one µmol of substrate per min. The laccase activity was triplicate by the enzymatic concentration process carried out reaching 32 U/mL.

2.3. Oxidative stability analysis

2.3.1. Peroxide value (PV)

Peroxides are formed in the primary phase of oxidation. It is the measure used most frequently during the production of vegetable oils [37]. This was determined using the analytical methods described by El-Shattory et al. [38]. In this case, the sample (0.025 g) was mixed in a glass tube with 9.8 mL chloroform-methanol (7:3) on a vortex for 10 s. Then 50 µL of NH₄SCN 30% m/V solution and FeCl₂ 0.2% solution were added, and the sample was mixed on a vortex for 10 s. The reaction mixture was incubated at room temperature for 5 min. Absorbance of the red complex was read in a Shimadzu UV 1800 spectrophotometer at 500 nm against a blank containing the whole reagent, except the sample. The procedure occurred in low light and completed in 10 min. The quantification was referred to a standard calibration curve made with FeCl₃. The PV was expressed as milliequivalents of peroxides per kilogram of oil (mEq Px/kg).

$$PV = \frac{(A_s - A_b) \times m}{55.84 \times W} \times 2 \quad (1)$$

Where: A_s: absorbance of the sample; A_b: absorbance of the target; m: slope of the calibration curve; 55.84: iron atomic weight; W: grams of oil in the sample. The factor 2 is necessary to express the peroxide value as milliequivalents of peroxides instead of milliequivalents of oxygen.

2.3.2. Conjugated dienes (K232) and conjugated trienes (K270)

After peroxides formation, in the primary phase of oxidation, the rearrangement of the double and triple bonds of the fatty acids originate the conjugated dienes and trienes [39]. In this experience, an aliquot (20 µL) of the reaction mixture was placed in a volumetric flask and weighed accurately. It was prepared with 10 mL of hexane and stirred for 5 min, and then the absorption spectrum was recorded [40]. The results was

$$K_\lambda = \frac{A_\lambda}{b.c} \quad (2)$$

Where: K_λ: specific extinction coefficient at the wavelength λ; A_λ: absorbance read in the spectrophotometer at the wavelength λ; b: thickness in cm of the cuvette c: oil concentration of the solution in g/100 mL.

2.3.3. Statistical analysis

The set of analytic determinations was carried out in triplicate. All data are presented as means ± SD and were derived with the Infostat statistical software [41]. Difference between means was performed by ANOVA. The level of statistical significance was accepted at P ≤ 0.05.

Table 1

Peroxide Value (mEq Px/kg) in vegetable oils treated with laccase.¹ Different letters indicate significant difference ($P \leq 0.05$)².

	Sample	Days			
		0	3	11	18
Chia	LAC w/air	2.1 ± 0.4 ^a	3.3 ± 0.7 ^a	5.4 ± 0.6 ^a	16.7 ± 0.1 ^a
	LAC w/o air	1.9 ± 0.1 ^a	2.9 ± 0.2 ^a	5.3 ± 0.8 ^a	15.8 ± 0.5 ^a
	Fresh w/air	1.9 ± 0.2 ^a	2.3 ± 0.3 ^a	4.8 ± 0.1 ^a	13.9 ± 0.9 ^b
	Fresh w/o air	1.9 ± 0.2 ^a	2.2 ± 0.3 ^a	4.2 ± 0.4 ^a	12.1 ± 0.9 ^b
Sunflower	LAC w/air	1.5 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.1 ^a	3.2 ± 0.1 ^a	8.1 ± 0.4 ^a
	LAC w/o air	1.5 ± 0.3 ^a	1.6 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.3 ^a	7.8 ± 0.3 ^a
	Fresh w/air	1.2 ± 0.6 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	2.7 ± 0.1 ^a	6.8 ± 0.3 ^b
	Fresh w/o air	1.2 ± 0.4 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	2.7 ± 0.1 ^a	7.0 ± 0.3 ^b
Peanut	LAC w/air	3.5 ± 0.3 ^a	4.6 ± 0.1 ^a	5.3 ± 0.5 ^a	11.1 ± 0.5 ^a
	LAC w/o air	3.5 ± 0.1 ^a	4.4 ± 0.1 ^a	5.2 ± 0.5 ^a	10.9 ± 0.4 ^a
	Fresh w/air	3.3 ± 0.5 ^a	4.2 ± 0.1 ^a	5.1 ± 0.5 ^a	9.7 ± 0.3 ^b
	Fresh w/o air	3.4 ± 0.4 ^a	4.0 ± 0.1 ^a	5.0 ± 0.5 ^a	9.2 ± 0.3 ^b
Sesame	LAC w/air	4.0 ± 0.4 ^a	6.6 ± 0.1 ^a	8.5 ± 0.4 ^a	11.8 ± 0.6 ^a
	LAC w/o air	3.7 ± 0.1 ^a	6.6 ± 0.2 ^a	8.1 ± 0.9 ^a	10.4 ± 0.2 ^a
	Fresh w/air	3.5 ± 0.1 ^a	6.4 ± 0.3 ^a	8.1 ± 0.1 ^a	10.0 ± 0.2 ^b
	Fresh w/o air	3.5 ± 0.1 ^a	5.9 ± 0.3 ^a	7.8 ± 0.1 ^a	9.5 ± 0.2 ^b

Legend: LAC w/air, oil with laccase and with atmospheric air; LAC w/o air, oil with laccase and without atmospheric air; Fresh w/air, oil fresh with atmospheric air; Fresh w/o air, oil fresh without atmospheric air.

¹Each sample "LAC" contained 3.2 U/mL laccase from *Trametes versicolor*.

²ANOVA was between LAC and Fresh (w/air and w/o air) in each oil and each time.

Table 2

Conjugated dienes (K232) in vegetable oils treated with laccase¹ Different letters indicate significant difference ($P \leq 0.05$)².

Vegetable Oil	Sample	Time in Days			
		0	3	11	18
Chia	LAC	1.3 ± 0.4 ^a	1.3 ± 0.5 ^a	1.4 ± 0.6 ^a	4.7 ± 0.1 ^a
	Fresh	1.2 ± 0.2 ^a	1.3 ± 0.3 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	3.5 ± 0.9 ^b
Sunflower	LAC	0.8 ± 0.4 ^a	1.1 ± 0.1 ^a	2.2 ± 0.1 ^a	4.3 ± 0.5 ^a
	Fresh	0.8 ± 0.6 ^a	0.9 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.2 ^a	3.2 ± 0.3 ^b
Peanut	LAC	1.5 ± 0.3 ^a	1.6 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.5 ^a	2.7 ± 0.6 ^a
	Fresh	1.4 ± 0.4 ^a	1.5 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.5 ^a	2.0 ± 0.3 ^b
Sesame	LAC	1.8 ± 0.2 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	3.0 ± 0.4 ^a	3.8 ± 0.6 ^a
	Fresh	1.7 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.3 ^a	2.8 ± 0.1 ^a	3.1 ± 0.2 ^b

Legend: LAC, oil with laccase; Fresh, oil fresh.

¹Each sample "LAC" contained 3.2 U/mL laccase from *Trametes versicolor*.

²ANOVA was between LAC and Fresh in each oil and each time.

2.4. Experimental design

The samples treated with laccase (LAC) contained 3 mL of vegetable oil, 100 µL of enzymatic extract of *Trametes versicolor* BACF 2234 (32 U/mL) and 100 µL of citrate-phosphate buffer pH 5. This corresponds to the optimum pH for the action of the fungal laccase, according to the bibliography [19]. The control samples (Fresh) were prepared the same manner except the enzymatic extract was inhibited with 0.1 mmol/L sodium azide [42].

According to the reaction conditions, two treatments were tested:

- **Treatment 1:** the samples were incubated at room temperature of 28 °C for 18 days; in static and dark conditions, covered.
- **Treatment 2:** the samples were kept under accelerated conditions of 60 °C in the oven, for 72 h. Hypothetically, one day at 60–65 °C should correspond to one month of storage at room temperature of a vegetable oil [43].

3. Results and discussion

3.1. Peroxide value (PV) in Treatment 1

The peroxide values observed in vegetable oils, were collected in Table 1.

As can be observed, the increase in the PVs was gradual until day 11 and it was significant on day 18, for the treated and untreated samples.

As for the effect of the enzyme, the PV was surprisingly increased. However, the differences between LAC and Fresh were statistically significant ($P \leq 0.05$) from day 18 of reaction.

In detail, in LAC, the amount of peroxides was between 8 and 17 mEq Px/kg on day 18, while in Fresh, the values were between 7 and 14 mEq Px/kg approx.

Chia oil showed a higher PV, these were 13.9 and 16.7 mEq Px/kg in Fresh and LAC, respectively. This may be due to its high content of linolenic acid (C_{18:3}) (60% of total fatty acids) that confers susceptibility to oxidation [44].

The effect of the absence of oxygen, by vacuum application, was also determined in this treatment. The LAC and Fresh showed no significant differences on the PV with respect to them in the presence of oxygen (Table 1).

Assuming that laccase treatment is capable of playing the role of oxygen scavenger, it was expected to be more efficient than phenolic compounds in protecting oils from oxidation. On the contrary, a pro-oxidant effect was observed, which could be promoted by a route other than oxygen from the air and related to the phenols oxidized by the enzyme, under the conditions tested.

Other authors also found contrary results to those expected. They studied the oxidation of linoleic acid in presence of laccase and

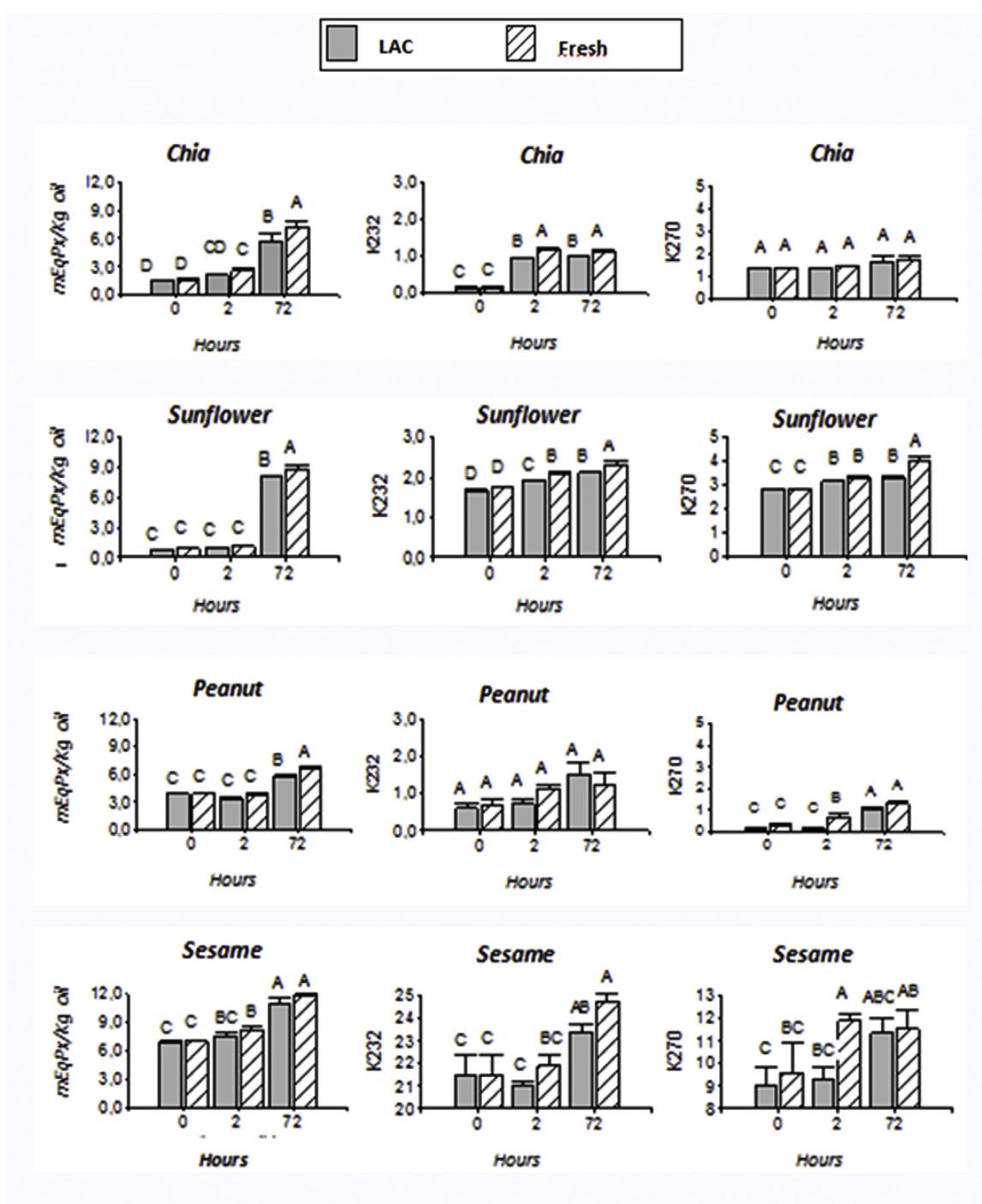


Fig. 1. Evolution of Peroxide Values (mEqPx/kg Oil), conjugated dienes (K232) and conjugated trienes (K270) in vegetable oils (chia, sunflower, peanut, sesame) treated with laccase (LAC) and its corresponding controls (Fresh), stored during 72 h at 60°C. Columns with different letter are statistically different ($P \leq 0.05$) according to Fisher's test. The bars represent the error. The results are based on triplicate measurements.

p-hydroxycinnamic, sinapic, ferulic and p-coumaric acids, which are substrates of the enzyme and also powerful antioxidants, however the results showed that p-coumaric acid has a high capacity to peroxidate unsaturated lipids once it is oxidized by laccase [45].

3.2. Conjugated Dienes (K232) and Conjugated Trienes (K270) in Treatment 1

The evolution of oxidation at 28°C through the specific extinction coefficients at 232 nm and 270 nm are shown in the Tables 2 and 3, respectively.

K232 showed higher values in the samples with the enzyme. The differences were significant on day 18, as was the case with the peroxides. Chia oil, followed by sunflower oil, showed the greatest alteration about this coefficient. In detail, these were 4.7 and 4.3 mEq Px/kg, respectively. This could be explained by the high content of polyunsaturated fatty acids in these oils, which are 90% for sunflower oil and 80% for chia oil, approx [47,44].

Other authors measured the relationship between the composition of the fatty acids, PV and K232 during the oxidation of various sunflower oils and found a lower slope for the oil with a lower degree of unsaturation [48].

Table 3

Conjugated trienes (K270) in vegetable oils treated with laccase¹ Different letters indicate significant difference ($P \leq 0.05$)².

Vegetable Oil	Sample	Time in Days			
		0	3	11	18
Chia	LAC	0.4 ± 0.05 ^a	0.7 ± 0.07 ^a	1.0 ± 0.3 ^a	1.7 ± 0.2 ^a
	Fresh	0.4 ± 0.04 ^a	0.6 ± 0.06 ^a	0.9 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.4 ^b
Sunflower	LAC	0.2 ± 0.05 ^a	0.3 ± 0.05 ^a	0.4 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.3 ^a
	Fresh	0.2 ± 0.04 ^a	0.2 ± 0.04 ^a	0.3 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.2 ^b
Peanut	LAC	0.1 ± 0.06 ^a	0.1 ± 0.05 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.6 ^a
	Fresh	0.1 ± 0.05 ^a	0.1 ± 0.03 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.2 ^b
Sesame	LAC	0.1 ± 0.02 ^a	0.3 ± 0.06 ^a	0.6 ± 0.6 ^a	1.9 ± 0.4 ^a
	Fresh	0.1 ± 0.03 ^a	0.2 ± 0.05 ^a	0.4 ± 0.5 ^a	1.3 ± 0.2 ^b

Legend: LAC, oil with laccase; Fresh, oil fresh.

¹Each sample "LAC" contained 3.2 U/mL laccase from *Trametes versicolor*.

²ANOVA was between LAC and Fresh in each oil and each time.

K270 also showed greater increase in the samples with the enzyme, with significant differences towards day 18 (Table 3). Sesame oil obtained the highest values of conjugated trienes in LAC (1.9 ± 0.4).

3.3. Peroxide value (PV) in Treatment 2

Results relative to PV in the accelerated oxidation conditions carried out at 60 °C and 72 h were collected in Fig. 1.

The samples with the enzyme showed higher PVs, with significant differences ($P \leq 0.05$) at 72 h for chia, sunflower and peanut. The PVs were higher in this treatment, compared to the treatment 1. At 72 h, these were between 7–12 mEq Px/kg versus 1–6 mEq Px/kg for the LAC, in treatment 1 and 2 respectively.

De Leonardis *et al.* [46] reported in 2013, about the effect of laccase on the oxidative stability of olive oil and the role of endogenous phenols in the oxidation process of these oils. They found that olive oil with laccase had a lower resistance to oxidation at higher temperatures, as a consequence of partial depletion of endogenous polyphenols; however, oxidative stability was significantly lower than in chemically desfenzilized oil analogues. These results suggested that the presence of newly formed compounds in oils treated with laccase could promote a pro-oxidant effect.

3.4. Conjugated Dienes (K232) and Conjugated Trienes (K270) in Treatment 2

Experimental data of the oven test in 60 °C have been analyzed according to the Eq. (2), and are illustrated in Fig. 1.

The increase in conjugated dienes was higher in the treated samples. The differences was statistically significant ($P \leq 0.05$) in chia and sunflower oils after 2 h of reaction. However, sesame oil showed the highest coefficients at 232 nm (>21 nm), suggesting that it has low resistance to storage at high temperatures.

The formation of conjugated trienes (K270) showed the same trend as for K232 (Fig. 1). This confirmed the negative effect of laccase on the oxidative stability of vegetable oils.

Petersen *et al.* [49] reported that laccase enzyme is adequate to prevent the oxidation of foods with a high content of vegetable oils because to its effective ability to take dissolved oxygen from the headspace, but those authors did not measure the direct effect on the oxidative stability of the oils.

4. Conclusions

Oxidative stability of vegetables oils depends on several factors such as; the unsaturation degree of fatty acids, the amount and type of antioxidants present, the enzymes action such us polyphenolox-

idases, the availability of oxygen, light and exposure to elevated temperatures.

Our results indicate that laccase enzyme impairs the oxidative stability of edible vegetable oils, due to the increase of peroxide values and conjugated dienes and trienes, after the application of an enzymatic extract of *Trametes versicolor* containing laccase.

It may be argued that several partially oxidized by-products yielded by the enzymatic activity on the phenolic substrates could be responsible for the observed oxidative behavior.

Nevertheless, the application of polyphenol oxidases directly in vegetable oils can be exploited both for analytical purposes and to better understand the antioxidant role played by natural phenolic compounds.

Declaration of Competing Interest

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the Instituto Misionero de Biodiversidad (IMiBio), Puerto Iguazú, Misiones-Argentina, for the donation of fungal strains. This work was funded by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) and Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT) - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

References

- [1] M. Pignitter, V. Somoza, Critical evaluation of methods for the measurement of oxidative rancidity in vegetable oils, J. Food Drug Anal. 20 (2012) 772–777, <http://dx.doi.org/10.6227/jfda.2012200305>.
- [2] A.P. Simopoulos, Essential fatty acids in health and chronic disease, Am. J. Clin. Nutr. 70 (1999) 560–569, <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/70.3.560s>.
- [3] J. Lee, Y. Lee, E. Choe, Effects of sesamol, sesamin, and sesamolin extracted from roasted sesame oil on the thermal oxidation of methyl linoleate, LWT – Food Sci. Technol. 41 (2008) 1871–1875, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.019>.
- [4] J. Alamed, W.D. Chaiyaset, J. McClements, et al., Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 2969–2976, <http://dx.doi.org/10.1021/jf803436c>.
- [5] F. Shahidi, P. Ambigaipalan, Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects- a review, J. Funct. Foods 18 (2015) 820–897, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.
- [6] T. Waraho, E. Decker, Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions, Trends Food Sci. Technol. 22 (2011) 3–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.003>.
- [7] C.H. Kjaergaard, F. Durand, F. Tasca, et al., Spectroscopic and crystallographic characterization of "alternative resting" and "resting oxidized" enzyme forms of bilirubin oxidase: implications for activity and electrochemical behavior of multicopper oxidases, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 5548–5551, <http://dx.doi.org/10.1021/ja211872j>.

- [8] S. Majumdar, T. Lukk, J.O. Solbiati, et al., Roles of small laccases from *Streptomyces* in lignin degradation, *Biochemistry* 53 (2014) 4047–4058, <http://dx.doi.org/10.1021/bi500285t>.
- [9] V. Morozova, G.P. Shumakovich, M.A. Gorbacheva, et al., “Blue” laccases, *Biochemistry Moscow* 72 (2007) 1136–1150, <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297907100112>.
- [10] A.J. Augustine, M.E. Kragh, R. Sarangi, et al., Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* laccase: allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites, *Biochemistry* 47 (2008) 2036–2045, <http://dx.doi.org/10.1021/bi7020052>.
- [11] V. Lettera, A. Piscitelli, G. Leo, et al., Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body, *Fungal Biol.* 114 (2010) 724–730, <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2010.06.004>.
- [12] M.C.N. Saparrat, M. Cabello, A.A. Arambarri, Extracellular laccase activity in *Tetraploa aristata*, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 1375–1377, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1019833607551>.
- [13] J.F. Osma, J.L. Toca-Herrera, S. Rodríguez-Couto, Uses of laccases in the food industry, *Enzyme Res.* (2010), <http://dx.doi.org/10.4061/2010/918761>, Review 8 p.
- [14] S. Witayakran, A.J. Ragauskas, Synthetic applications of laccase in green chemistry, *Adv. Synth. Catal.* 351 (2009) 1187–1209, <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.200800775>.
- [15] J.A. Majeau, S.K. Brar, R.D. Tyagi, Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 2331–2350, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.087>.
- [16] T.M. Bezerra, J.C. Bassan, V.T. De Oliveira Santos, et al., Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice, *Process Biochem.* 50 (2015) 417–423, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.009>.
- [17] V. Lettera, C. Pezzella, P. Cicatiello, et al., Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification, *Food Chem.* 196 (2016) 1272–1278, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.074>.
- [18] R.C. Minussi, G.M. Pastore, N. Durán, Potential applications of laccase in the food industry, *Trends Food Sci. Technol.* 13 (2002) 205–216, [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00155-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00155-3).
- [19] D.M. Mate, M. Alcalde, Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology, *Microb. Biotechnol.* 10 (2016) 1457–1467, <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12422>.
- [20] A. Nestorsson, A.K.G. Neoh, E.T. Kang, et al., Enzyme immobilization in latex dispersion coatings for active food packaging, *Packag. Technol. Sci.* 21 (2008) 193–205, <http://dx.doi.org/10.1002/pts.796>.
- [21] K. Johansson, L.J. Jönsson, L. Järnström, Oxygen scavenging enzymes in coat-ings – effect of coating procedures on enzyme activity, *Nordic Pulp Pap. Res. Int.* 26 (2011) 197–204, *diva2:558159*.
- [22] R. Chatterjee, K. Johansson, L. Järnström, et al., Evaluation of the potential of fungal and plant laccases for active-packaging applications, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 5390–5395, <http://dx.doi.org/10.1021/jf103811g>.
- [23] B.R. Petersen, T.E. Mathiasen, Deoxygenation of a food item using a laccase, *PCT Int. Appl.* WO 9631133 A1.(1996).
- [24] A. Koski, S. Pekkarinen, A. Hopia, et al., Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability, *Eur. Food Res. Technol.* 217 (2003) 110–114, <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-003-0721-4>.
- [25] A. De Leonards, V. Macciola, Polyphenol oxidase from eggplant reduces the content of phenols and oxidative stability of olive oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113 (2011) 1124–1131, <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201100089>.
- [26] L. Silva, B. Garcia, F. Paiva-Martins, Oxidative stability of olive and its polyphenolic compounds after boiling vegetable process, *LWT. Food Sci. Technol.* 43 (2010) 1336–1344, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.013>.
- [27] A. Singer, M. Nogala-Kaluka, E. Lampart-Szczapa, The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils, *J. Food Lipids* 15 (2008) 137–149, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.2007.00107.x>.
- [28] L. Levin, L. Villalba, V. Da Re, et al., Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes, *Process Biochem.* 42 (2007) 995–1002, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2007.03.008>.
- [29] C. Galhaup, S. Goller, C.K. Peterbauer, et al., Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions, *Microbiol. Res.* 148 (2002) 2159–2169, <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-148-7-2159>.
- [30] F. Kuhar, L. Papinutti, Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers, *Rev. Argent. Microbiol.* 46 (2014) 144–149, [http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70063-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70063-X).
- [31] Z.R. Ling, S.S. Wang, M.J. Zhu, et al., An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes* sp. LAC-01, *Int. J. Biol. Macromol.* 81 (2015) 785–793, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac>.
- [32] L. Levin, F. Forchiassin, A. Ramos, Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*, *Mycologia* 94 (2002) 377–383, <http://dx.doi.org/10.1080/15572536.2003.11833202>.
- [33] F. Hong, L.J. Jönsson, K. Lundquist, et al., Oxidation capacity of laccases and peroxidases as reflected in experiments with methoxy-substituted benzyl alcohols, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129 (2006) 303–319, <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-268-7-24>.
- [34] S. Larsson, P. Cassland, L.J. Jönsson, Development of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 1163–1170, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.3.1163-1170.2001>.
- [35] J.M. Walker, P.J. Sweeney, Production of protein hydrolysates using enzymes, in: J.M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*, 3rd ed., 2009, <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7-106>.
- [36] A. Paszczyński, R.L. Crawford, Degradation of azo compounds by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*. Involvement of veratryl alcohol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 (1991) 1056–1063, [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)90999-N](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(91)90999-N).
- [37] R. Farhoosh, R. Niazmand, M. Rezaei, et al., Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110 (2008) 587–592, <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200800004>.
- [38] Y.A. El-shattory, M.A. Saadia, A.F. Hamed, et al., Effect of different reversed micelles on autoxidation and photooxidation of stripped corn oil, *Grasas y Aceites* 54 (2003) 24–29, <http://dx.doi.org/10.3989/gya.2003.v54.i1.272>.
- [39] R.J. Hamilton, *The Chemistry of Rancidity in Foods, Rancidity in Foods*, 3rd ed., Blackie Academic & Professional, London, 1994, pp. 1–21.
- [40] P.I. Antolin, M.M. Meneses, Application of UV-visible spectrophotometry to study of the thermal stability of edible vegetable oils, *Grasas y Aceites* 51 (6) (2000) 424–428, <http://dx.doi.org/10.3989/gya.2000.v51.i6.461>.
- [41] J.A. Di Renzo, F. Casanoves, M.G. Balzarini, et al., *Software de cómputo*, Facultad de Ciencias Agropecuarias, version, Universidad Nacional de Córdoba, RA, 2017.
- [42] C. Johannes, A. Majcherczyk, Laccase activity tests and laccase inhibitors, *BioTechnology* 78 (2000) 193–199, [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-1656\(00\)00208-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-1656(00)00208-X).
- [43] H.A. Abou-Ghribia, F.I. Shahidi, A.A.Y. Shehata, et al., Oxidative stability of extracted sesame oil from raw and processed seeds, *J. Food Lipids* 3 (1996) 59–72, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.1996.tb00054.x>.
- [44] R. Ullah, M. Nademeen, A. Khalique, et al., Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review, *J. Food Sci. Technol.* 53 (2015) 1750–1758, <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-015-1967-0>.
- [45] S. Camarero, A.I. Cañas, P. Nousiainen, et al., P-Hydroxyphenyl cinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 6703–6709, <http://dx.doi.org/10.1021/es8008979>.
- [46] A. De Leonards, A. Roggero, A.C. Vicenzo Macciola, Effects of polyphenol enzymatic-oxidation on the oxidative stability of virgin olive oil, *Food Res. Int.* 54 (2013) 2001–2007, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.034>.
- [47] K. Chowdhury, L.A. Banu, S. Khan, et al., Studies on the fatty acid composition of edible oil, *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 42 (3) (2007) 311–316, <http://dx.doi.org/10.3329/bjsir.v42i3.669>.
- [48] B.S. Marmesat, A. Morales, J. Velasco, et al., Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation, *Grasas y Aceites* 60 (2009) 155–160, <http://dx.doi.org/10.3989/gya.096908>.
- [49] B.R. Petersen, T.E. Mathiasen, B. Peelen, et al., Deoxygenation of an oil product with a laccase US Pat. 5980956A, (1999).