



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES TIROSINASA- SUSTRATO EN PRESENCIA DE NANOMATERIALES

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: Sara Muñoz Pina

TUTOR/A ACADÉMICO: Ana María Andrés Grau
COTUTOR/A: Ángel Luis Argüelles Foix
DIRECTOR EXPERIMENTAL: José Vicente Ros Lis

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, 1 de julio de 2016.

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES TIROSINASA-SUSTRATO EN PRESENCIA DE NANOMATERIALES

Sara Muñoz Pina, Ana María Andrés Grau¹, Ángel Luis Argüelles Foix¹, José Vicente Ros Lis¹.

RESUMEN

La apariencia de un alimento es el primer factor que condiciona al consumidor a la hora de escoger un producto. El oscurecimiento en frutas y verduras cortadas se debe fundamentalmente al pardeamiento enzimático, el cual se produce por la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO). En el marco del presente estudio se ha profundizado en el potencial de un material mesoporoso de sílice, sin funcionalizar (UVM-7) y funcionalizado con tioles (UVM-7-SH), para la inhibición de la tirosinasa, tanto en sistemas modelo como en zumos de manzana. En el presente trabajo se presentan los resultados de caracterización del material, los resultados de los ensayos de cinética enzimática de la tirosinasa frente a distintos sustratos y condiciones de pH en sistemas modelo, y finalmente, los resultados de las pruebas de aplicación en zumos de manzana. Los resultados confirman que en presencia de material UVM-7-SH la actividad enzimática se reduce notablemente hasta valores similares a los obtenidos mediante procesos de acidificación. Por otro lado se observa que la actividad enzimática residual depende la cantidad de material presente en el medio, y se ha estimado que el ratio material:enzima capaz de inhibir a la enzima por completo en los sistemas modelo es de 3 mg por 93,75U. En cuanto a los sistemas reales, se observó que el material UVM-7-SH consigue inhibir por completo el pardeamiento enzimático en zumos de manzana (cv. Granny Smith y cv. Golden Delicious).

PALABRAS CLAVE: PPO, tirosinasa, dopamina, UVM-7, zumos

RESUM

L'aparença d'un aliment és el primer factor que condiciona al consumidor a l'hora d'escollir un producte. L'enfosquiment en fruites i verdures tallades es deu a l'enfosquiment enzimàtic, el qual es produeix per l'acció del enzim polifenol oxidasa (PPO). Al marc del present estudi s'ha aprofundit en la potencial d'un material mesoporós de sílice, sense funcionalitzar (UVM-7) i funcionalitzats amb tiols (UVM-7-SM), per a la inhibició de la tirosinasa, tant en sistemes model com en sucs de poma. En el present treball es presenten els resultats de la caracterització del material, els resultats dels assajos de cinètica enzimàtica de la tirosinasa enfront de diferents substrats i diferents condicions de pH en sistemes model, i finalment, els resultats de les proves

¹Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD-UPV). Universidad Politécnica de Valencia Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

d'aplicació en suc de poma. Els resultats confirmen que en presència de material UVM-7-SH l'activitat enzimàtica es redueix notablement fins a valors similars als obtinguts mitjançant processos d'acidificació. Per altra banda, s'observa que l'activitat enzimàtica residual depèn de la quantitat de material present en el medi, i s'ha estimat que el ràtio material: enzim capaç d'inhibir a l'enzim completament en els sistemes model és de 3mg per 93,75U. Respecte als sistemes reals, es va observar que el material UVM-7-SH aconseguí inhibir per complet l'enfosquiment enzimàtic en suc de poma (cv. Granny Smith y cv. Golden Delicious).

PARAULES CLAU: PPO, tirosinasa, dopamina, UVM-7 suc.

ABSTRACT

Food appearance is the first factor consumers consider when choosing a product. Darkening in cut fruits and vegetables is mainly due to enzymatic browning, produced by the action of PPO. This research study the potential of the silica material UVM-7 and its equivalent functionalized with thiol groups (UVM-7-SH), to inhibit the tyrosinase both in model system and apple juice. This paper shows the results of material characterization, the results of enzyme kinetic assays with different substrates, and finally, the results of the test on apple juices. Results confirm that in presence of the silica material UVM-7-SH, enzymatic activity is notably reduced until it reaches similar values to the ones obtained by acidification processes. Furthermore, it is observed that the residual enzyme activity depends on the amount of material present in the medium, and it has been estimated that the material-enzyme ratio capable of completely inhibit the enzyme in model systems is 3mg per 93,75U. Regarding real systems, it was observed that UVM-7-SH material completely inhibits enzymatic browning in apple juices (cv. Granny Smith y cv. Golden Delicious)

KEY WORDS: PPO, tyrosinase, dopamine, UVM-7, juices.

1. INTRODUCCIÓN

La aceptación de un alimento por parte de los consumidores depende de sus propiedades organolépticas, siendo la apariencia en general y el color en especial los factores que más condicionan dicha decisión. Así pues, mantener inalterado el color de los alimentos frescos durante el procesado es uno de los principales objetivos de la industria alimentaria, por el impacto económico que este hecho puede provocar en la misma.

En el caso de las frutas y verduras, la principal causa de modificación del color es el pardeamiento enzimático, el cual llega a suponer el 50% de las pérdidas de este tipo de productos debido a la no aceptación de los mismos por parte de los consumidores (Whitaker y Lee, 1995).

El pardeamiento enzimático es una alteración química, enzimática en sus primeras etapas, que tiene como sustratos a los compuestos fenólicos a los cuales transforma en estructuras poliméricas y dota de una coloración parda (Bello, 2000). Se trata de un proceso complejo que puede dividirse en varias etapas: hidroxilación enzimática, oxidación enzimática y polimerización no enzimática, estando las dos primeras, hidroxilación enzimática y oxidación enzimática, catalizadas por la enzima denominada polifenol oxidasa (PPO).

La enzima polifenol oxidasa (EC 1.14.18.1 o EC 1.10.3.1), también conocida como tirosinasa, catecol oxidasa, monofenol oxidasa o creolasa, tiene como centro activo dos iones de cobre (II) (enzima cúprica de tipo 3) unidos a tres histidinas cada uno. Además, está presente en la naturaleza de dos formas diferentes que le permiten catalizar los dos tipos de reacciones, por un lado la hidroxilación de los monofenoles para formar orto-fenoles y por otro lado la oxidación de estos orto-fenoles en quinonas (Figura 1). Estas formas son conocidas como met-tirosinasa y oxi-tirosinasa, y solamente la forma enzimática oxi-tirosinasa es capaz de hidroxilar monofenoles (Sánchez-Ferrer et al., 1995; Rolff et al., 2011).

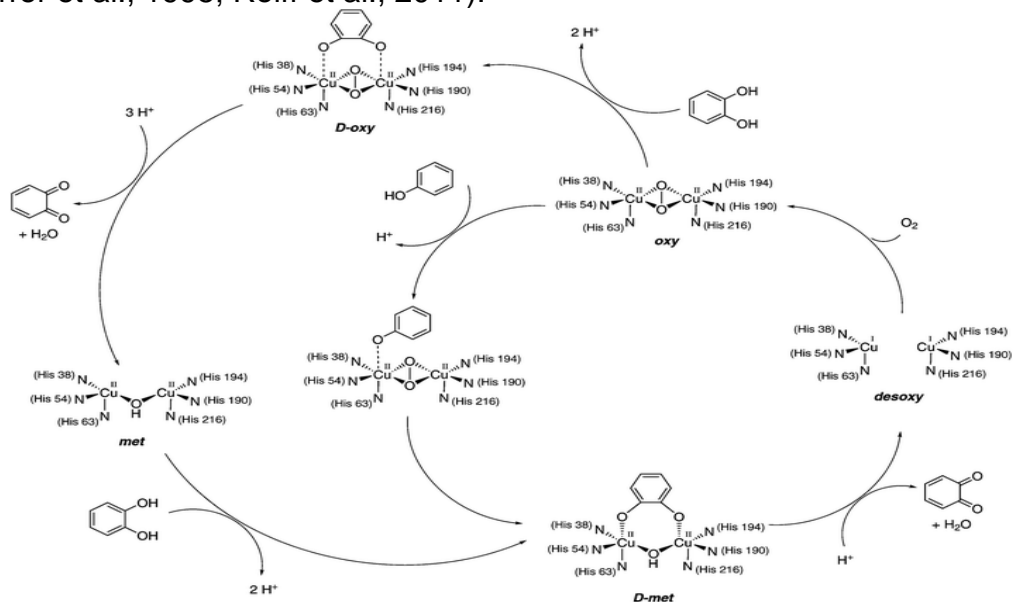


FIGURA 1. Mecanismo de reacción entre la enzima tirosinasa y los compuestos monofenólicos y orto-fenólicos (Rolff et al., 2011)

La última etapa del proceso de pardeamiento enzimático consiste en la polimerización no enzimática de las quinonas dando lugar a compuestos complejos de color pardo llamados melanoïdes (Rouet-Mayer et al., 1990) que son los responsables del cambio de color.

Los factores más influyentes en el pardeamiento enzimático son, en primer lugar, la concentración tanto de la enzima activa como de los compuestos fenólicos, el pH, la temperatura y la presencia de oxígeno (Martínez y Whitaker, 1995). Es por ello que el procesado de alimentos con alta concentración de tirosinasa y polifenoles, como es el caso de los alimentos de origen vegetal, conlleva un elevado riesgo de que este tipo de alimentos sufran pardeamiento enzimático y consecuentemente un cambio de color que influya en la aceptación de los mismos por parte de los consumidores.

Por otro lado es importante resaltar que, la manzana (*Malus domestica*) es la segunda fruta más consumida y producida en Europa según los datos de la FAOSTAT, siendo además una de las fuentes más importantes de polifenoles en la dieta, y por tanto una de las frutas que más se ve afectada por el pardeamiento enzimático (Hertog et al., 1992). Dentro de los compuestos polifenólicos de la manzana, el ácido clorogénico es el compuesto más importante por su alta concentración (Picinelli et al., 1997). Además, la manzana contiene monofenoles como la l-tirosina (Rocha y Morais 2001) que también es el principal sustrato en otras matrices alimentarias con problemas de pardeamiento, como es el caso de los crustáceos o el champiñón.

Para reducir las pérdidas debidas al pardeamiento enzimático, la industria de procesado de frutas y verduras ha hecho uso, a lo largo de los años, de diferentes métodos de prevención basados en tratamientos tanto físicos como químicos. Tradicionalmente, uno de los métodos más utilizado por la industria ha sido el tratamiento térmico como método de inactivación enzimática (Williams et al., 1986). Sin embargo, el uso de tratamientos térmicos presenta ciertas desventajas, ya que estos también pueden afectar a otros compuestos termosensibles presentes en las frutas y verduras, como es el caso de las vitaminas (Bomber, 1975). Asimismo, compuestos como los carotenoides o antocianos presentes en los vegetales también son termosensibles y se ven degradados por la aplicación de estas metodologías (Buckow et al., 2010). Además es importante resaltar que si la aplicación de temperatura no es lo suficientemente rápida y completa, el proceso de pardeamiento enzimático se ve acelerado (Toribio y Lozano, 1986).

En cuanto a la aplicación de tratamientos químicos se refiere, puede destacarse el uso de agentes acidulantes que disminuyen el pH hasta inactivar la enzima o agentes quelantes que actúan sobre el centro activo de la enzima inactivándola (Sapers et al., 1989). También se han utilizado los sulfitos como agentes preventivos del pardeamiento pero el hecho de que puedan producir alergias en la población ha restringido su uso en alimentos y bebidas (Sapers, 1993).

Otras técnicas más novedosas como: el empleo de ultrasonidos (Abid et al., 2013), el CO₂ supercrítico (Gui et al., 2005), pulsos eléctricos (Ho et al., 1996), altas presiones hidrostáticas (Juárez - Enríquez et al., 2014) y la luz ultravioleta (Müller et al., 2014); han mostrado buenos resultados en la inhibición del pardeamiento enzimático, pero precisan de maquinaria compleja y su implantación industrial es extremadamente cara, por lo que a día de hoy su implementación en la industria alimentaria es escasa.

Desde otro punto de vista, el desarrollo de la nanotecnología y más concretamente de los nanomateriales, está abriendo nuevas áreas de investigación en diversos campos, como es el caso de la medicina y farmacología (Vallet – regí et al., 2013) o de la industria alimentaria (Pérez-Esteve et al., 2013).

Los nanomateriales son partículas de tamaño menor a 100 nanómetros que pueden formar agregados y estructuras de unas pocas micras. Existen diferentes tipos de nanomateriales los cuales pueden clasificarse según su estructura en: nanocompuestos, nanopartículas, nanotubos, materiales nanoporosos y materiales mesoporosos.

Los materiales mesoporosos de sílice son sintetizados por la combinación de surfactantes micelares con precursores reactivos de sílice (Beck et al. 1992; Taguchi y Schüth, 2005) (Figura 2) y según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), son aquellos materiales que tienen un tamaño de poro entre 2 y 50nm. Dependiendo del surfactante usado, los materiales resultantes tendrán tamaños de poro diferente. Posteriormente estos materiales pueden ser funcionalizados con distintos grupos químicos siguiendo diferentes protocolos de síntesis.

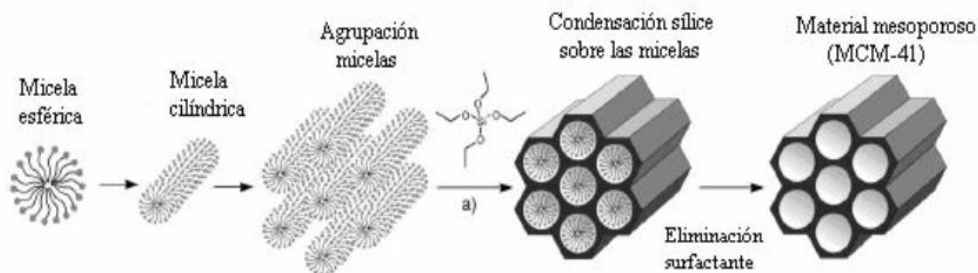


FIGURA 2. Proceso de síntesis de materiales mesoporosos por LCT (Hoffmann et al., 2006)

El material UVM-7 es un material mesoporoso que fue sintetizado por primera vez en la Universidad de Valencia siguiendo la ruta de los atranos (El et al., 2002). Este material se caracteriza por presentar tanto poros intra-partícula como poros inter-partícula, dotando al material de una gran área superficial y una distribución estable de poro. Estas características hacen que los materiales mesoporosos de sílice sean una buena opción a la hora de interactuar con enzimas (Ispas et al., 2009). Sin embargo, existen pocos estudios hasta la fecha orientados a estudiar las interacciones entre la polifenol oxidasa y los materiales mesoporosos de sílice como estrategia para la inhibición de la polifenol oxidasa en sistemas alimentarios.

El objetivo del presente trabajo es profundizar en el estudio de las interacciones entre el material UVM-7 y su análogo funcionalizado con grupos tiol, UVM-7-SH, con la enzima tirosinasa para de esta forma tratar de comprobar su capacidad de inhibir el pardeamiento enzimático, tanto en sistemas modelo como en zumos de manzana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Los materiales utilizados para la inactivación enzimática, UVM-7 y UVM-7-SH, fueron proporcionados por el Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universitat Politècnica de València. Los ensayos en sistemas modelo se realizaron utilizando una enzima comercial, la Tirosinasa de champiñón (2687 U/mg) y distintos sustratos: dopamina hidrociorada ((HO)₂C₆H₃CH₂NH₂·HCL), L-tirosina ≥98% (HPLC) (4-(HO)C₆H₄CH₂CH(NH₂)CO₂H) y ácido clorogénico (C₁₆H₁₈O₉), todos ellos de

Sigma-Adrich, así como el bifosfato de sodio (NaH_2PO_4) y fosfato disódico (Na_2HPO_4) utilizados en la preparación de los tampones. Finalmente, los ensayos correspondientes a sistemas alimentarios reales se realizaron en licuados de manzana de dos variedades distintas (cv. Granny Smith y cv. Golden Delicious).

2.2. Caracterización de las partículas de sílice.

La caracterización de los materiales de sílice sintetizados se llevó a cabo mediante técnicas de Difracción de Rayos-X (XRD, Bruker D8 Advance usando como radiación $\text{CuK}\alpha$), microscopía de transmisión electrónica (TEM, mediante un JEOL –jem-1010), isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno, análisis termogravimétricos (TGA), difracción laser y potencial Z.

Las isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno se determinaron en un analizador de adsorción volumétrico Micromeritics ASAP 2020 a temperatura de nitrógeno líquido (-196°C). Esta técnica permite estimar los principales parámetros que caracterizan la porosimetría de estos materiales (área superficial, volumen de poro y la distribución de tamaño de poro). El modelo BJH (Barrett et al. 1951) se utilizó para calcular el volumen total de poro, mientras que el área específica de superficie se estimó a partir del modelo de BET (Brunauer et al. 1938) utilizando bajas presiones. A partir de estos parámetros y conjuntamente con los resultados del estudio mediante rayos X, se calcula el parámetro de celda a_0 y el espesor de la pared de los diferentes materiales (Neimark, 1998).

La cantidad de grupos tiol presentes en el material UVM-7-SH se estimó mediante termogravimetría utilizando un TGA/SDTA 851e Mettler Toledo.

La distribución del tamaño de partícula del UVM-7-SH y UVM-7 así como el potencial Z fueron determinados usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Para llevar a cabo el ensayo del potencial Z, 1mg del material correspondiente fue suspendido en 1ml agua destilada y el pH se ajustó a distintos niveles (2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5) utilizando un pH-metro de sobremesa de la marca comercial Crison (Kits Basic 20+). La determinación del tamaño de partícula se realizó siguiendo el mismo procedimiento pero el pH de medida se fijó en 6,5. Las muestras fueron sonicadas durante dos minutos previamente al análisis para evitar la formación de agregados. En todos los casos, los ensayos se hicieron por triplicado.

2.3. Caracterización de la enzima tirosinasa

Para la caracterización de la tirosinasa se llevaron a cabo ensayos de cinética enzimática a varios pH y en presencia de distintos sustratos utilizando un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-Vis, Thermo Scientific).

Se prepararon disoluciones de diversas concentraciones entre 0,05mM y 2,5mM de los diferentes sustratos (dopamina, ácido clorogénico y L-tirosina) en 1,25mL de disolución tampón 10mM a diferentes pH (3,5; 4,5 y 5,5). Posteriormente se añadió 0,25mL de la disolución de enzima (0,14mg/mL-375U/mL) y se midió su absorbancia cada 20 segundos a 420nm. La curva absorbancia-tiempo obtenida presenta un primer tramo lineal (tres primero

minutos) cuya pendiente está directamente relacionada con la velocidad inicial de la reacción. Representando los valores de la velocidad respecto a las diferentes concentraciones de sustrato se obtiene el diagrama de velocidad enzimática. Estos ensayos se realizaron a 20°C y por duplicado.

Dado que la reacción enzimática de la tirosinasa sigue una cinética Michaelis-Menten (Espín et al., 2000) se determinó las constantes de velocidad: K_m y $V_{m\acute{a}x}$ utilizando la representación de Langmuir como método de linealización (Doran, 1998). Posteriormente y partir de estas constantes se estimaron las correspondientes constantes catalítica y de especificidad de la tirosinasa para cada sustrato en cada uno de los pH estudiados.

El potencial Z de la disolución de enzima se midió según el protocolo descrito anteriormente para el caso de los materiales mesoporosos utilizando 0,14mg de enzima en 1 mL de agua destilada ajustada a los diferentes pH.

2.4. Estudio de las interacciones enzima-material.

Para evaluar la interacción enzima material se ha seguido el protocolo general que se incluye a continuación, el cual se ha modificado en cada caso atendiendo a las necesidades del estudio.

Concentraciones diferentes entre 0 y 10mg/mL, de material mesoporoso se suspendieron en 2mL de tampón fosfato 10mM a pH 4,5. A continuación se añadieron 0,5mL de disolución de enzima 0,14mg/mL (375U/mL) y se mantuvo en agitación durante 2 horas a 200rpm. Posteriormente se agregaron 0,5mL de una disolución de dopamina 0,12mM y se dejó la muestra en agitación durante 1 hora. Para finalizar se procedió al filtrado de la disolución resultante mediante un filtro PTFE de 45nm y se determinó la absorbancia a 420nm utilizando para ello un espectrofotómetro JASCO Modelo V-630. A modo de control se utilizó una disolución de la enzima en ausencia de material que fue sometido al mismo proceso anteriormente descrito.

Para evaluar las interacciones enzima-material a distintos pH se aplicó el mismo protocolo pero esta vez ajustando el pH del tampón fosfato a los pH deseados, esto es pH 4,5 y 5,5.

Para el análisis de la influencia del sustrato, se realizó el mismo ensayo pero en este caso se procedió a cambiar el sustrato dopamina por ácido clorogénico y L-tirosina.

Por otro lado, la influencia de la funcionalización del material se analizó utilizando el material mesoporoso UVM-7 en lugar del material UVM-7-SH siguiendo el mismo protocolo descrito en párrafos anteriores.

A la hora de analizar si la interacción de la enzima con el material depende del tiempo de contacto se suspendieron 3mg de material (UVM-7 y UVM-7-SH) en 1 mL de tampón fosfato 10mM a pH 4,5; seguidamente, se añadieron 0,25mL de la disolución de enzima (0,14mg/mL-375U/mL) y se dejó en agitación durante diferentes tiempos (0min, 1min, 10min y 2h). Posteriormente se añadieron 0,25mL de dopamina 0,12mM y se mantuvo en agitación durante 1 hora más. Se filtró con un filtro PTFE de 45nm y se midió la absorbancia a 420nm.

Por último, la actividad enzimática en presencia de UVM-7-SH fue analizada siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 2.3, si bien es

cierto que en este caso se utilizó un espectrofotómetro Multiskan FC de Thermo Scientific midiéndose la absorbancia de la muestra a 420nm. La reacción enzimática se llevó a cabo en una suspensión de 1mg de UVM-7-SH en 1mL de tampón fosfato 10mM a pH 4,5. Se añadieron 0,25mL de la disolución de enzima (0,14mg/mL-375U/mL) y se mantuvo en agitación durante 2 horas. A continuación, se recogieron 6 alícuotas de 1,25microL de la disolución en una placa microtituladora y se añadieron 25 microL de dopamina en concentraciones ascendientes (0,5 a 10mM)

2.5. Ensayos con matrices reales.

Los ensayos en sistemas reales se llevaron a cabo sobre licuados de manzana obtenidos en el laboratorio a partir de dos variedades de manzana, cv. Granny Smith y cv. Golden Delicious. Para ello se tomaron dos alícuotas de 2mL del licuado obtenido para cada una de las variedades empleadas. A una de las alícuotas se le añadieron 20mg de UVM-7-SH y la otra sirvió de muestra control. Ambas muestras se mantuvieron en agitación a 200rpm durante 60 minutos y se registraron imágenes fotográficas en intervalos de un minuto al objeto de poder realizar un seguimiento del pardeamiento enzimático que se producía en las mismas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de las nanopartículas de sílice y de la enzima polifenol oxidasa.

En trabajos anteriores, se probaron cuatro materiales mesoporosos (MCM-41 nano, MCM-41 micro, UVM-7 y aerosil) como inhibidores de la tirosinasa, así como sus análogos funcionalizados con grupos tiol (-SH). Esta funcionalización está basada en la efectividad demostrada en estudios previos. En estos estudios se pone de manifiesto el efecto positivo sobre la inhibición de la polifenol oxidasa que tienen algunos compuestos que contienen grupos SH como la cisteína (Dudley y Hotchkiss, 1989; Richard-Forget et al., 1992; Robert et al., 1996; İyidoğan y Bayındırlı, 2004). Dentro de los ocho materiales estudiados, el material con mayor potencial de inhibición de la polifenol oxidasa fue el UVM-7-SH, de ahí que se seleccionara para este estudio.

La morfología y composición de UVM-7 y UVM-7-SH fueron caracterizadas mediante técnicas de difracción de rayos X, isoterma de adsorción/desorción de nitrógeno, microscopía electrónica de barrido y potencial Z. La tabla 1 muestra los parámetros característicos del estudio por difracción de rayos X y de las isotermas de adsorción/desorción de N₂ de la partícula mesoporosa recién sintetizada, después de ser calcinada y funcionalizada con grupos tiol.

El análisis por rayos X muestra cuatro picos de difracción indexados como (100), (110), (200) y (210) característicos de una estructura hexagonal. No obstante, el difractograma muestra un pico con mayor intensidad entre 2° y 2,5° 2θ (d₁₀₀) tanto en la muestra sin calcar como en la muestra calcinada y

en la funcionalizada. Encontramos el plano principal (d_{100}) de 43,07 Å en el caso de la partícula recién sintetizada, de 38,61 Å para la muestra calcinada y 40,69 Å en el caso de la funcionalizada con grupos SH. La existencia en todos los casos del pico d_{100} indica que la estructura hexagonal no se ve modificada con el tratamiento. A partir de estos datos, se procedió a calcular el parámetro de celda a_0 ($a_0=2d_{100}*(\sqrt{3})$) tanto para el material sin calcinar (49,7 Å) como para el material calcinado (44,59 Å) obteniéndose para este último caso una contracción de celda de 5,1 Å debido a la condensación de los silanoles como consecuencia del proceso de calcinación (Díaz et al., 2003)

Las isothermas de adsorción y desorción de nitrógeno obtenidas para los materiales analizados son de tipo IV, característica de los materiales mesoporosos con una estrecha distribución de tamaño de poro de acuerdo a la IUPAC. Aplicando el modelo de BET para calcular el área total de superficie, la isoterma muestra un área de superficie muy baja en el caso de la UVM-7 recién sintetizada ($99,24 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) debido a la presencia de surfactante en los poros que impide la entrada de nitrógeno. Sin embargo, después de ser calcinada y consecuentemente una vez eliminada toda la materia orgánica de la muestra, la superficie específica asciende a valores cercanos a $1000 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. Respecto a la UVM-7-SH, el valor es muy similar al de la partícula calcinada, hecho que puede ser debido a que las cadenas de tioles no son lo suficientemente largas para impedir la entrada de nitrógeno en los poros. Esta tendencia también se puede observar en el volumen de poro. Así, en el caso de la partícula sin calcinar es casi inexistente ($0,07 \text{ m}^3\text{g}^{-1}$) mientras que, el volumen de poro en las partículas calcinadas y funcionalizadas alcanza, en ambos casos, valores en torno a $0,7 \text{ m}^3\text{g}^{-1}$. En cuanto al tamaño de poro de las muestras indicar que, los valores obtenidos, 2,69nm en el caso del UVM-7 y 2,68nm para el UVM-7-SH, son muy similares a los encontrados en la bibliografía (Pérez-Esteve et al., 2015)

TABLA 1. Propiedades estructurales del material mesoporoso UVM-7 recién sintetizado, calcinado y funcionalizado con grupos tiol.

	UVM-7	UVM-7 calcinado	UVM-7-SH
d_{100}^a (Å)	43,07	38,61	40,69
$2\theta^b$ (°)	2,05	2,29	2,17
Área ^c (m^2g^{-1})	99,24	935,23	909,62
Volumen de poro ^d (m^3g^{-1})	0,07	0,73	0,64
Diámetro de poro ^d (nm)		2,69	2,67
a_0 ^e (Å)	49,7	44,59	50,68
dw ^f (Å)		17,69	23,98
mmol SH/g SiO ₂			0,55

^a Pico de difracción del plano reticular 100.

^b Ángulo de incidencia respecto al plano de reflexión.

^c Superficie específica calculada mediante BET a partir de las isothermas de adsorción de nitrógeno.

^d Volumen y diámetro de poro calculado a partir de las isothermas de adsorción de nitrógeno.

^e Parámetro de celda calculado a partir de $a_0=2d_{100}*(\sqrt{3})^{-1}$

^f Espesor de la pared calculada a partir de $dw= a_0 -d_p$ (diámetro de poro)

Por último, a partir del análisis termogravimétrico realizado, se ha determinado la cantidad por gramo de material de grupos –SH presentes en las partículas UVM-7-SH. Los resultados muestran una cantidad de 0,54mmol de SH por gramo de SiO₂, resultado coherente a lo encontrado en la bibliografía (Ros-Lis et al., 2008).

La presencia de las estructuras mesoporosas antes y después de la funcionalización con grupos SH fueron confirmadas mediante las imágenes tomadas a partir del microscopio TEM. Las figuras 3 (a) y 3 (b) ponen de manifiesto la ausencia de diferencias estructurales como de tamaño y de simetría entre las diferentes partículas. Así pueden apreciarse los canales característicos de los materiales mesoporosos, si bien es cierto que, dependiendo de la orientación de la partícula se observan líneas alternas, blancas y negras, o una matriz hexagonal en la cual los conductos están en forma vertical. En relación con la estructura de ambos materiales, cabe destacar que no está formada por pequeñas partículas sino que es un continuo no uniforme de silicio, que en su organización forma poros más grandes conocidos como poros texturales, además de los mesoporos comentados anteriormente.

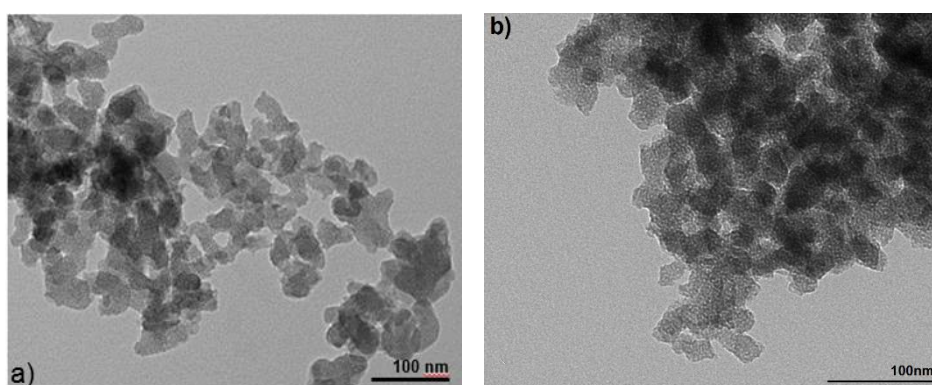


FIGURA 3. Caracterización de la estructura de las partículas por microscopía TEM. a) UVM-7 b) UVM-7-SH

Para conocer las posibles interacciones entre la enzima y el material, y estudiar el mecanismo de la inhibición, se midió el potencial Z tanto de la suspensión de material de sílice UVM-7 y UVM-7-SH, como de la disolución de enzima. Los resultados se muestran en la figura 4.

La figura 4 muestra la evolución del potencial Z producido por el cambio en el pH del medio. En los tres casos se observa una tendencia clara, a pH más ácidos se obtienen valores positivos o neutros (entre 0 y 30mV) que van decreciendo a valores negativos (entorno a -30mV) a medida que se alcanza un pH más básico. En ambos casos existe un cambio brusco del potencial a pH por debajo de 4,5, siendo más acusado en el caso de la enzima PPO.

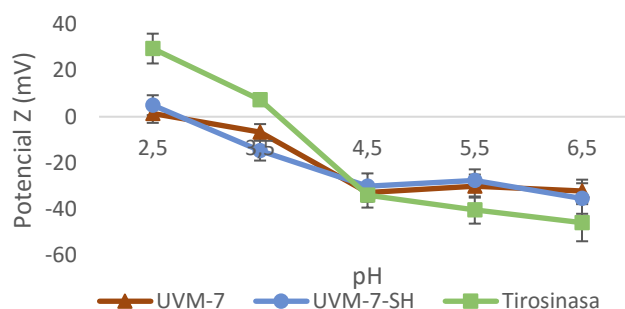


FIGURA 4. Potencial Z de las suspensiones de partículas de sílice UVM-7 y UVM-7-SH, así como de la disolución de tirosinasa (0,14mg/ml) a distintos pH.

Las partículas de sílice se cargan positivamente cuando el pH del medio está por debajo de su punto isoeléctrico, el cual está entorno al pH 2-3. Esto es debido a la formación del grupo silanol protonado (SiOH^{2+}). Estos valores concuerdan con los datos obtenidos y mostrados en la figura 4, tanto en el caso de las partículas funcionalizadas como en el caso de las nativas. Se puede observar como a pH por encima de 4,5 los valores están entorno a -30mV en todos los casos, por el contrario a pH inferiores, el potencial Z se hace más positivo. La funcionalización con grupos SH no modifica los valores del potencial Z, procurando la misma tendencia. Esto nos indica que a pH superiores a 4,5 las repulsiones entre las nanopartículas serán mayores, formándose menos agregados y facilitando la interacción con la enzima.

Con respecto al estudio del potencial Z del enzima a pH por encima de 4,5, los valores del potencial están en el rango entre -35mV y -50mV, sin embargo, por debajo de 4,5 se vuelve positivo (30mV). La enzima tirosinasa de champiñón tiene el punto isoeléctrico a pH 3,9 (Wills, 1952), valor que justifica el cambio de tendencia del potencial Z.

En términos generales, ambos sistemas tienen valores del mismo orden a los distintos pH evaluados, indicando que la interacción entre el material y la enzima podría no ser de carácter electrostático debido a la repulsión que se genera entre ellas.

El pH es uno de los parámetros más relevantes en los sistemas y procesos alimentarios dado que afectan a los procesos biológicos, tales como la actividad enzimática. Se ha visto como los grupos químicos ionizables ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, etc) de la enzima varían en función del pH cambiando la carga neta de la partícula y así modificando, en parte, la conformación de su estructura. Este hecho está directamente relacionado con la actividad enzimática, ya que la perfecta conformación de la misma es necesaria para su óptima actividad catalítica (Claramunt, 2013). La mayoría de las curvas que representan la actividad enzimática siguen una curva acampanada, aumentando desde cero en la región ácida hasta un máximo y decreciendo a cero en la región fuertemente básica (Bisswanger, 2014).

En el caso de las frutas y sus respectivos zumos, el pH suele estar comprendido entre 3,5 y 5,5, por lo que la actividad de la enzima tirosinasa fue medida en dicho intervalo. Se muestra en la figura 5 como a medida que el pH asciende la actividad enzimática va aumentando, mientras que es prácticamente nula a un pH de 3,5 (Munjaj y Sawhney, 2002).

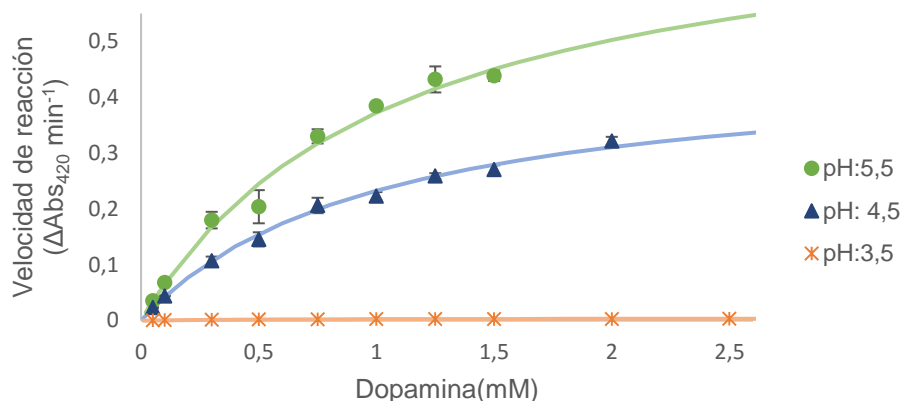


FIGURA 5. Velocidad de reacción inicial de la tirosinasa (93,75U) en función de la concentración del sustrato (dopamina) a diferentes pH. Valores experimentales (puntos) y valores predichos (líneas continuas) según el modelo de Michaelis-Menten.

Junto con el pH, otro de los factores fundamentales a la hora de estudiar la actividad enzimática es el sustrato. Además de dopamina se ensayaron la L-tirosina y el ácido clorogénico al pH de mayor actividad dentro del intervalo (pH 5,5). La constante de Michaelis-Menten (k_m) así como la velocidad máxima de la reacción ($V_{m\acute{a}x}$) fueron determinadas para todos los casos estudiados mediante la linealización de Langmuir. Una vez determinados dichos parámetros, se calcularon la constante catalítica (K_{cat}) o número de recambio, que nos indica la capacidad de la enzima por transformar el sustrato en producto y la constante de especificidad o eficiencia enzimática (K_{cat}/K_m), parámetro relacionado con la afinidad de la enzima por cada (Tabla 2).

TABLA 2. Parámetros cinéticos de la tirosinasa de champiñón (93,75U) en presencia de tres sustratos diferentes (Dopamina, L-tirosina y ácido clorogénico) a diferentes pH y en presencia de 1mg de UVM-7-SH.

Sustrato	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (ΔAbs_{420} min ⁻¹)	K_{cat} (ΔAbs_{420} mM ⁻¹ min ⁻¹)	Cnt. especificidad (ΔAbs_{420} min ⁻¹ (mM ²) ⁻¹)
Dopamina pH 3,5	0,53 ± 0,07	0,0040 ± 0,0001	7,20 ± 0,15	14 ± 2
Dopamina pH 4,5	1,011 ± 0,002	0,468 ± 0,007	861,8 ± 12,4	852 ± 14
Dopamina pH 5,5	1,09 ± 0,12	0,78 ± 0,03	1432,4 ± 62,9	1335 ± 201
Clorogénico pH 5,5	0,31 ± 0,06	0,201 ± 0,009	370,9 ± 16,2	1245 ± 288
L-tirosina pH 5,5	0,10 ± 0,04	0,045 ± 0,004	82,93 ± 7,37	834 ± 107
Dopamina + UVM-7-SH pH 4,5	0,592 ± 0,006	0,0057 ± 0,0004	10,5 ± 0,7	17,8 ± 1,2

$V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad de reacción, dependiente de la concentración de enzima.

K_m es la constante de Michaelis-Menten dependiente de la concentración de enzima.

K_{cat} es la constante catalítica $K_{cat}=V_{m\acute{a}x}/[E]$

Cnt de especificidad calculada como K_{cat}/K_m

Conforme se va incrementando el pH en el sistema enzima-dopamina aumentan considerablemente todos los parámetros cinéticos. La afinidad de la enzima por la dopamina (Cnt. de especificidad) alcanza valores superiores al $1300\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ cuando a pH 3,5 está cercano al 10. Entre los diferentes sustratos, la dopamina es claramente el sustrato en el que mayor actividad enzimática presenta la tirosinasa ya que el ácido clorogénico y la L-tirosina muestran constantes más bajas. El pardeamiento generado es más lento. El número de recambio en ambos casos es menor, sin embargo, para el ácido clorogénico la afinidad por la enzima es casi tan alta como para la dopamina.

El sustrato L-tirosina muestra un comportamiento diferente al resto de sustratos estudiados debido al mecanismo de reacción. En este caso la reacción enzimática no es inmediata ya que se observa un tiempo muerto desde el primer contacto enzima-sustrato hasta el comienzo de la reacción, de, aproximadamente, 2 minutos. El sustrato L-tirosina solamente tiene un grupo OH en su anillo fenólico, así la enzima actúa primero añadiendo otro grupo OH y formando el sustrato L-DOPA. La formación de este grupo difenol es más lento que la formación de las quinonas (Toivonen y Brummell, 2008). Una vez se ha formado el grupo catecol la reacción ya avanza rápidamente hasta formar el producto oxidado (melanina) (Hasegawa, 2010)

Así mismo, se estudió la influencia de las partículas de sílice UVM-7-SH sobre la actividad enzimática a pH de 4,5, por ser común en zumos y frutas. Se observa como en presencia de 1mg de UVM-7-SH la velocidad de la reacción es mucho menor que al mismo pH sin material presente (Figura 6). Las constantes catalítica y de especificidad (mostradas en la tabla 2) descienden bruscamente desde valores cercanos a 800 a valores en torno a 10 en ambas constantes. Esto indica como la afinidad de la enzima por el sustrato disminuye notablemente en presencia del material. Por otro lado, se observa que estos valores se asemejan a los obtenidos a pH 3,5 indicando que la presencia de UVM-7 funcionalizada con grupos tiol provoca una inhibición semejante a la que sufre la enzima a pH ácido a tiempos cortos, con la ventaja de no tener que acidificar el medio e interferir en las características sensoriales del producto.

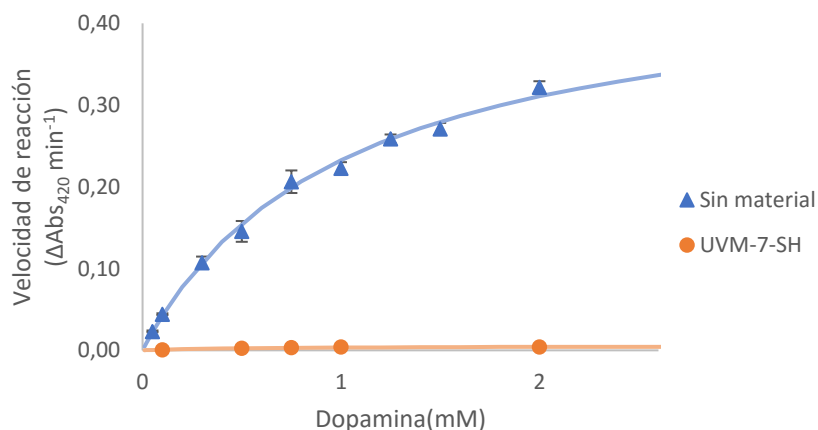


FIGURA 6. Velocidad de reacción inicial de la tirosinasa (93,75U) en función de la concentración del sustrato (dopamina) a pH 4,5. Sin material presente (▲) y con 1mg/ml UVM-7-SH (•). Valores experimentales (puntos) y valores predichos (líneas continuas) según el modelo de Michaelis Menten.

3.2. Interacciones entre las nanopartículas de sílice y la enzima tirosinasa en sistemas modelo.

Para evaluar las interacciones enzima-material y su influencia en la actividad de la tirosinasa se llevaron a cabo diversas experiencias para analizar la influencia de distintos factores: pH del medio, tipo de sustrato, ratio enzima:material, funcionalización del material y tiempo de contacto. Para ello se utilizó dopamina como sustrato.

En la figura 7 se muestra la interacción entre la enzima y los materiales UVM-7 y UVM-7-SH y así conocer el efecto de la funcionalización. Así mismo, se muestra el efecto del ratio enzima material, para el cual se dejó estable la cantidad de enzima (93,75U) y se varió la cantidad de material presente. Se observa como el producto generado por la oxidación de la PPO a concentraciones bajas, tanto de un material como en el otro, es el mismo y no disminuye notablemente respecto al generado cuando no hay material presente. Sin embargo, al aumentar el ratio enzima:material se observa como en el caso del material UVM-7 la inhibición es menor. El material UVM-7-SH inhibe por completo la generación de pigmentos pardos a concentraciones superiores a 3mg por 93,75U enzimáticas.

En resumen, se muestra como ambos materiales tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática, sin embargo, la presencia de tioles favorece la inhibición llegando esta a ser prácticamente completa. Este hecho sugiere que la presencia de tioles en un ratio enzima:material adecuado interacciona con la enzima impidiendo la reacción enzimática.

Como se ha visto anteriormente, el pH del medio es un factor relevante en la actividad de la enzima tirosinasa, es por ello que se analizó la interacción entre la UVM-7-SH y la enzima a distintos pH con distintos ratios material:enzima, utilizando dopamina como sustrato. En la figura 8 se muestra la inhibición en la reacción de oxidación en presencia de material, comparada con una muestra control tanto para un pH de 5,5 como para un pH de 4.5

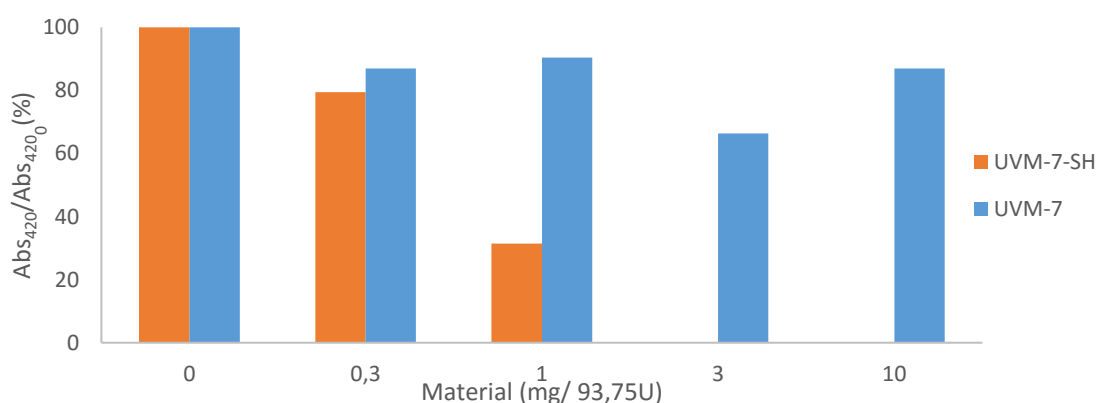


FIGURA 7. Influencia de la concentración de material (UVM-7- y UVM-7-SH) en la inhibición de la reacción enzimática utilizando como sustrato dopamina 0,12mM a pH 4,5 al cabo de una hora de reacción.

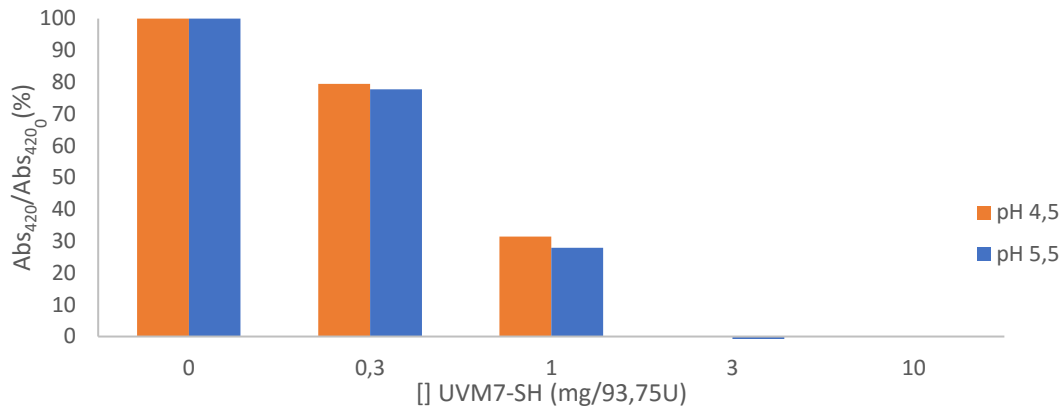


FIGURA 8. Influencia de la concentración de UVM-7-SH y del pH en la inhibición de la reacción enzimática utilizando como sustrato dopamina 0,12mM al cabo de 1 hora de reacción.

Como se ha visto anteriormente, la enzima es más activa a pH 5,5, por lo que el resultado obtenido del control al cabo de una hora de reacción es más alta. No obstante, y para facilitar la lectura de la gráfica, se ha optado por mostrar los resultados en tanto por 100 respecto al control. Los resultados del ensayo muestran la tendencia de inhibición en la enzima conforme se va aumentando la concentración de material indistintamente del pH del medio. A concentraciones bajas el material no es capaz de impedir la reacción de oxidación, sin embargo, a concentraciones mayores (3mg/93,75U y 10mg/93,75U) se produce ya una inhibición total que provoca que no se genere producto.

Así mismo, para conocer la influencia del sustrato en el sistema enzima-material este ensayo también fue realizado para los sustratos L-tirosina y ácido clorogénico. El comportamiento es similar al mostrado con dopamina. Al aumentar la concentración de material aumenta la inhibición enzimática llegando a ser total a concentraciones de 3mg por 93,75U. Estos datos nos sugieren que la acción del material es independiente de sustrato y del pH siendo sólo dependiente de la relación enzima:material.

Por último, se realizaron pruebas a distintos tiempos de contacto entre la enzima y el material para comprobar la dependencia de este. Para ello, las partículas UVM-7 sin funcionalizar y UVM-7-SH se mantuvieron en agitación durante diversos tiempos de contacto entre 0 y 2 horas. Posteriormente, se añadió el sustrato (dopamina) y se dejó durante una hora.

Para este ensayo se eligió una ratio de 3mg/93,75U y un pH de 4,5 ya que, como se ha visto anteriormente, la inhibición enzimática por parte de UVM-7-SH llega a ser total y dicho pH se ajusta más al encontrado en las diferentes frutas.

En la figura 9 se representa la influencia del tiempo de contacto entre la enzima y el material respecto a pardeamiento generado posteriormente. Todos los tiempos son comparados con la muestra control sin material presente. A primera vista, se observa como la variación en los tiempos de contacto no modifican sustancialmente la respuesta obtenida en ningún caso. En el caso del material sin funcionalizar, UVM-7, se observa como el tiempo de contacto entre la enzima y el material no afecta en tiempos menores a 10

minutos. En cambio, parece que a tiempos largos la inhibición es menor que a tiempos cortos.

Por el contrario, utilizando UVM-7-SH se observa un pequeño cambio entre tiempos cortos (menores a 1 minuto) y tiempos largos. Efecto positivo debido a la falta de tiempo de contacto que habrá entre los materiales y la enzima en muestras reales. En un sistema real tanto la enzima como los diferentes sustratos están presentes en la misma matriz, de manera que la reacción enzimática comienza en cuanto se produce el contacto con el oxígeno, y por tanto, con los materiales.

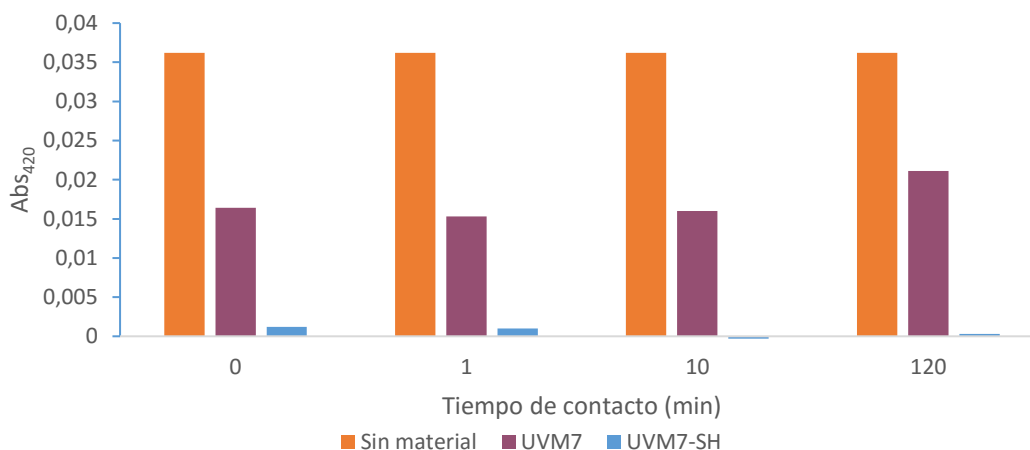


FIGURA 9. Influencia del tiempo de contacto entre la enzima (93,75U) y el material (3mg) sobre la inhibición de la reacción enzimática a pH 4,5.

3.3. Ensayos con matrices reales.

Una vez comprobado el efecto de las nanopartículas UVM-7-SH en los sistemas modelo se estudió el efecto de las partículas en zumos reales. Dos variedades de manzana fueron elegidas para el ensayo, en primer lugar la variedad Golden Delicious al ser la variedad más consumida y cultivada en Europa, y por otro lado, la variedad Granny Smith debido a su estabilidad en composición entre diferentes lotes y orígenes, garantizando la reproducibilidad en los resultados (Barrera et al. 2009).

Diferentes concentraciones de UVM-7-SH fueron añadidas al zumo recién licuado. Añadiendo 1mg/mL de nanomaterial sobre el zumo el pardeamiento enzimático no consiguió ser frenado. Aumentando la concentración a 5mg/mL se logra reducir ligeramente la reacción de oxidación durante los primeros 10 minutos. A partir de una concentración de 10mg/mL se consigue inhibir por completo la acción de la enzima tirosinasa en el zumo. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 10 y 11. Los viales de la izquierda en estas imágenes contienen zumo natural de manzana sin mesopartículas, mientras que a los viales de la derecha se les añadió 10mg/ml de UVM-7-SH.

Las muestras de la izquierda sufren el proceso de pardeamiento enzimático típico de estas matrices. Debido a la rapidez del proceso de oxidación, el cambio de color es evidente en tan solo 1 minuto. Tras 10 minutos de exposición al oxígeno el zumo cobra un color rojo cobrizo muy

distinto del color amarillo inicial. Se observa como en ambos casos, el zumo natural sin partículas pardeea con el tiempo, sin embargo, en presencia de partículas UVM-7-SH la oxidación no se produce. La acción inhibitoria de las partículas UVM-7-SH sobre la enzima tirosinasa es tal que, una vez transcurridos 60 minutos, mientras la oxidación del zumo sin materiales ha llegado a un punto muy avanzado, el zumo con partículas añadidas sigue sin sufrir pardeamiento.

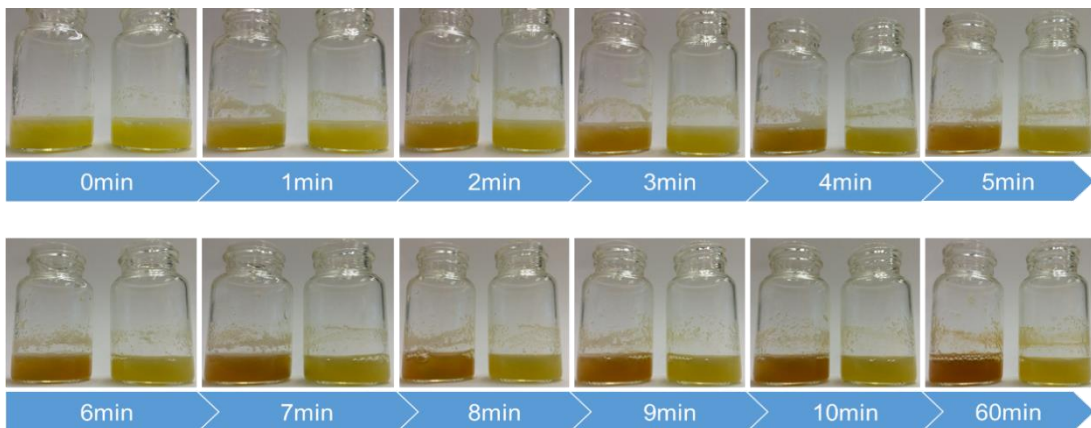


FIGURA 10. Evolución del color en licuado de manzana variedad Golden sin material (izquierda) y con 10mg/ml de UVM-7-SH (derecha).

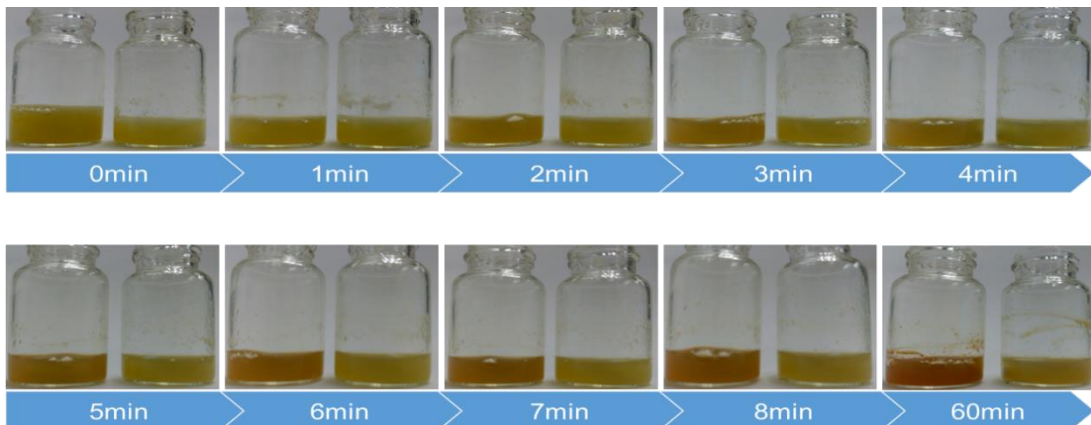


FIGURA 11. Evolución del color en licuado de manzana variedad Granny Smith sin material (izquierda) y con 10mg/ml de UVM-7-SH (derecha)

La necesidad de aumentar la cantidad de material presente por mL de zumo para poder obtener buenos resultados concuerda con los resultados obtenidos en el sistema modelo, en el cual se observaba una relación entre la inhibición y el ratio enzima:material. Estos resultados sugieren una dependencia directa entre la concentración de partículas UVM-7-SH y la actividad de la enzima PPO. Así mismo, según la bibliografía (Reinkensmeier et al., 2016), el volumen de la actividad enzimática de las dos variedades de manzana estudiadas es la misma, hecho que concuerda con la necesidad de utilizar en ambos casos la misma cantidad de material mesoporoso para asegurar la inhibición.

Un último ensayo con muestras reales fue realizado utilizando UVM-7 para comprobar la acción de los grupos tiol presentes en las partículas funcionalizadas. Se observó cómo durante los primeros minutos, el pardeamiento enzimático era más lento en presencia del material, no obstante pocos minutos después el pardeamiento ya se encontraba en una fase avanzada, pese a utilizar la misma concentración de material que en el caso de la UVM-7-SH. Por ello cabe pensar que los grupos –SH actuarían, bien en el centro activo de la enzima o bien en su estructura, provocando su inactivación y con ello frenando el pardeamiento enzimático.

4. CONCLUSIONES

Se ha demostrado que el uso del material mesoporoso UVM-7 funcionalizado con grupos tiol es capaz de inhibir la enzima tirosinasa, y con ello detener el proceso de oxidación enzimático de los distintos sustratos, tanto en sistemas modelo como en zumos de manzana de las variedades Golden Delicious y Granny Smith recién licuados. Los resultados del potencial Z y las constantes enzimáticas indican que la interacción entre el material y la enzima será de carácter químico, mediante la interacción con el centro activo de la enzima o con su estructura, y no de carácter electrostático. Por otro lado, la cantidad de UVM-7-SH necesaria para la inhibición de la enzima depende de la cantidad de tirosinasa en la matriz. Además se ha determinado la relación de la actividad enzimática con el pH del medio y de los sustratos presentes en el sistema, siendo más activa a pH 5,5 y con dopamina como sustrato, no obstante en presencia del material funcionalizado la respuesta de inhibición es la misma.

REFERENCIAS

- Abid, M.; Jabbar, S.; Wu, T.; Hashim, M. M.; Hu, B.; Lei, Shicheng.; Zhang, X.; Zeng, X. 2013. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20:1182-1187.
- Barrera, C.; Betoret, N.; Corell, P.; y Fito, P. 2009. Effect of osmotic dehydration on the stabilization of calcium-fortified apple slices (var. Granny Smith): Influence of operating variables on process kinetics and compositional changes. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 416-424.
- Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. 1951. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *Journal of the American Chemical Society*, 73(1), 373-380.
- Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K. D.; Chu, C. T. W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W.; McCullen, S. B.; Higgins, J. B.; Schlenker, J. L. 1992. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society*, 114(27), 10834-10843.
- Bello Gutierrez, J. 2000. Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos. Díaz de Santos, 323-334.
- Bisswanger, H. 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1), 41-55.
- Bomben, J. L.; Dietrich, W. C.; Hudson, J. S.; Hamilton, H. K.; Farkas, O. F. 1975. Yields and solids loss in steam blanching cooling and freezing vegetables. *Journal of Food Science*, 40(4), 660-664.

- Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American chemical society*, 60(2), 309-319.
- Buckow, R.; Kastell, A.; Terefe, N. S.; Versteeg, C. (2010). Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(18), 10076-10084.
- Claramunt Vallespí, Rosa M^a. 2013. Química bioorganica y productos naturales. UNED. Universidad nacional de educación a distancia.
- Díaz, F. Mohino, J. Pérez Pariente, E. Sastre. "Synthesis of MCM-41 materials functionalised with dialkylsilane groups and their catalytic activity in the esterification of glycerol with fatty acids ". *Appl. Catal.*, A. Vol. 242. 2003. pp. 161-169.
- Doran, P. (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia. Zaragoza, 468.
- Dudley, E. D.; Hotchkiss, J. H. 1989. Cysteine as an inhibitor of polyphenol oxidase. *Journal of Food Biochemistry*, 13(1), 65-75.
- El Haskouri, J.; de Zárate, D. O.; Guillem, C.; Latorre, J.; Caldés, M.; Beltrán, A.; Beltrán, D.; Descalzo, A. B.; Rodríguez-López, G.; Martínez-Máñez, R.; Marcos, M. D.; Amorós, P. 2002. Silica-based powders and monoliths with bimodal pore systems. *Chemical Communications*, (4), 330-331.
- Espín, J. C.; Varón, R.; Fenoll, L. G.; Gilabert, M.; García-Ruiz, P. A.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. 2000. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*, 267(5), 1270-1279
- Gui, F.; Wu, J.; Chen, F.; Liao, X.; Hu, X.; Zhang, Z.; Wang, Z. 2007. Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 100(4), 1678-1685.
- Hasegawa, T. 2010. Tyrosinase-expressing neuronal cell line as in vitro model of Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*, 11(3), 1082-1089.
- Hertog, M. G.; Hollman, P. C.; Katan, M. B. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(12), 2379-2383.
- Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Fröba, M. 2006. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(20), 3216-3251.
- Ispas, C.; Sokolov, I.; Andreescu, S. 2009. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(2), 543-554.
- Iyidoğan, N. F.; Bayındırlı, A. 2004. Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. *Journal of Food Engineering*, 62(3), 299-304.
- Juarez-Enriquez, E.; Salmeron-Ochoa, I.; Gutierrez-Mendez, N.; Ramaswamy, H. S.; Ortega-Rivas, E. 2014. Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultrahigh hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology*. 1-5.
- Martinez, M. V.; Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6(6), 195-200.
- Müller, A.; Noack, L.; Greiner, R.; Stahl, M. R.; Posten, C. 2014. Efect of UV-C and UV-B treatment on polyphenol oxidase activity and shelf life of apple and grape juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 26:498-504.
- Munjal, N.; Sawhney, S. K. 2002. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(5), 613-619.
- Neimark, A. V.; Ravikovitch, P. I.; Grün, M.; Schüth, F.; Unger, K. K. 1998. Pore size analysis of MCM-41 type adsorbents by means of nitrogen and argon adsorption. *Journal of colloid and interface science*, 207(1), 159-169.
- Pérez-Esteve, E.; Bernardos, A.; Martínez-Máñez, R.; Barat, J. M. 2013. Nanotechnology in the development of novel functional foods or their package. An Overview Based in Patent Analysis. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 5:35-43.
- Pérez-Esteve, É.; Ruiz-Rico, M.; de la Torre, C.; Villaescusa, L. A.; Sancenón, F.; Marcos, M. D.; Amorós, P.; Martínez-Máñez, R.; Barat, J. M. 2016. Encapsulation of folic acid in different silica porous supports: A comparative study. *Food chemistry*, 196, 66-75.
- Picinelli, A.; Sua, B.; Mangas, J. J. 1997. Analysis of polyphenols in apple products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 204(1), 48-51.

- Reinkensmeier, A.; Steinbrenner, K.; Homann, T.; Bußler, S.; Rohn, S.; Rawel, H. M. 2016. Monitoring the apple polyphenol oxidase-modulated adduct formation of phenolic and amino compounds. *Food chemistry*, 194, 76-85.
- Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Nicolas, J. J. 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 2. Kinetic studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11), 2108-2113.
- Robert, C.; Richard-Forget, F.; Rouch, C.; Pabion, M.; Cadet, F. 1996. A kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by L-cysteine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(4), 457-463.
- Rocha, A. M. C. N.; Morais, A. M. M. B. 2001. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple. *Food Control*, 12(2), 85-90.
- Rolf, M.; Schottenheim, J.; Decker, H.; Tucek, F. 2011. Copper–O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 4077-4098.
- Ros-Lis, J. V.; Casasús, R.; Comes, M.; Coll, C.; Marcos, M. D.; Martínez-Máñez, R.; Garró, N. 2008. A mesoporous 3D hybrid material with dual functionality for Hg²⁺ detection and adsorption. *Chemistry—A European Journal*, 14(27), 8267-8278.
- Rouet-Mayer, M. A.; Ralambosoa, J.; Philippon, J. 1990. Roles of o-quinones and their polymers in the enzymic browning of apples. *Phytochemistry*, 29(2), 435-440.
- Sánchez-Ferrer, Á.; Rodríguez-López, J. N.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1247(1), 1-11.
- Sapers, G. M. 1993. Browning of Foods: Control by Sulfites, Antioxidants, and Others Means. *Food Chemistry*. 109:402-407
- Sapers, G. M.; Hicks, K. B.; Phillips, J. G.; Garzarella, L.; Pondish, D. L.; Matulaitis, R. M.; McCormack, T. J.; Sondey, S. M.; Seib, P. A.; Ei-Atawy, Y. S. 1989. Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors, and complexing agents. *Journal of food science*, 54(4), 997-1002.
- Taguchi, A.; Schüth, F. 2005. Ordered mesoporous materials in catalysis. *Microporous and Mesoporous Materials*. 77:1-45.
- Toivonen, P. M.; Brummell, D. A. 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 1-14.
- Toribio, J. L.; Lozano, J. E. 1986. Heat induced browning of clarified apple juice at high temperatures. *Journal of Food Science*, 51(1), 172-175.
- Vallet-Regí, M.; Balas, F.; Arcos, D. 2013. Mesoporous Materials for Drug Delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, 40: 7548-7558
- Whitaker, J.R., Lee, C.Y. 1995. Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning: an Overview. *Enzymatic Browning and Its Prevention*. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2-7
- Williams, D. C.; Lim, M. H.; Chen, A. O.; Pangborn, R. M.; Whitaker, J. R. 1986. Blanching of vegetables for freezing: which indicator enzyme to choose. *Food technology (USA)*
- Wills, E. D. 1952. Enzyme inhibition by suramin and the measurement of the isoelectric points of some enzymes. *Biochemical Journal*, 50(3), 421.