

# INFORMACION

## La lipoxigenasa en el reino vegetal. I. Propiedades

Por L.C. Sanz, A.G. Pérez y J.M. Olías\*

Instituto de la Grasa y sus Derivados

Avda. Padre García Tejero, 4. 41012-Sevilla, España.

### RESUMEN

#### La lipoxigenasa en el reino vegetal. I. Propiedades

Las lipoxigenasas constituyen una familia de enzimas que contienen hierro no hemínico y que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Poseen, respecto a la mayoría de las propiedades, una conducta bastante uniforme, pero exhiben alguna diferencia, por ejemplo en relación a la especificidad de sustrato y producto. En esta primera parte se da un breve repaso a las propiedades que poseen las lipoxigenasas vegetales, comparándolas con las lipoxigenasas animales donde fuera necesario.

**PALABRAS-CLAVE:** *Acido graso poliinsaturado - Información (artículo) - Lipoxigenasa - Metabolismo lipídico.*

### SUMMARY

#### Lipoxygenase in the plant kingdom. I. Properties.

Lipoxygenases are a family of related nonheme iron-containing enzymes that are widely distributed in plants. They own a uniform behaviour with respect to most properties but they exhibit some diversity, for instance in relation to their substrate and product specificity. This first part give a brief survey of plant lipoxygenases properties, comparing where necessary plant enzymes with animal lipoxygenases.

**KEY-WORDS:** *Information (paper) - Lipid metabolism - Lipoxygenase - Polyunsaturated fatty acid.*

## 1. INTRODUCCION

En el reino vegetal operan fundamentalmente cuatro sistemas enzimáticos para la modificación oxidativa de los ácidos grasos:  $\alpha$ -oxidación,  $\beta$ -oxidación,  $\omega$ -oxidación y ruta de la lipoxigenasa (LOX). En general, se puede decir que los tres primeros carecen de una especificidad de sustrato, mientras que el sistema LOX presenta una clara especificidad, siendo exclusivo para ácidos grasos poliinsaturados con estructura Z,Z-1,4-pentadieno.

El interés inicial por el estudio de este enzima estuvo marcado por sus implicaciones tecnológicas. André y Hou (1932) pusieron de manifiesto en soja la existencia de un "factor" sensible a la temperatura que causaba olores no deseables; en 1934, Haas y Bohn presentaron una patente para el blanqueamiento de los pigmentos presentes en harina de trigo; al comienzo de la década de los cuarenta se demostró que en ambos casos el causante de

los efectos era el enzima LOX (Sumner y Sumner, 1940). Unos años más tarde, Theorell (1947) consiguió por vez primera purificar y cristalizar el enzima. Durante esta década también fueron identificados como hidroperóxidos los productos de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Bergstrom, 1945), y posteriormente Privett et al., (1955) procedieron a su completa caracterización. El siguiente gran logro fue llevado a cabo por Chan (1973), al demostrar la presencia de un átomo de hierro por molécula de enzima, desautorizando todas las teorías que se habían dado hasta entonces sobre el mecanismo de reacción de la LOX basadas en la ausencia de grupo prostético. Finalmente, dentro de este breve recorrido histórico, merece destacarse que en los últimos cinco años se ha llevado a cabo la determinación de las estructuras primarias de los isoenzimas de LOX de soja (Shibata et al., 1987, 1988), y actualmente se espera la conclusión de la determinación de la estructura espacial (Stallings et al., 1990; Steczko et al., 1990) que quizás podría dar una explicación satisfactoria de los mecanismos de acción.

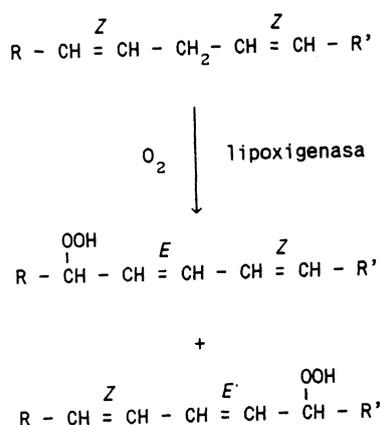
Frente al nivel de conocimientos que se tiene sobre el mecanismo de reacción enzimático de la LOX y la caracterización de sus productos, destacan las lagunas en la comprensión del papel fisiológico de este enzima en plantas. Sin embargo, una conclusión bastante clara parece deducirse del esfuerzo realizado hasta ahora, y es que no existe una única función fisiológica para LOX en el reino vegetal. Probablemente, la LOX tiene una función general en respuesta a requerimientos de la planta mediante la síntesis de hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados, que actuarían como intermediarios "llave" para un número de rutas metabólicas divergentes. De esta forma, la ruta de la LOX en plantas podría ser similar a las rutas de la LOX y ciclooxigenasa de animales, donde el hidroperóxido o endoperóxido formado por estos enzimas son transformados en leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, dependiendo de la naturaleza del estímulo celular. Estos metabolitos demuestran una poderosa actividad reguladora en mamíferos (Samuelsson et al., 1987; Schewe et al., 1986).

El propósito de esta primera parte del trabajo es el de revisar el estado actual de conocimientos existentes sobre la LOX en el reino vegetal, haciendo paralelamente

referencia a la LOX en el reino animal. En la segunda parte se recogerán los posibles papeles fisiológicos asignados a cada uno de los metabolitos resultantes de la cadena enzimática degradativa de ácidos grasos poliinsaturados denominada ruta de la LOX.

## 2. LA REACCION ENZIMATICA Y MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPOXIGENASA

La LOX (linoleato: oxígeno oxidoreductasa, EC 1.13.11.12) es un tipo de dioxigenasa que cataliza la incorporación de oxígeno molecular en moléculas que contengan un sistema Z,Z-1,4-pentadieno, de acuerdo con la siguiente reacción (Galliard y Chan, 1980):



Los sustratos específicos para LOX son ácidos grasos poliinsaturados con estructura Z,Z-1,4-pentadieno. Los más comunes con este tipo de estructura, dentro del reino vegetal, son los ácidos linoleico (C18:2, ω-6) y linolénico (C18:3, ω-3), mientras que en animales es el ácido araquidónico (C20:4, ω-6), aunque otros ácidos grasos con esta estructura son también sustratos efectivos de LOX en grado variable. Normalmente, pero no siempre, el oxígeno es incorporado en el ácido graso en la posición ω-6 u ω-10. El producto de la reacción es un hidroperóxido conjugado ya que el doble enlace Z atacado por el oxígeno se traslada para entrar en conjugación con el doble enlace Z vecino. En este proceso, el doble enlace que migra asume una configuración E. El carbono que soporta el grupo hidroperóxido, ya sea ω-6 u ω-10, tiene una estereoconfiguración S.

Teniendo en cuenta los compuestos que entran a formar parte de la reacción enzimática, se recomiendan fundamentalmente tres métodos de medida de la actividad LOX:

1. Medida del consumo de oxígeno mediante electrodo tipo Clark. El electrodo de oxígeno es el método más usado, reemplazando a los anteriores métodos manométricos. El método polarográfico es rápido, sensible y específico, pero es interferido por reacciones secundarias que conlleven oxidación, por lo que las medidas deben ser corregidas o bien eliminados los causantes de dichas reacciones.

2. Medida espectrofotométrica de la formación de dienos conjugados (Axelrod et al., 1981). Los hidroperóxidos procedentes de la oxidación enzimática presentan un cromóforo característico que absorbe a 234 nm con un coeficiente de extinción molar de ≈ 25.000 (Verhagen et al., 1977). Así, su formación puede ser seguida de forma continua en mezclas ópticamente transparentes o de forma discontinua por extracción con disolventes (Surrey, 1964). El procedimiento es específico y particularmente útil para enzimas purificadas, teniendo un valor limitado en extractos crudos debido a absorciones que pueden interferir o a reacciones secundarias de los hidroperóxidos que resultan en una destrucción del cromóforo.

3. Cuantificación de los productos de reacción marcados que provienen de sustratos marcados radioactivamente con <sup>14</sup>C o <sup>3</sup>H, después de su separación mediante cromatografía en capa fina o líquida de alta presión. Este método tiene como principales ventajas una alta sensibilidad, la posibilidad de medir actividad LOX en sistemas complejos tales como sistemas de células intactas y, quizás la más importante, la medida de la estequiometría de la reacción (Berkeley y Galliard, 1976). Por el contrario, aparte de ser un método laborioso, no permite realizar estudios cinéticos precisos.

El problema más importante que se encuentra en la medida de la actividad LOX es lograr una buena disposición de los ácidos grasos utilizados como sustrato, dada su escasa solubilidad en agua. Los pHs óptimos de actividad de LOX en la mayoría de los casos se sitúan entre 5,5 y 7,0, y a estos valores de pH, las dispersiones de ácidos grasos son inestables, formando agregados multimoleculares, incluyendo dímeros y micelas. Para paliar en lo posible este problema, se suelen utilizar los sustratos como sales amónicas, sódicas o potásicas, con o sin la ayuda de emulsionantes (Tween-20, Triton X-100, etc.). Sin embargo, es difícil obtener una buena reproducibilidad de las proporciones de sustratos, experimentándose algunas variaciones en la concentración aparente de éstos.

## 3. DISTRIBUCION DE LA LIPOXIGENASA

### 3.1. Reino vegetal

Es un hecho bien conocido que LOX es un enzima ampliamente distribuido en plantas superiores, no existiendo una localización en órganos concretos de éstas. Hasta los años 60 se creía que este enzima era propio sólo de semillas de leguminosas y ciertos cereales (Tappel, 1963). A partir de esta década comenzaron a surgir trabajos con grandes listas de plantas que dieron resultados positivos en la determinación de actividad LOX (Axelrod, 1974; Eskin et al., 1977; Galliard, 1978; Timm, 1978; Rhee y Watts, 1966; Pinsky et al., 1971). La afirmación de Axelrod (1974) en el sentido de que la no detección de actividad LOX en una planta determinada probablemente refleja un método de detección insensible o poco fiable podría ser correcta dada la amplia distribución ya

demostrada en el reino vegetal. Por otra parte, la existencia de inhibidores de LOX en los extractos crudos, tales como clorofila (Cohen et al., 1984) o  $\alpha$ -tocoferol (Grossman y Waksman, 1984) complicarían la detección de actividad LOX en extractos vegetales.

#### **Localización a nivel de órganos de la planta**

En las plantas, el enzima LOX no se encuentra confinado en un órgano en particular (Galliard y Chan, 1980). Su presencia se ha confirmado en raíces, cotiledones, hipocótilos, flores y hojas, y aún dentro de una misma planta, la actividad enzimática puede variar ampliamente. Así por ejemplo, en colza la actividad es alta en sus flores y baja en hojas y frutos (Pinsky et al., 1971).

En los últimos años, se han puesto a punto técnicas muy sofisticadas con el fin de establecer la localización precisa de LOX entre los órganos de la planta y entre los distintos tipos de células. En este sentido, Vernooy-Gerritsen et al., (1983) desarrollaron una técnica de tinte inmunofluorescente a partir de anticuerpos de isoenzimas de LOX de soja. Su aplicación a distintas partes de plántulas de soja, demostró la existencia de LOX en prácticamente todas las células de la planta a lo largo de la germinación. Esta casi ubicuidad hace difícil poder extraer conclusiones significativas sobre la o las posibles funciones fisiológicas del enzima LOX. Actualmente se preparan sondas moleculares en base a las regiones de la secuencia de aminoácidos que se conservan en las moléculas de LOX. Estas se convertirán en un instrumento ideal para la detección de LOX en otros materiales biológicos (Altschuler et al., 1989).

#### **Localización subcelular**

Se han realizado multitud de intentos con el fin de establecer la localización subcelular precisa de LOX, obteniéndose en general unos resultados ambiguos y conflictivos.

En los tejidos fotosintéticos de hoja hay evidencias que apuntan a la existencia de LOX asociada a la fracción cloroplástica, apareciendo una mayor actividad LOX en plastidios que en cloroplastos maduros (Douillard y Bergeron, 1978 y 1979). Sin embargo, esta interpretación no considera el efecto inhibitorio de la clorofila sobre la actividad LOX demostrado por Cohen et al. (1984). Es posible que los cloroplastos maduros, en su estado nativo, tengan una alta actividad LOX, pero las altas concentraciones de clorofila que alcanzan en la madurez reducen la actividad LOX *in vitro*. Por otra parte, Grossman et al. (1972) demostraron en alfalfa que LOX estaba asociada tanto a cloroplastos como a mitocondrias, encontrándose asimismo en el citoplasma. Vernooy-Gerritsen et al. (1984) demostraron mediante el uso de la técnica de inmunofluorescencia la presencia de LOX en el citoplasma de células del parénquima de almacén de los cotiledones de soja, al igual que en la epidermis del cotiledón y en las células del parénquima de hojas jóvenes, con la diferencia de que en éstos se encontraba cerca de los lugares donde las vacuolas iban a formarse. Asimismo, estudios sobre guisantes en germinación muestran que una gran proporción de la actividad LOX en la parte aérea de la planta se encuentra en el estroma cloroplástico,

mientras que en las raíces, LOX se encuentra asociada presumiblemente a vacuolas (Wardale y Galliard, 1977). Así pues, las evidencias sobre la localización subcelular son de tan poca ayuda como al distribución en los distintos tejidos de la planta antes comentada.

### **3.2. Reino animal**

La existencia de LOX en tejidos animales fue bastante cuestionada cuando empezaron a aparecer trabajos que afirmaban la existencia de este enzima en todo el reino vegetal, y esto era debido fundamentalmente a la creencia general de que la peroxidación lipídica en animales era exclusivamente debida a los omnipresentes enzimas hemínicos (Boyd y Adams, 1955; Tappel, 1963). La reveladora investigación sobre prostaglandinas llevada a cabo a mediados de los 70, condujo al descubrimiento de actividad LOX en plaquetas (Hamberg y Samuelson, 1974; Nugteren, 1975; Ho et al., 1977), leucocitos (Borgeat et al., 1976) y reticulocitos de conejo (Schewe et al., 1975). A partir de entonces, se ha encontrado actividad LOX en diferentes tejidos de órganos animales como testículos (Grossman et al., 1979), piel (Ruzicka et al., 1983) y tejido pulmonar (Yokoyama et al., 1983), así como en una amplia variedad de tipos de células (Samuelsson et al., 1987).

### **4. PROPIEDADES DEL ENZIMA LIPOXIGENASA**

La semilla de soja, una fuente relativamente rica de LOX, ha sido y es el material biológico más utilizado para los estudios enzimológicos de LOX. Actualmente, se considera que soja contiene cuatro isoenzimas, L-1, L-2, L-3a y L-3b (Axelrod, 1974; Axelrod et al., 1981), aunque los dos últimos son tan similares en comportamiento y composición que normalmente se consideran como uno sólo, L-3, en el que se habrían producido ciertas modificaciones postranscripcionales. En base a sus propiedades, los isoenzimas de LOX de soja se suelen agrupar en los tipos I y II. En el primero se incluye el isoenzima L-1, denominado básico en función de su pH óptimo de 9, y en el tipo II se incluyen los tres restantes isoenzimas ácidos, con pH óptimo entre 5,8-6,2 (Galliard y Chan, 1980). Todos ellos presentan un átomo de hierro no hemínico por molécula y una composición en aminoácidos con cierta similitud. Así, L-1 se compone de 838 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 94.038 daltons. Los valores correspondientes para L-2 son 865 residuos y un peso molecular de 97.035, y para L-3 son 859 y 96.541.

Parece existir una buena concordancia entre un gran número de autores sobre el papel que la cisteína podría jugar en la actividad LOX. El trabajo más exhaustivo en este sentido fue el realizado por Spaapen et al., (1980). Shibata et al. (1988) demuestran que de los 4, 5 y 7 residuos de cisteína presentes en L-1, L-2 y L-3 de soja respectivamente, sólo dos en posiciones 157 y 520 parecen ser coincidentes en los tres isoenzimas. Por otra parte, en los tres isoenzimas se localiza una región de 40 aminoácidos con un alto nivel de identidad que presenta

6 histidinas, de las cuales cuatro serían ligandos del átomo de hierro por sus átomos de nitrógeno, adoptando una disposición planar. La histidina es un ligando común del hierro en proteínas no hemínicas tales como transferrina y catecol oxidasa. Asimismo, esta región conserva cerca de las histidinas proximal y distal sendos residuos de tirosina, los cuales también podrían ser ligandos del hierro. Klein et al. (1985) demostraron la existencia de dos residuos de triptófano esenciales en el sitio activo del enzima tanto para la oxidación del ácido linoleico como para la actividad cooxidativa de pigmentos, actividad que presentan algunos isoenzimas de LOX.

Es interesante mencionar que sólo uno de los dos residuos de cisteína que se conservan posicionalmente en los tres isoenzimas está localizado cerca de la región de histidinas y tirosinas. Este está implicado en la actividad enzimática, como lo demuestran los tratamientos con compuestos alquilmercúricos que dan lugar a interferencias de tipo estérico o eléctrico con el sitio catalítico de LOX.

LOX de animales es similar a LOX de plantas en su actividad enzimática primaria y especificidad general por sustratos que contienen un sistema pentadieno. Todos los estudios realizados hasta ahora, indican la presencia de un átomo de hierro que necesita ser activado por hidropéroxido al igual que en plantas. El peso molecular oscila entre 68.000 y 100.000 daltons. Todavía no se ha conseguido la secuenciación completa de aminoácidos de ninguna LOX de procedencia animal como la ya realizada en soja, pero en principio, la secuenciación parcial de LOX-15 de reticulocito de conejo (Thiele et al., 1987) no parece mostrar una homología significativa con LOX de soja.

Las propiedades inmunológicas de isoenzimas LOX de plantas han sido comparadas por varios grupos de trabajo. De esta forma, se ha demostrado una gran similitud tanto de la estructura general de los enzimas como de la estructura de los sitios activos en materiales biológicos tan diversos como soja, patata, y berenjena (Trop et al., 1974). Sin embargo, se ha encontrado que LOX en tejidos de soja recién diferenciados como raíces, hipocotilos y hojas son inmunológicamente distintos de LOX procedentes de semillas de la misma planta, no reaccionando con anticuerpos de L-2 en ensayos de doble difusión (Peterman y Siedow, 1985).

## 5. PROPIEDADES DE LA REACCION ENZIMATICA

### 5.1. Mecanismos de reacción

El hierro desempeña un papel esencial dentro de la acción catalítica de LOX. Cada molécula de LOX de soja contiene un átomo de hierro que alterna entre los estados de oxidación Fe(II) y Fe(III) durante el proceso catalítico. Una de las características de la reacción enzimática es el período inicial de inducción que es sólo evitado cuando se añade hidropéroxido al medio de reacción. Para explicar esto, Vliegenthart et al. (1982) consideran la existencia de dos poblaciones del enzima, una que contiene Fe(II) alto spin y otra Fe(III) alto spin. Estudios

de EPR y espectroscopía Mössbauer muestran que LOX en estado nativo está predominantemente en la forma Fe(II), conteniendo aproximadamente un 1% de Fe(III) (Slappendel et al., 1981; Draheim et al., 1989; Dunham et al., 1990).

LOX se puede presentar *in vitro* en dos formas diferentes. La forma amarilla, que se encuentra al añadir un equivalente molar de 13-hidropéroxido del ácido linoleico, muestra al igual que el enzima nativo un período inicial de inducción en la reacción de oxigenación. Al añadir un exceso de hidropéroxido, el enzima pasa a la forma púrpura. Esto es debido a la formación de un complejo entre el enzima amarillo y el hidropéroxido. El enzima púrpura parece mostrar alrededor del átomo de hierro un ambiente rómbico, mientras que el enzima amarillo es predominantemente axial (Slappendel et al., 1981), postulándose la idea de que el enzima púrpura es la forma activa durante la reacción enzimática.

La mayoría de los isoenzimas de LOX son regio y estereoespecíficos en el lugar de ataque del oxígeno, de esta forma, y con muy pocas excepciones, forman 13S- o 9S-hidropéroxidos. Otros isoenzimas, como L-2 de soja, se caracterizan por una menor regio y estereoespecificidad, dando lugar a mezclas racémicas de 9R-, 9S-, 13R- y 13S-hidropéroxidos.

La peculiaridad que ciertos isoenzimas de LOX presentan de formar dos productos ópticamente activos, 13S- y 9S-hidropéroxidos, se debe aparentemente a la doble posibilidad de posición que puede adoptar el ácido graso en el sitio activo del enzima (Gardner, 1989), es decir orientación de cabeza a cola o viceversa (Kühn et al., 1986; Funk et al., 1987). De esta forma, el ataque del

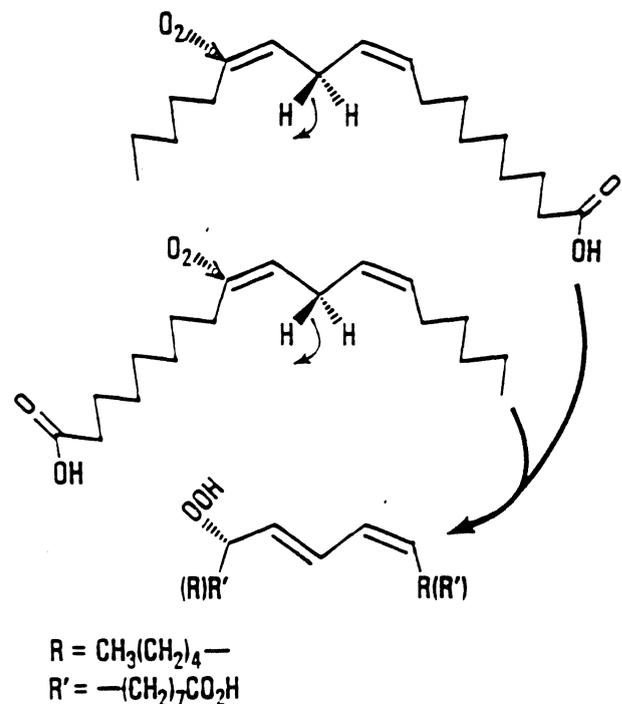


Figura 1  
Oxidación del ácido linoleico a 9S- o 13S-hidropéroxido dependiendo de su orientación cabeza-cola o viceversa (adaptado de Gardner, 1989)

oxígeno es idéntico para la formación del 13S- y 9S-hidroperóxido, según se oriente el ácido graso. Asimismo, la abstracción de hidrógeno por LOX, primer paso de la reacción de oxigenación y paso limitante de la velocidad, es estereoespecífica, siendo espacialmente idéntica en ambas orientaciones del ácido graso. La oxidación del ácido linoleico a 13S-hidroperóxido conlleva la liberación del hidrógeno pro-S- del metileno bis-alílico, mientras que la formación del derivado 9S-es debida a la liberación del hidrógeno pro-R.

En experiencias llevadas a cabo con L-1 de soja se ha encontrado que la proporción de derivados 9S y 13S producidos depende fuertemente del pH. Así, el 9S-hidroperóxido no es formado enzimáticamente cuando el ácido linoleico está en forma aniónica a pH alto, pero se encuentra a medida que el pH de reacción baja. Se deduce de estos datos que el anión linoleato sólo puede adoptar una orientación en el sitio activo dando lugar exclusivamente a 13S-hidroperóxido, pero a pH más bajo, el ácido linoleico puede entrar en el sitio activo en cualquiera de las dos posiciones dando lugar consiguientemente a ambos productos (Gardner, 1989).

Desde la aparición de las primeras publicaciones sobre LOX en plantas, numerosos mecanismos de reacción

se han propuesto para explicar cada una de las características de este enzima. El mecanismo enzimático más aceptado en la actualidad (Ludwig et al., 1987) postula que LOX nativa contiene Fe(II) alto spin, no hemínico, en el sitio activo, que es activado por el producto de reacción para dar lugar a Fe(III) alto spin. De esta forma se explica la existencia de un período de inducción y de una actividad hidropoxidasa. El Fe(III) oxida al sustrato para dar lugar a un radical pentadienilo y un protón, reduciéndose el hierro a la forma Fe(II). El siguiente paso corresponde al ataque del oxígeno para dar lugar a un radical peroxilo. Aparentemente, ésta es la especie que es reducida por Fe(II) para dar el anión peroxilo y la consiguiente oxidación del hierro a la forma Fe(III) completando el ciclo.

Cuando existe una concentración de oxígeno baja, se produce una actividad enzimática anómala llamada hidropoxidasa o simplemente ciclo anaerobio del enzima (Pettersson et al., 1987); Ludwig et al., 1987). En éste, el radical pentadienilo no completa el ciclo reaccionando con oxígeno, sino que es liberado del enzima cerrándose el ciclo por reacción del Fe(II) con el hidroperóxido para liberar un radical alcoxi y un ión hidroxilo. Es por ello que la concentración de oxígeno puede determi-

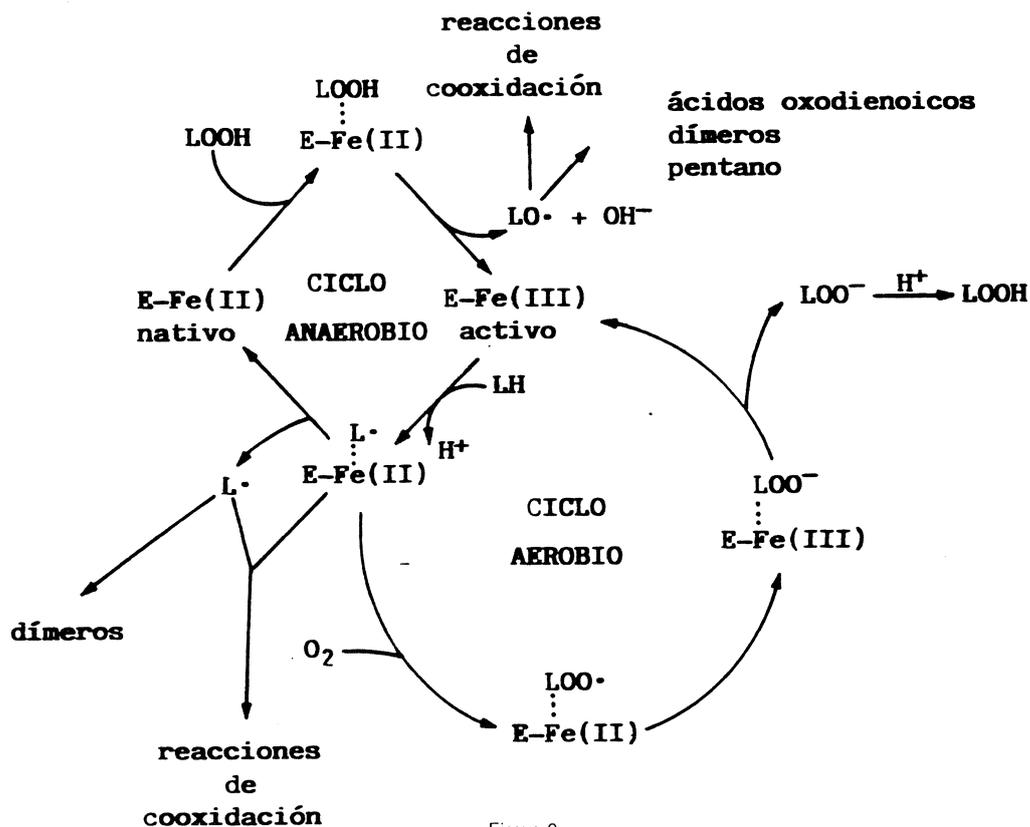


Figura 2  
Mecanismo enzimático de lipoxigenasa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (adaptado de Ludwig et al., 1987)

nar la proporción de actividades dioxigenasa/hidropoxidasa del enzima. La principal consecuencia de la liberación de radicales es la pérdida de regio y estereoselectividad en la formación de los productos. Las distintas especificidades publicadas por diferentes autores para los

mismos isoenzimas pueden ser debidas, por tanto, a la competición existente entre las actividades dioxigenasa e hidropoxidasa, ya que estos autores emplean diferentes concentraciones de oxígeno en la reacción enzimática.

Aunque en principio este ciclo se propuso para enzimas tipo I (según Galliard y Chan, 1980), también es perfectamente aplicable a las LOX tipo II pero con algunas variaciones. Así, bajo las condiciones de pH óptimo para enzimas del tipo II (5,5-7,0), los radicales son más fácilmente liberados del enzima que en el caso de LOX tipo I. Esto explicaría por qué LOX tipo II produce altas proporciones relativas de compuestos carbonílicos (ceto-dienos) en condiciones aeróbicas. Este esquema es también consistente con la observación de que LOX tipo II

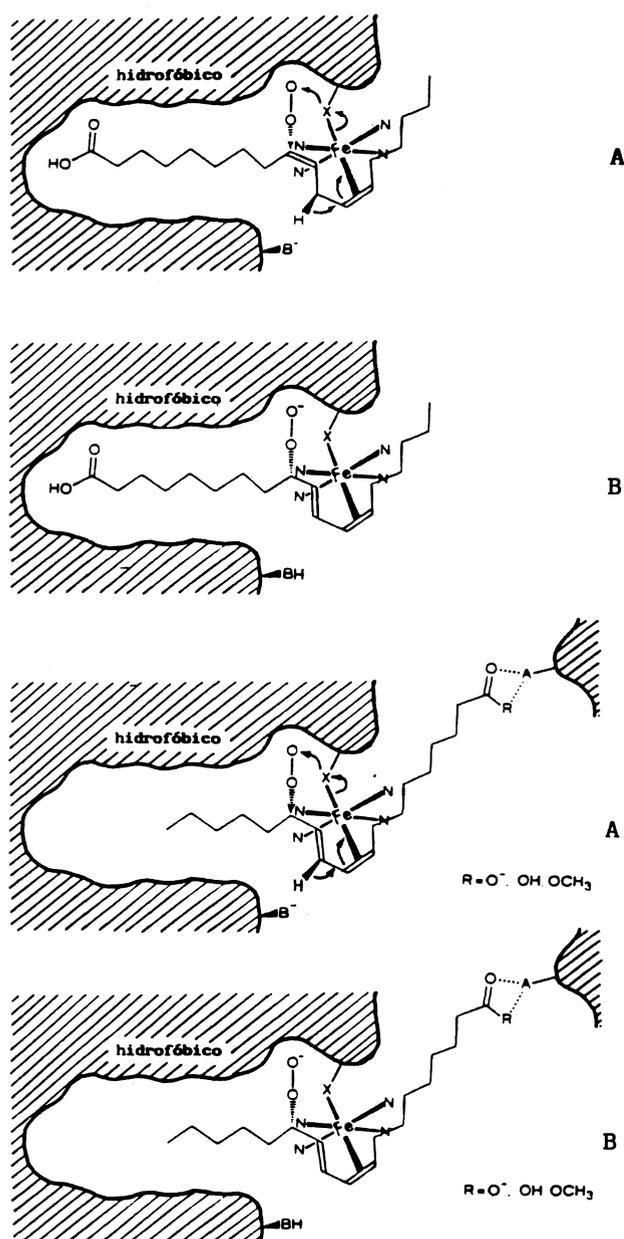


Figura 3

Modelo de sitio activo que muestra la similitud de la abstracción de H y oxidación de moléculas de sustrato orientadas de forma opuesta.

A. Ataque inicial del  $O_2$  y transferencia electrónica desde la olefina, vía el Fe activo, a un aminoácido que actúa como aceptor electrónico.

B. Reacción completa (adaptado de Gardner, 1989).

produce aproximadamente iguales cantidades de 9- y 13-hidroperóxido, con configuraciones *R* o *S* también en las mismas proporciones (Van Os et al., 1979).

Gardner (1989), a partir de la información que se encuentra en la literatura y de sus propias experiencias propone un modelo de sitio activo según el cual, LOX funcionaría básicamente como un ciclo redox entre la forma férrica de alto spin y ferrosa también de alto spin, alimentado por la oxidación de sustrato y la reducción del radical peroxilo resultante (Petersson et al., 1987; Ludwig et al., 1987). Los cuatro ligandos en disposición planar del hierro están ocupados por nitrógeno imidazólico (Navaratnam et al., 1988) y los dos ligandos axiales serían activos para el transporte electrónico entre sustrato y oxígeno/radical peroxilo. Dada la tendencia que tienen las olefinas para complejar con hierro (Corey et al., 1986; Corey y d'Alarco, 1986), se sugiere que la olefina adoptaría una posición axial en la esfera de coordinación del hierro, hipotetizándose asimismo la existencia de una interacción hidrofóbica sustrato-proteína. Corey et al. (1986) postularon un mecanismo de abstracción de hidrógeno del metileno bis-alílico que involucra a una base de Lewis que forma parte de LOX. La forma férrica del enzima acepta un electrón del doble enlace, lo que da lugar a una desprotonación del metileno bis-alílico vecino por dicha base. La transferencia electrónica desde la forma ferrosa de LOX al oxígeno es más enigmática, pero se puede asegurar que el oxígeno no coordina al hierro, implicando que la acción de LOX es simplemente la de activar el sustrato y que la transferencia electrónica está mediada por un componente proteico que provoca la oxidación estereoespecífica de carbonos lejanos. Entre los candidatos para esta transferencia electrónica se propone a los aminoácidos metionina (Zakut et al., 1976), tirosina (Cohen et al., 1985) y cisteína (Spaapen et al., 1980). Por otra parte, Finazzi-Agró et al (1973) también propusieron al triptófano como posible implicado en el paso de oxidación o, al menos, su probable situación en las cercanías del sitio de ataque del oxígeno, ya que la intensidad de fluorescencia de LOX, atribuida a este aminoácido, sufre alteraciones durante la reacción enzimática.

## 5.2. Reacciones de cooxidación

LOX debe su nombre original, caroteno oxidasa, a su capacidad para oxidar carotenos y otros pigmentos, descubierta antes que sus propiedades oxidantes de ácidos grasos poliinsaturados por lo que es más conocida en la actualidad. Hoy día se sabe que LOX es una parte integrante del proceso, pues para que la cooxidación del pigmento tenga lugar se necesita la presencia tanto del ácido graso como del enzima.

Los distintos isoenzimas de LOX presentan distinta efectividad en la catálisis de la reacción cooxidativa, existiendo cierta confusión en si son más efectivos individualmente o en combinación por un proceso sinérgico. Bajo condiciones aeróbicas L-1 de soja tiene un bajo potencial cooxidativo, pero en condiciones anaeróbicas es un fuerte agente cooxidante en presencia de ácido graso e hi-

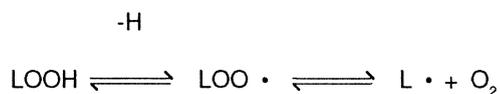
droperóxido (Axelrod, 1974; Klein et al., 1984). Los resultados obtenidos por Klein et al. (1984) parecen sugerir que el complejo E-Fe(II) L. del ciclo anaerobio de LOX es el verdadero agente oxidante de pigmentos y no los radicales alquilo, alcoxi o peroxilo, que también se forman en dicho ciclo.

A lo largo del tiempo se ha pensado que los radicales libres son los responsables del blanqueamiento de los pigmentos durante la reacción de LOX. Puesto que los radicales libres son producidos en gran cantidad durante la reacción anaeróbica, la efectividad de un determinado isoenzima de LOX para provocar dicho blanqueamiento de pigmentos depende en parte de su capacidad para participar en el ciclo anaerobio, ya que en éste se libera el radical antes de reaccionar con el oxígeno. Así, L-1 de soja puede ser alterada químicamente por modificación de sus grupos sulfhidrilos con yoduro metilmercúrico (Grossman et al., 1984) de modo que, en condiciones aeróbicas, provoca el blanqueamiento de pigmentos igual que el enzima no modificado en condiciones anaeróbicas. Esto sugiere que la modificación química de los grupos sulfhidrilos de L-1 de soja provocaría un aumento de la disociación de los radicales del complejo enzimático antes que éste reaccione con el oxígeno.

Es muy probable que existan diferentes mecanismos de cooxidación dependiendo de la naturaleza del pigmento. Hildebrand y Hymowitz (1982) sugieren que los mecanismos de blanqueamiento de clorofilas y carotenos son diferentes. Mediante el uso de antioxidantes como el 2,6-dit-*t*-butil-4-hidroxitolueno (BHT), se ha podido comprobar que hay un primer tipo de cooxidación mediante radicales libres que se disocian del enzima, como es el caso de la cooxidación de clorofilas, y un segundo tipo que lleva a cabo el proceso de cooxidación por radicales unidos al enzima por el sitio catalítico (Regdel et al., 1985).

Otras propiedades catalíticas:

LOX muestra otras propiedades enzimáticas como son el intercambio de oxígeno y la doble oxigenación. Mediante el uso de  $^{18}\text{O}$  se ha comprobado un proceso de intercambio de oxígeno en el hidroperóxido que ocurre con la participación del enzima, ya que existe una retención de la estereoconfiguración, cosa que no ocurriría en el caso de un fenómeno químico (Matthew y Chan, 1983). Por lo tanto, LOX podría catalizar reacciones del tipo:



Cuando se utilizan como sustrato ácidos grasos con más de dos dobles enlaces, como el ácido araquidónico, la oxigenación puede ocurrir dos veces en la misma molécula (Bild et al., 1977). Así, se han identificado derivados del ácido araquidónico con dos grupos hidroperóxidos en posiciones 8,15 y 5,15, y una estereoconfiguración predominantemente *S* (Van Os et al., 1981). Estos derivados pueden sufrir en condiciones favorables reacciones de reordenación para dar lugar a las prostaglandinas (Bild et al., 1978).

### 5.3. Inhibidores de la actividad LOX

Los inhibidores de LOX podrían ser unas herramientas muy valiosas para el estudio del papel de LOX y sus productos en sistemas biológicos, pero es muy difícil encontrar inhibidores totalmente específicos. Así, el ácido nordihidroguayarático (NDGA) y el 3-*t*-butil-4-hidroxianisol (BHA) se caracterizan por ser unas buenas sondas del sitio activo de LOX, ya sea gracias a sus propiedades quelantes de Fe(III) o como activos secuestradores de radicales, lo que hay que tener muy en cuenta en las experiencias.

Existen varias clases de inhibidores de LOX, entre ellos están:

- Ácidos grasos acetilénicos. Parece que sirven como sustrato para LOX dando lugar a un hidroperoxialeno altamente reactivo, que podría reaccionar covalentemente con los residuos de aminoácidos del sitio activo del enzima.

- Catecoles. Actúan como agentes quelantes de Fe(III) y secuestradores de radicales libres. Entre los más conocidos están el NDGA y el propilgalato.

- Ácidos hidroxámicos. También son buenos agentes quelantes de Fe(III).

- Fenoles. Como el BHA, que al igual que la mayoría de los fenoles tiene propiedades antioxidantes.

- Pirazolininas. El mecanismo de acción de las pirazolininas no ha sido aún establecido, pero se puede concluir que es diferente del mecanismo de acción de los quelantes de hierro.

- Fenilhidrazonas. Como la fenidona, cuyo mecanismo de acción no se conoce.

- Disulfuros. El único estudiado hasta ahora ha sido el difenildisulfuro, siendo aún desconocido su mecanismo de acción.

Un fenómeno muy importante que muestra LOX es la autoinactivación. La inestabilidad de LOX de guisante y trigo durante el proceso catalítico fue ya observada por Tappel (1963) y confirmado más recientemente por Regdel et al. (1985). Cook y Lands (1975), en estudios de cinética enzimática de LOX de soja con ácido araquidónico como sustrato, observaron una destrucción autocatalizada por el enzima. Iguales resultados fueron encontrados en la dioxigenación con LOX de guisante (Regdel et al., 1985). Aparentemente, la autoinactivación de LOX de soja no ocurre con ácido linoleico como sustrato, al menos en las condiciones en que otras LOXs sufren inactivación. LOX de reticulocito de conejo muestra una invariable autoinactivación a temperaturas superiores a 20°C independientemente del tipo de sustrato utilizado en la reacción.

En un estudio sobre el mecanismo de inactivación anaeróbica de LOX de reticulocito por 13-hidroperóxido, se encontró la aparición paralela de un mol de sulfóxido de metionina por mol de enzima (Rapoport et al., 1984). Los mismos resultados se obtuvieron por inactivación aeróbica empleando un mayor tiempo de reacción. Por el contrario L-1 de soja no sufre autoinactivación o formación de sulfóxido de metionina en idénticas condiciones. Ya que el hidroperóxido se une con toda probabilidad al hierro en el sitio activo de LOX, como se ha visto en la

forma púrpura de L-1 de soja, la metionina susceptible puede estar localizada en el centro activo. Esto parece ser cierto tanto para LOX de reticulocito como para L-1 de soja, toda vez que la inactivación de este último enzima por ácido araquidónico va acompañada de la formación de un mol de sulfóxido de metionina por mol de enzima, y la alquilación de una metionina del enzima lleva también a su inactivación (Zakut et al., 1976).

#### BIBLIOGRAFIA

- Altschuler, M.; Collins, G.B. y Hildebrand, D.F. (1989).- "Development expression of lipoxygenases in soybeans".- *Plant Sci.* **63**, 151-158.
- André, E. y Hou, K.W. (1932).- "The presence of a lipid oxidase in soybean, *Glycine soya*, Lib".- *C.R. Acad. Sci. Paris* **194**, 645-647.
- Axelrod, B. (1974).- "Lipoxygenases" en "Food Related Enzymes", pp. 324-348.- J.R. Whitaker (Ed.).- *Adv. Chem. Ser.* **136**, A.C.S. Washington, D.C.
- Axelrod, B.; Cheesbrough, T.M. y Laakso, S. (1981).- "Lipoxygenase from soybeans".- *Methods Enzymol.* **71**, 441-451.
- Bergström, S. (1945).- "On the autoxidation of the methyl ester of linoleic acid".- *Ark. Kemi. Mineral Geol.* **21A**, 1-18.
- Berkeley, H.D. y Galliard, T. (1976).- "Measurement of lipoxygenase in crude and partially purified potato extracts".- *Phytochemistry* **15**, 1.475-1.479.
- Bild, G.S.; Bhat, S.G.; Ramadoss, C.S. y Axelrod, B. (1978).- "Biosynthesis of a prostaglandin by a plant enzyme".- *J. Biol. Chem.* **253**, 21-23.
- Bild, G.S.; Ramadoss, C.S.; Lim, S. y Axelrod, B. (1977).- "Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase-1".- *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 949-954.
- Borgeat, P.; Hamberg, M. y Samuelsson, B. (1976).- "Transformation of arachidonic acid and homo- $\gamma$ -linoleic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes: monohydroxy acids from novel lipoxygenases".- *J. Biol. Chem.* **251**, 7.816-7.820.
- Boyd, D.H. y Adams, G.A. (1955).- "Assay method for lipoxidase in animal tissue".- *Can. J. Physiol.* **33**, 191-198.
- Chan, H.W.S. (1973).- "Soybean lipoxygenase: an iron-containing dioxygenase".- *Biochem. Biophys. Acta* **327**, 32-35.
- Cohen, B.S.; Grossman, S.; Klein, B.P. y Pinsky, A. (1985).- "Pigment bleaching by soybean lipoxygenase type-2 and the effect of specific chemical modifications".- *Biochim. Biophys. Acta* **837**, 279-287.
- Cohen, B.S.; Grossman, S.; Pinski, A. y Klein, B.P. (1984).- "Chlorophyll inhibition of lipoxygenase in growing pea plants".- *J. Agric. Food Chem.* **32**, 516-519.
- Cook, H.W. y Lands, W.E.M. (1975).- "Further studies of the kinetics of oxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase".- *Can. J. Biochem.* **53**, 1.220-1.231.
- Corey, E.J. y D'Alarcao, M. (1986).- "12-methylidene-10(Z), 13(Z)-nonadecadienoic acid, a new irreversible inhibitor of soybean lipoxygenase".- *Tetrahedron Lett.* **27**, 3.589-3.590.
- Corey, E.J. D'Alarcao, M. y Matsuda, S.P.T. (1986).- "A new irreversible inhibitor of soybean lipoxygenase; relevance to mechanism".- *Tetrahedron Lett.* **27**, 3.585-3.588.
- Douillard, R. y Bergeron, E. (1978).- "Lipoxygenase activity of wheat shoot chloroplasts".- *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D* **286**, 753-755.
- Douillard, R. y Bergeron, E. (1979).- "Lipoxygenase Activity Distribution in Young Wheat Chloroplast Lamellae" en "Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids", pp. 159-164.- A. Appelqvist, C.D. Liljeborg (Eds.).- Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Draheim, J.E.; Carroll, R.T., McNemar, T.B.; Dunham, W.R.; Sands, R.H., y Funk, M.O. (1989).- "Lipoxygenase isoenzymes: a spectroscopic and structural characterization of soybean seed enzymes".- *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 208-218.
- Dunham, W.R.; Carroll, R.T.; Thompson, J.F.; Sands, R.H. y Funk, M.O. (1990).- "The initial characterization of the iron environment in lipoxygenase by Mössbauer spectroscopy".- *Eur. J. Biochem.* **190**, 611-617.
- Eskin, N.A.M.; Grossman, S. y Pinsky, A. (1977).- "Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality".- *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **9**, 1-41.
- Finazzi-Agrò, A.; Avigliano, L.; Veldink, G.A.; Vliegthart, J.F.G. y Bol-dingh, J. (1973).- "The influence of oxygen on the fluorescence of lipoxygenase".- *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 462-470.
- Funk, M.O. Jr.; André, J.C. y Otsuki, T. (1987).- "Oxygenation of trans polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase reveals steric features of the catalytic mechanism".- *Biochemistry* **26**, 6.880-6.884.
- Galliard, T. (1978).- "Lipolitik and Lipoxygenase Enzymes in Plants and their Action in Wounded Tissues" en "Biochemistry of Wounded Plant Storage Tissues", pp. 155-201.- G. Kahl (Ed.).- De Gruyter, Berlin.
- Galliard, T. y Chan, H.W.-S. (1980).- "Lipoxygenases" en "The Biochemistry of Plants", Vol. 4, pp. 131-159.- P.K. Stumpf (Ed.).- Academic Press Inc. New York.
- Gardner, H.W. (1989).- "Soybean lipoxygenase-1 enzymatically forms both 9(S) and 13 (S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism".- *Biochim. Biophys. Acta* **1.001**, 274-281.
- Grossman, B.; Ben-Aziz, A.; Ascarelli, I. y Budowski, P. (1972).- "Intracellular distribution of lipoxygenase-like activity of alfalfa leaves".- *Phytochemistry* **11**, 509-514.
- Grossman, S.; Klein, B.P.; Cohen, B.; King, D. y Pinsky, A. (1984).- "Methylmercuric iodide modification of lipoxygenase-1 effect on the anaerobic reaction and pigment bleaching".- *Biochim. Biophys. Acta* **793**, 455-462.
- Grossman, S.; Shabin, I. y Sredni, B. (1979).- "Rat testis lipoxygenase-like, enzyme characterization of products from linoleic acid".- *Biochim. Biophys. Acta* **572**, 293-297.
- Grossman, S. y Waksman, E.G. (1984).- "New aspects of the inhibition of soybean lipoxygenase by  $\alpha$ -tocopherol. Evidence for the existence of a specific complex".- *Int. J. Biochem.* **16**, 281-289.
- Haas, L.W. y Bohn, R. (1934).- "Bleaching bread dough".- U.S. Patent 1.957.333-1.957.337.
- Hamberg, M. y Samuelsson, B. (1974).- "Prostaglandin endoperoxides. III. Novel transformation of arachidonic acid in human platelets".- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 3.400-3.405.
- Hildebrand, D.F. y Hymowitz, T. (1982).- "Carotene and chlorophyll bleaching by soybeans with and without seed lipoxygenase-1".- *J. Agric. Food Chem.* **30**, 705-708.
- Ho, P.P.K.; Walters, C.P. y Sullivan, H.R. (1977).- "A particulate arachidonate lipoxygenase in human blood platelets".- *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**, 398-405.
- Klein, B.P.; Cohen, B.S.; Grossman, S.; King, D.; Malovany, H. y Pinsky, A. (1985).- "Effect of modification of soybean lipoxygenase-1 with N-bromosuccinimide on linoleate oxidation, pigment bleaching and carbonyl production".- *Phytochemistry* **24**, 1.903-1.906.
- Klein, B.P.; Grossman, S.; King, D.; Cohen, B.S. y Pinsky, A. (1984).- "Pigment bleaching, carbonyl production and antioxidant effects during the anaerobic lipoxygenase reaction".- *Biochim. Biophys. Acta* **793**, 72-79.
- Kühn, H.; Schewe, T. y Rapoport, S.M. (1986).- "The Stereochemistry of the Reactions of Lipoxygenases and Their Metabolites: Proposed Nomenclature of Lipoxygenases and Related Enzymes" en "Advances in Enzymology". Vol. 58, pp. 273-311.- A. Meister (Ed.).- J. Wiley and Sons, New York.
- Ludwig, P.; Holzhütter, H.G.; Colosimo, A.; Silrestrini, M.C.; Schewe, T. y Rapoport, M.S. (1987).- "A kinetic model for lipoxygenases based on the experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes".- *Eur. J. Biochem.* **168**, 325-327.
- Matthew, J.A. y Chan, H.W.-S. (1983).- "Soybean lipoxygenase-I catalyzed exchange of molecular oxygen in 13-S-hydroperoxi-9-cis,11-trans-octadecadienoic acid".- *J. Food. Biochem.* **7**, 1-6.
- Navaratnam, S.; Feiters, M.C.; Al-Hakim, M.; Allen, J.C.; Veldink, G.A. y Vliegthart, J.F.G. (1988).- "Iron environment in soybean lipoxygenase-1".- *Biochim. Biophys. Acta* **956**, 70-76.
- Nugteren, D.H. (1975).- "Arachidonate lipoxygenase in blood platelets".- *Biochim. Biophys. Acta* **380**, 299-307.
- Peterman, T.K. y Siedow, J.N. (1985).- "Immunological comparison of lipoxygenase isozymes-1 and -2 with soybean seedling lipoxygenases".- *Arch. Biochem. Biophys.* **238**, 476-483.
- Petersson, L.; Slappendel, S.; Feiters, M.C. y Vliegthart, J.F.G. (1987).- "Magnetic susceptibility studies on yellow and anaerobically substrate-treated yellow soybean lipoxygenase-1".- *Biochim. Biophys. Acta* **913**, 228-237.
- Pinsky, A.; Grossman, S. y Trop, M. (1971).- "Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables".- *J. Food Sci.* **36**, 571-572.
- Privett, O.S.; Nickell, C.; Lundberg, W.O. y Boyer, P.D. (1955).- "Products of the lipoxygenase-catalyzed oxidation of sodium linoleate".- *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **32**, 505-511.
- Rapoport, S.M.; Härtel, B. y Hausdorf, G. (1984).- "Methionine sulfoxide formation: the cause of self-inactivation of reticulocyte lipoxygenase".- *Eur. J. Biochem.* **139**, 573-576.

- Regdel, D.; Schewe, T. y Rapoport, S.M. (1985).- "Enzymic properties of the lipooxygenase from pea seeds".- *Biomed. Biochim. Acta* **44**, 1.411-1.428.
- Rhee, K.S. y Watts, B.M. (1966).- "Evaluation of lipid oxidation in plant tissues".- *J. Food Sci.* **31**, 664-668.
- Ruzicka, T.; Vitto, A. y Printz, M.P. (1983).- "Epidermal arachidonate lipooxygenase".- *Biochim. Biophys. Acta* **751**, 369-374.
- Samuelsson, B.; Dahlen, S.P.; Lindgren, J.A.; Rouzer, C.A. y Serhan, C.N. (1987).- "Leucotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects".- *Science* **237**, 1.171-1.176.
- Schewe, T.; Rapoport, S.M. y Kühn, H. (1986).- "Enzymology and physiology of reticulocyte lipooxygenase: comparison with other lipooxygenases".- *Adv. Enzymol. Mol. Biol.* **58**, 191-272.
- Schewe, T.; Halangk, W.; Hiebsch, C. y Rapoport, S.M. (1975).- "A lipooxygenase in rabbit reticulocyte which attacks phospholipids and intact mitochondria".- *FEBS Lett.* **60**, 149-152.
- Shibata, D.; Steczko, J.; Dixon, J.W.; Andrews, P.C.; Hermodson, M. y Axelrod, B. (1988).- "Primary structure of soybean lipooxygenase-2".- *J. Biol. Chem.* **263**, 6.816-6.821.
- Shibata, D.; Steczko, J.; Dixon, J.E.; Hermodson, M.; Yazdanparast, R. y Axelrod, B. (1987).- "Primary structure of soybean lipooxygenase-1".- *J. Biol. Chem.* **262**, 10.080-10.085.
- Slappendel, S.; Veldink, G.A.; Vliegthart, J.F.G.; Aasa, R. y Malmström, B.G. (1981).- "EPR spectroscopy of soybean lipooxygenase-1. Description and quantification of the high-spin Fe(III) signals".- *Biochim. Biophys. Acta* **667**, 77-86.
- Spaapen, L.J.M.; Verhagen, J.; Veldink, G.A. y Vliegthart, J.F.G. (1980).- "The effect of modification of sulfhydryl groups in soybean lipooxygenase-1".- *Biochim. Biophys. Acta* **618**, 153-162.
- Stallings, W.C.; Kroa, B.A.; Carrol, R.T.; Metzger, A.L. y Funk, M.O. (1990).- "Crystallization and preliminary X-ray characterization of a soybean seed lipooxygenase".- *J. Mol. Bio.* **211**, 685-687.
- Steczko, J.; Muchmore, C.R.; Smith, J.L. y Axelrod, B. (1990).- "Crystallization and preliminary X-ray investigation of lipooxygenase-1 from soybean".- *J. Biol. Chem.* **265**, 11.352-11.354.
- Sumner, J.B. y Sumner, R.J. (1940).- "The coupled oxidation of carotene and fat by carotene oxidase".- *J. Biol. Chem.* **134**, 531-536.
- Surrey, K. (1964).- "Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity".- *Plant Physiol.* **39**, 65-70.
- Tappel, A.L. (1963).- "Lipoxidase" en "The Enzymes", pp. 275-285.- P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback (Eds.).- Academic Press, New York.
- Theorell, H.; Holman, R.T. y Akesson, A. (1947).- "Crystalline lipoxidase".- *Acta Chem. Scand.* **1**, 571-576.
- Thiele, B.J.; Black, E.; Fleming, J.; Nack, B.; Rapoport, S.M. y Harrison, P.R. (1987).- "Cloning of reticulocyte lipooxygenase mRNA".- *Biomed. Biochim. Acta* **46**, 120-123.
- Timm, U. (1978).- "Lipooxygenase, actions and subsequent reactions".- *Alimenta* **17**, 31-37.
- Trop, M.; Grossman, S. y Veg, Z. (1974).- "The antigenicity of lipooxygenase from various plant sources".- *Ann. Bot.* **38**, 783-794.
- Van Os, C.P.A. Rijke-Schilderg, G.P.M.; Van Halbeek, H.; Verhagen, J. y Vliegthart, J.F.G. (1981).- "Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipooxygenase-1. Kinetics and regio-stereo specifications of the reaction steps".- *Biochim. Biophys. Acta* **663**, 177-193.
- Van Os, C.P.A.; Rijke-Schilderg, G.P.M. y Vliegthart, J.F.G. (1979).- "9-L<sub>β</sub>-linoleyl hydroperoxide, a novel product from the oxygenation of linoleic acid by type-2 lipooxygenase from soybeans and peas".- *Biochim. Biophys. Acta* **575**, 479-484.
- Verhagen, J.; Bouman, A.A.; Vliegthart, J.F.G. y Boldingh, J. (1977).- "Conversion of 9-D and 13-L-hydroperoxylinoleic acids by soybean lipooxygenase-1 under anaerobic conditions".- *Biochim. Biophys. Acta* **486**, 114-120.
- Vernoy-Gerritsen, M.; Bos, A.L.M.; Veldink, G.A. y Vliegthart, J.F.G. (1983).- "Localization of lipooxygenase-1 and -2 in germinating soybean seeds by and indirect immunofluorescence technique".- *Plant Physiol.* **73**, 262-267.
- Vernoy-Gerritsen, M.; Leunissen, J.L.M.; Veldink, G.A. y Vliegthart, J.F.G. (1984).- "Intracellular localization of lipooxygenases-1 and -2 in germinating soybean seeds by indirect labeling with protein A-colloidal gold complexes".- *Plant Physiol.* **76**, 1.070-1.079.
- Vliegthart, J.F.G.; Veldink, G.A.; Verhagen, J.; Slappendel, S. y Vernoy-Gerritsen, M. (1982).- "Lipooxygenases, Properties and Modes of Action" en "Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids", pp. 265-274.- J.F.G.M. Wintermans, P.J.C. Kniper (Eds.).- Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Wardale, D.A. y Galliard, T. (1977).- "Further studies on the subcellular localization of lipid degrading enzymes".- *Phytochemistry* **16**, 333-338.
- Yokoyama, C.; Mizuno, K.; Mitachi, H.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S. y Pace-Asciak, C.R. (1983).- "Partial purification and characterization of arachidonate 12-lipooxygenase from rat lung".- *Biochim. Biophys. Acta* **750**, 237-243.
- Zakut, R.; Grossman, S.; Pinsky, A. y Vilchek, M. (1976).- "Evidence for an essential methionine residue in lipooxygenase".- *FEBS Lett.* **71**, 107-110.

(Recibido: Noviembre 1991)