

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA VEGETAL Y BIOLOGIA MOLECULAR

PURIFICACION Y CARACTERIZACION
DE ISOENZIMAS DE LIPOXIGENASA EN GARBANZO
(*Cicer arietinum*) VAR. PEDROXILLANO

T
/
501

Memoria del trabajo realizado para optar al grado de Doctor en Ciencias
Químicas por el Licenciado

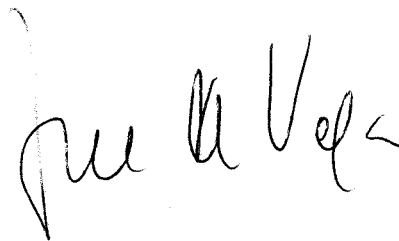


Luis Carlos Sanz Martínez



Director

Dr. José Manuel Olías Jiménez
Investigador Científico del Consejo
Superior de Investigaciones Científicas



Tutor

Dr. José María Vega Piqueres
Catedrático de Bioquímica y
Biología Molecular

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 217 número 80 del libro
correspondiente a 22 JUN 1981
Sevilla,

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alvarado

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Fisiología y Tecnología Post-recolección del Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C.) de Sevilla, bajo la dirección del Dr. José Manuel Olías Jiménez, correspondiendo la tutoría universitaria al Dr. José María Vega Piqueres, a los cuales deseo expresar mi máximo agradecimiento por sus constantes ayudas y orientaciones.

Este agradecimiento quisiera hacerlo también extensivo:

Al Instituto de la Grasa y sus Derivados por poner a mi disposición el material e instrumental necesario para la realización de este trabajo, así como todo su personal, cuya colaboración me fue brindada en todo momento.

A José Luis Ríos Martín por la realización de los análisis de espectrometría de masas y su ayuda en la interpretación de éstos.

Muy especialmente a la PRIMERA PLANTA del Instituto de la Grasa y sus Derivados por haber compartido conmigo tantos momentos gratos, y en general por su simpatía.

A la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía por la concesión de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en

de la

de esta Universidad desde el día

hasta el día

Sevilla de

de 19

EL DIRECTOR DE

INDICE

ABREVIATURAS	1
OBJETIVOS	3
INTRODUCCION	5
I. LA REACCION ENZIMATICA Y MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPOXIGENASA .	8
II. DISTRIBUCION DE LA LIPOXIGENASA	11
II.1. Reino vegetal	11
II.1.1. Localización a nivel de órganos de la planta ..	11
II.1.2. Localización subcelular	12
II.2. Reino animal	13
III. PROPIEDADES DEL ENZIMA LIPOXIGENASA	14
IV. PROPIEDADES DE LA REACCION ENZIMATICA	16
IV.1. Mecanismo	16
IV.2. Reacciones de cooxidación	22
IV.3. Otras propiedades catalíticas	23
IV.4. Inhibidores	24
V. RUTA DE LA LIPOXIGENASA	27
VI. POSIBLE PAPEL FISIOLÓGICO DE LA LIPOXIGENASA	32
MATERIALES Y METODOS	37
I. MATERIAL BIOLÓGICO	38
II. METODOS Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS	39
II.1. Actividad lipoxigenasa	39
II.1.1. Sustrato	39
II.1.2. Medida de la actividad enzimática	39

II.2. Determinación de proteínas	40
II.3. Aislamiento y purificación	40
II.3.1. Preparación del extracto crudo	40
II.3.2. Fraccionamiento con sulfato amónico	41
II.3.3. Cromatografía de exclusión molecular	41
II.3.4. Cromatografía de intercambio aniónico	42
II.3.5. Cromatografía hidrofóbica	42
II.4. Cromatografía líquida rápida de proteínas	43
II.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida	43
II.6. Isoelectroenfoque	45
II.7. Espectrofotometría UV-Vis	46
II.8. Análisis de aminoácidos	46
II.9. Determinación de hierro	48
II.10. Cooxidación de pigmentos	48
II.11. Análisis de los productos de reacción	49
II.11.1. Obtención de los metabolitos	49
II.11.2. Metabolitos marcados radioactivamente	49
II.11.3. Cromatografía líquida de alta resolución	50
II.11.4. Cromatografía de gases-espectrometría de masas	52
II.11.5. Espectrofotometría IR	52
III. REACTIVOS Y APARATOS	53
III.1. Reactivos	53
III.2. Aparatos	54
RESULTADOS	57
I. PURIFICACION DE PROTEINAS CON ACTIVIDAD LIPOXIGENASA	58
I.1. Determinación de la actividad enzimática	58
I.2. Determinación de proteínas	58
I.3. Aislamiento y purificación	58
I.3.1. Otención del extracto crudo	58
I.3.2. Fraccionamiento con sulfato amónico	61

I.3.3. Cromatografía de exclusión molecular	61
I.3.4. Cromatografía de intercambio aniónico	64
I.3.5. Cromatografía hidrofóbica	64
I.4. Criterios de pureza	66
I.4.1. Cromatografía líquida rápida de proteínas	66
I.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	70
II. PROPIEDADES CATALITICAS	71
II.1. Efecto del pH sobre la actividad lipoxigenasa	71
II.2. Especificidad por sustrato	71
II.3. Cinética de reacción	73
II.4. Determinación de parámetros cinéticos	76
II.5. Estabilidad de la actividad lipoxigenasa	76
II.5.1. Efecto de la temperatura	76
II.5.2. Almacenamiento	79
II.6. Inhibición de la actividad lipoxigenasa	80
II.6.1. Efecto de los metales	80
II.6.2. Efecto del ácido 13-hidroperoxioctadecadienoico	81
III. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS	83
III.1. Espectro de absorción UV-Vis	83
III.2. Estudio del tamaño molecular	84
III.2.1. Filtración en gel	84
III.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	84
III.3. Determinación del punto isoeléctrico	90
IV. PROPIEDADES ESTRUCTURALES	91
IV.1. Composición en aminoácidos	91
IV.2. Determinación de hierro	91
IV.3. Estado de oxidación del átomo de hierro	93
IV.4. Estudio de grupos esenciales para la actividad lipoxigenasa	95
IV.4.1. Puentes disulfuro	95
IV.4.2. Grupos sulfhidrilo	98

IV.4.3. Grupos amino	101
IV.4.4. Grupos carboxilo	101
V. COOXIDACION DE PIGMENTOS	104
V.1. Cooxidación de β -caroteno	104
V.2. Cooxidación de acetato de retinol	108
VI. REGIOESPECIFICIDAD Y ESTEREOESPECIFICIDAD	111
VI.1. Productos de la reacción enzimática	111
VI.1.1. Incubación con ácido linoleico	111
VI.1.2. Incubación con ácidos linoleico y 13-hidroperoxioctadecadienoico	115
VI.2. Análisis estructural de los metabolitos	119
VI.2.1. Obtención de los estereoisómeros	119
VI.2.2. Cromatografía de gases-espectrometría de masas	119
VI.2.3. Espectrofotometría IR	129
DISCUSION	134
CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFIA	165

ABREVIATURAS

ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AEDT	ácido etilendiaminotetraacético
BHA	3- <i>t</i> -butil-4-hidroxianisol
BHT	2,6-di- <i>t</i> -butil-4-hidroxitolueno
BSTFA	bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DTT	ditiotreitól
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
GEE	glicina etil éster
<i>p</i> -HMB	<i>p</i> -hidroximercuribenzoato sódico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IAA	iodoacetamida
LA	ácido linoleico
9-LAO	9-oxo-10,12-octadecadienoato de metilo
13-LAO	13-oxo-9,11-octadecadienoato de metilo
9-LAOH	9-hidroxi-10,12-octadecadienoato de metilo
13-LAOH	13-hidroxi-9,11-octadecadienoato de metilo
9-LAOOH	9-hidroperoxi-10,12-octadecadienoato de metilo
13-LAOOH	13-hidroperoxi-9,11-octadecadienoato de metilo
LOX	lipoxigenasa
LOX-1	isoenzima 1 de lipoxigenasa de garbanzo
LOX-2	isoenzima 2 de lipoxigenasa de garbanzo
MMS	metilmetanotiosulfonato
NADPH	β -nicotinamida adenín dinucleótido
NDGA	ácido nordihidroguayarético
NEM	N-etilmaleimida
NTSA	N-nitroso-N-metil-4-toluensulfonamida
PVP	polivinil polipirrolidona
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TLC	Cromatografía en capa fina
TNBS	ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico
Tris	tris-(hidroximetil)aminometano

OBJETIVOS

Hoy día se puede afirmar que las células encierran sistemas enzimáticos que catalizan la degradación controlada de los lípidos a través de la secuencia: lipasa, lipoxigenasa y enzimas modificadores de hidroperóxidos. En tejidos animales, la acción de esta ruta enzimática sobre el ácido araquidónico (cascada del ácido araquidónico) da lugar a prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos y tromboxanos, metabolitos con potentes actividades fisiológicas. Las plantas poseen una cascada similar para los ácidos linoleico y linolénico, cuya función fisiológica es comparativamente casi desconocida. No obstante, existen evidencias que permiten relacionarla con tres grandes áreas de la fisiología vegetal: crecimiento y desarrollo, senescencia y respuesta a daños físicos o resistencia a enfermedades. Este desconocimiento es en parte debido a la falta de información sobre el mecanismo de acción del enzima "llave" en este sistema, la lipoxigenasa, y a la incompleta caracterización de los productos de reacción. Esto último es de gran importancia, puesto que dependiendo del metabolito producido, la ruta degradativa o modificadora dará lugar a productos que posiblemente posean funciones fisiológicas diferentes.

Ante estos hechos, nos planteamos un estudio de caracterización de isoenzimas de lipoxigenasa de origen vegetal. Las leguminosas son fuentes abundantes de lipoxigenasa, y han sido utilizadas tradicionalmente para trabajos similares. Después de una búsqueda previa de semillas controladas disponibles, se decidió realizar el estudio con semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*), variedad Pedroxillano.

El propósito primordial de este trabajo es la obtención de datos experimentales que, sumados a los ya existentes en la extensa bibliografía, contribuyan a una elucidación futura del mecanismo de acción de la lipoxigenasa y caracterización definitiva de sus productos de reacción. Para ello, como primer objetivo se persigue la purificación de las proteínas con actividad lipoxigenasa presentes en garbanzo. Una vez purificadas estas proteínas y en una segunda fase, se procederá a su caracterización físico-química, estructural y cinética, así como el análisis de los productos de reacción.

INTRODUCCION

En el reino vegetal operan fundamentalmente cuatro sistemas enzimáticos para la modificación oxidativa de los ácidos grasos: α -oxidación, β -oxidación, ω -oxidación y ruta de la lipoxigenasa. De forma genérica se puede decir que los tres primeros carecen de especificidad de sustrato. Por el contrario, el sistema lipoxigenasa es exclusivo para ácidos poliinsaturados.

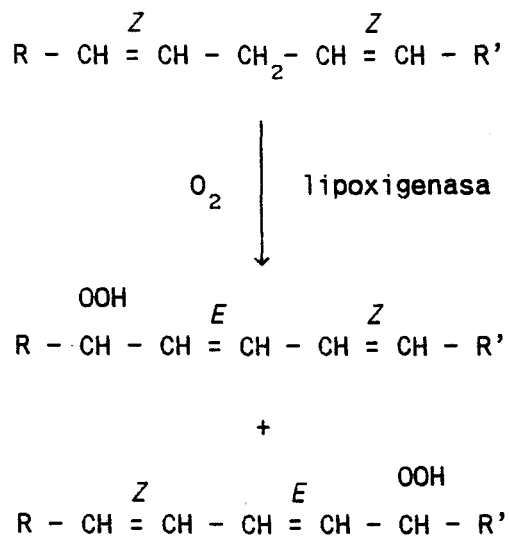
El interés inicial por el estudio de este enzima estuvo marcado por sus implicaciones tecnológicas. André y Hou (1932) pusieron de manifiesto en soja la existencia de un "factor" sensible a la temperatura que causaba olores no deseables; en 1934, Haas y Bohn presentaron una patente para el blanqueamiento 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 lipoxigenasa (Sumner y Sumner, 1940; Tauber, 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 poliinsaturados (Bérgstrom, 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 lipoxigenasa 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 soja (Shibata *et al.* 1987, 1988), y actualmente se espera la conclusión de la estructura espacial que quizás podrá dar una explicación satisfactoria de los mecanismos de acción.

Frente al relativamente amplio conocimiento que se tiene sobre el mecanismo de reacción enzimático de la lipoxigenasa y la caracterización de sus productos, destaca 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: no

existe una única función fisiológica para lipoxigenasa en el reino vegetal. Probablemente, la lipoxigenasa 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 lipoxigenasa en plantas podría ser similar a las rutas de la lipoxigenasa 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.

I. LA REACCION ENZIMATICA Y MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPOXIGENASA

La lipoxigenasa (linoleato:oxígeno oxidorreductasa, 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 et al, 1980):



Los sustratos específicos para lipoxigenasa (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 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 (Holman, 1946). Los hidroperóxidos procedentes de la oxidación enzimática presentan un cromóforo característico que absorbe a 234 nm con un coeficiente de extinción molar de ≈ 25000 . 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, más importante, 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 $1-^{14}\text{C}$ ó ^3H , 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 dispersión 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 evitar 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 éste.

II. DISTRIBUCION DE LA LIPOXIGENASA

II.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 α -tocoferol (Grossman y Waksman, 1984) complicarían la detección de actividad LOX en extractos vegetales.

II.1.1. 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, hipocotilos, 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. Así por ejemplo, Vernooy-Gerritsen *et al.* (1983) desarrollaron un técnica de teñido

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.

II.1.2. Localización subcelular

Se han realizado multitud de intentos con el fin de establecer la localización subcelular 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 inhibitor 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) encontraron en alfalfa que LOX estaba asociada tanto a cloroplastos como a mitocondrias y citoplasma. Vernooij-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

la distribución en los distintos tejidos de la planta antes comentada.

II.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 (Tappel, 1963; Boyd y Adams, 1955). 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).

III. 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 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, basado en la secuencia de aminoácidos, L-1 se compone de 838 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 94038 daltons. Los valores correspondientes para L-2 son 865 residuos y un peso molecular de 97035, y para L-3 son 859 y 96541.

Parece existir una buena concordancia entre un gran número de autores sobre el papel esencial que la cisteína juega en la actividad LOX. El trabajo más intensivo 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 cooxidadora

de pigmentos.

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 es esencial para la actividad enzimática, como lo demuestran los tratamientos con compuestos alquilmercúricos que dan lugar a interferencias de tipo estérico o eléctrico con los residuos de aminoácidos vecinos.

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 hidroperóxido al igual que en plantas. El peso molecular oscila entre 68000 y 100000 daltons. Todavía no se ha conseguido la secuenciación completa de aminoácidos de ninguna LOX de animales, 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 encontrado 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).

IV. PROPIEDADES DE LA REACCION ENZIMATICA

IV.1. Mecanismo

El hierro desempeña un papel esencial dentro de la acción catalítica de LOX. Cada molécula de LOX 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 de LOX es el periodo inicial de inducción que es sólo evitado cuando se añade hidropéroxido al medio de reacción. Para explicar ésto mecanísticamente, Vliegthart *et al.* (1982) considera la existencia de dos poblaciones del enzima, una que contiene Fe(II) alto spin y otra Fe(III) alto spin. Estudios de EPR (Slappendel *et al.*, 1981) muestran que L-1 de soja está predominantemente en la forma Fe(II), conteniendo aproximadamente un 1% de Fe(III).

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 también un periodo 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- ó 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-hidroperóxidos, se debe aparentemente a la doble posibilidad de posición que puede adoptar el ácido graso en el sitio activo del enzima (Fig. 1), es decir orientación de cabeza a cola o viceversa (Kühn, 1986; Funk, 1987). Como puede verse en la Figura 1, el ataque del oxígeno es idéntico para la formación del 13S- y 9S-hidroperóxidos, 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.

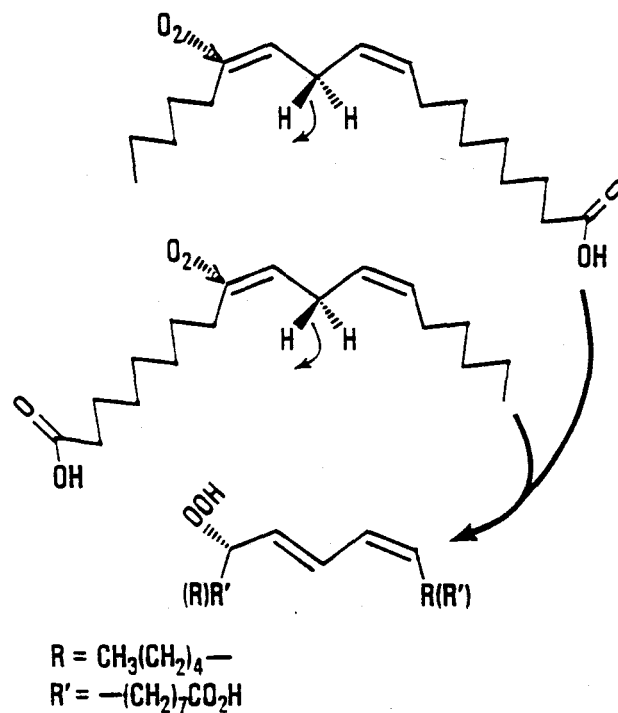


Figura 1.- Oxidación del ácido linoleico a 9S- ó 13S-hidroperóxido dependiendo de su orientación cabeza cola o viceversa (Gardner, 1989).

En 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.

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 (Fig. 2). De esta forma se explica la existencia de un periodo de inducción y de una actividad hidroxidasa. 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 hidroxidasa o simplemente ciclo anaerobio del enzima (Petersson *et al.*, 1987; Ludwig *et al.*, 1987). En éste, el radical pentadienilo no completa el ciclo reaccionando con oxígeno, si no 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 determinar la proporción de actividades dioxigenasa/hidroxidasa 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 son debidas, por tanto, a la competición existente entre las actividades dioxigenasa e hidroperóxidasa, ya que estos autores emplean diferentes concentraciones de oxígeno en la reacción enzimática.

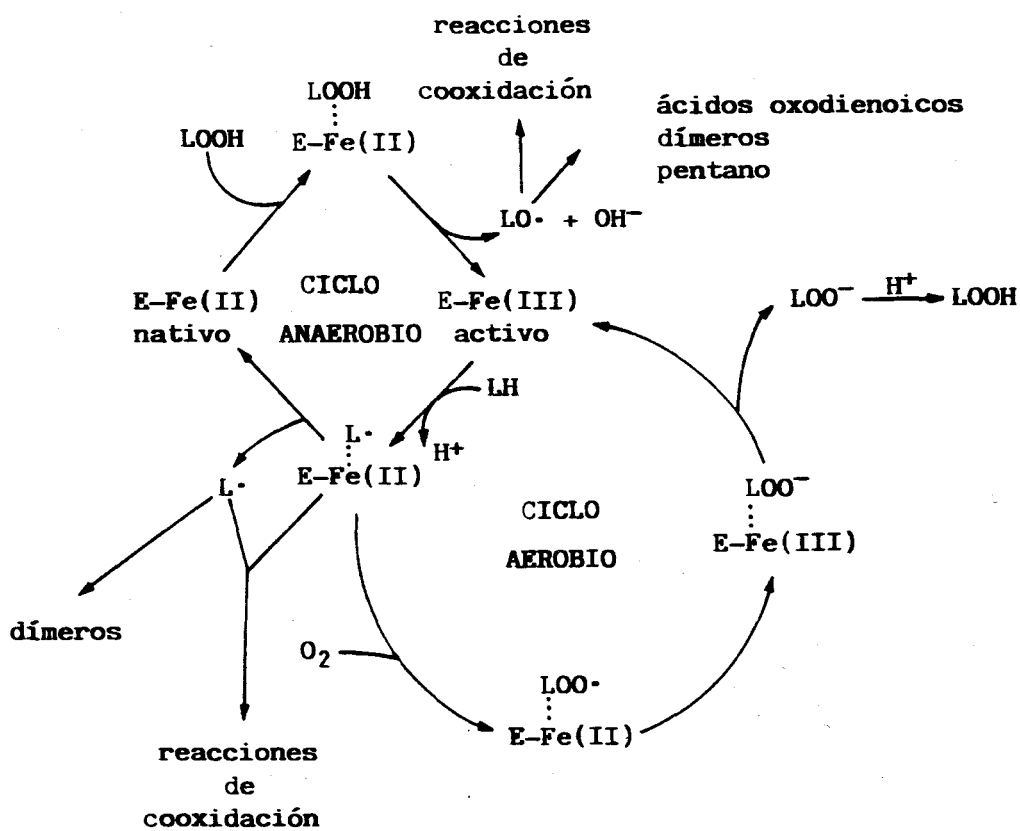


Figura 2.- Mecanismo enzimático de lipoxigenasa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Ludwig et al., 1987).

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 (cetodienos) en condiciones aeróbicas. Este esquema es también consistente con la observación de que LOX tipo II 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 tiene en la literatura y de sus propias experiencias propone un modelo de sitio activo que queda recogido en la Figura 3. 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). 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. A esto se une la significativa libertad de movimiento que tienen los dobles enlaces, por lo que también se hipotetiza con 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

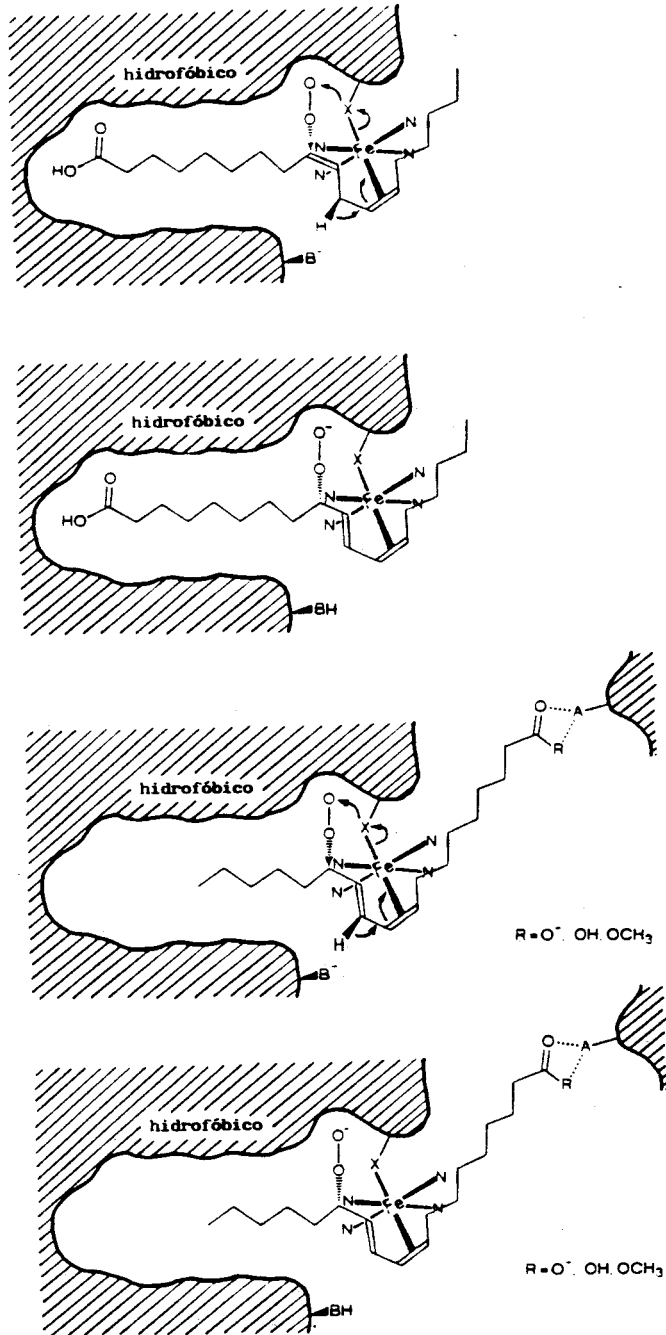


Figura 3.- Modelo de sitio activo que muestra la similitud espacial de la abstracción de H y oxidación de moléculas de sustrato orientadas de forma opuesta. A. Ataque inicial del O_2 y transferencia electrónica desde la olefina vía el átomo de Fe activo a un aminoácido actuando como aceptor electrónico. B. reacción completa (Gardner, 1989).

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-Agrò *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.

IV.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 cooxidador, pero en condiciones anaeróbicas es un fuerte agente cooxidante en presencia de ácido graso e hidropéroxido (Axelrod, 1974; Klein *et al.*, 1984). Los resultados obtenidos por Klein *et al.* (1984) parecen sugerir que el complejo $E-Fe(II)\cdots L\cdot$ del ciclo anaerobio (Fig. 2) es el verdadero agente oxidador de pigmentos y no los radicales alquilo, alcoxi o peroxilo.

En cualquier caso, siempre 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 provoca un aumento de la disociación de los radicales del complejo enzimático antes que éste reaccione con el oxígeno.

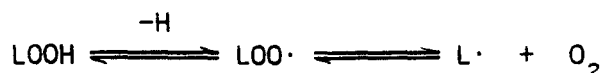
Es muy probable que existan diferentes mecanismos de cooxidación dependiendo de la naturaleza del pigmento. Hildebrand y Hymowitz (1982) sugieren que los mecanismos de blanqueamiento de clorofilas y carotenos son diferentes. Mediante el uso de antioxidantes como el BHT, se ha podido comprobar que hay 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).

IV.3. Otras propiedades catalíticas

LOX muestra otras propiedades enzimáticas como son el intercambio de oxígeno y la doble oxigenación.

Mediante el uso de ^{18}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).

IV.4. Inhibidores

Los inhibidores de LOX son unas herramientas muy valiosas para el estudio del papel de LOX y sus productos en sistemas biológicos, aunque es muy difícil encontrar inhibidores totalmente específicos. Así, NDGA y 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 tenemos:

-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.

-Pirazolinas.- El mecanismo de acción de las pirazolinas 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 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 temperatura 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).

V. RUTA DE LA LIPOXIGENASA

Los productos resultantes de la reacción enzimática de LOX, los hidroperóxidos, forman fácilmente radicales que son altamente reactivos. Estos radicales dañan la estructura de la membrana, reaccionando asimismo con proteínas, aminoácidos (Gardner, 1979) e incluso ADN por reacción con guanina (Inouye, 1984). Pero el destino probable de los hidroperóxidos es la conversión en otros metabolitos por alguna de las rutas enzimáticas recogidas en la Figura 4 y que se describen a continuación.

Hidroperóxido liasa.

Muchas especies vegetales presentan enzimas con actividad hidroperóxido liasa, la cual es capaz de romper los hidroperóxidos de ácidos grasos en dos fragmentos (Vick y Zimmerman, 1976; Galliard y Phillips, 1976; Olías *et al.*, 1990). Si el sustrato es un 13-hidroperóxido, los productos formados son ácido 12-oxo-Z-9-dodecenoico y hexanal o Z-3-hexenal, dependiendo de si el hidroperóxido deriva del ácido linoleico o linolénico respectivamente. Para los 9-hidroperóxidos, los productos resultantes de la acción de la hidroperóxido liasa son el ácido 9-oxo-nonanoico y Z-3-nonenal, si deriva del ácido linoleico, o Z-3,Z-6-nonadienal, si deriva del ácido linolénico. La mayor parte de las plantas tienen isomerasas que rápidamente convierten los Z-3-enaes en E-2-enaes. Ambos isómeros poseen distintos aromas y contribuyen normalmente al olor de las plantas. Además, en algunas plantas estos aldehidos son convertidos activamente por una alcohol deshidrogenasa en los correspondientes alcoholes, también con olores característicos. Las setas poseen una hidroperóxido liasa anormal, ya que utiliza como sustrato el 10-hidroperóxido del ácido linoleico para producir ácido 10-oxo-E-8-decenoico y 1-octen-3-ol, que es el responsable del característico olor de las setas.

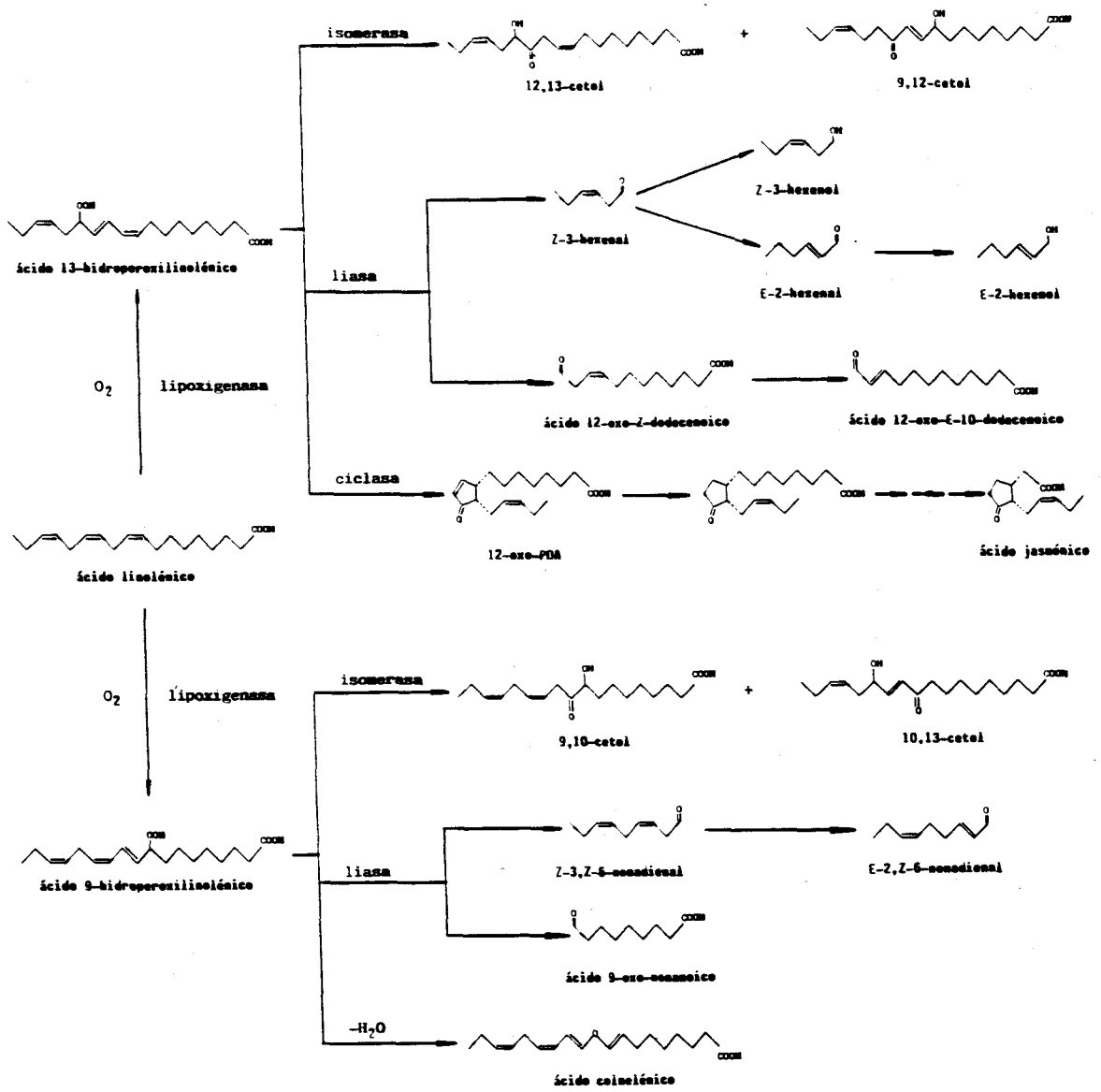


Figura 4.- Ruta de la lipoxigenasa del ácido linolénico o cascada del ácido linolénico.

Hidroperóxido isomerasa

La hidroperóxido isomerasa fue el primer enzima descubierto que utiliza como sustrato el hidroperóxido proveniente de la reacción de LOX. Los productos que se obtienen son conocidos genéricamente como α y γ -cetoles (Zimmerman, 1966; Gardner, 1970), y son los derivados 13-hidroxi-12-oxo y 9-hidroxi-12-oxo cuando provienen del 13-hidroperóxido del ácido linoleico o linolénico, mientras que si provienen del 9-hidroperóxido, se obtienen los derivados 9-hidroxi-10-oxo y 13-hidroxi-10-oxo, según el mecanismo que se expone en la Figura 5.

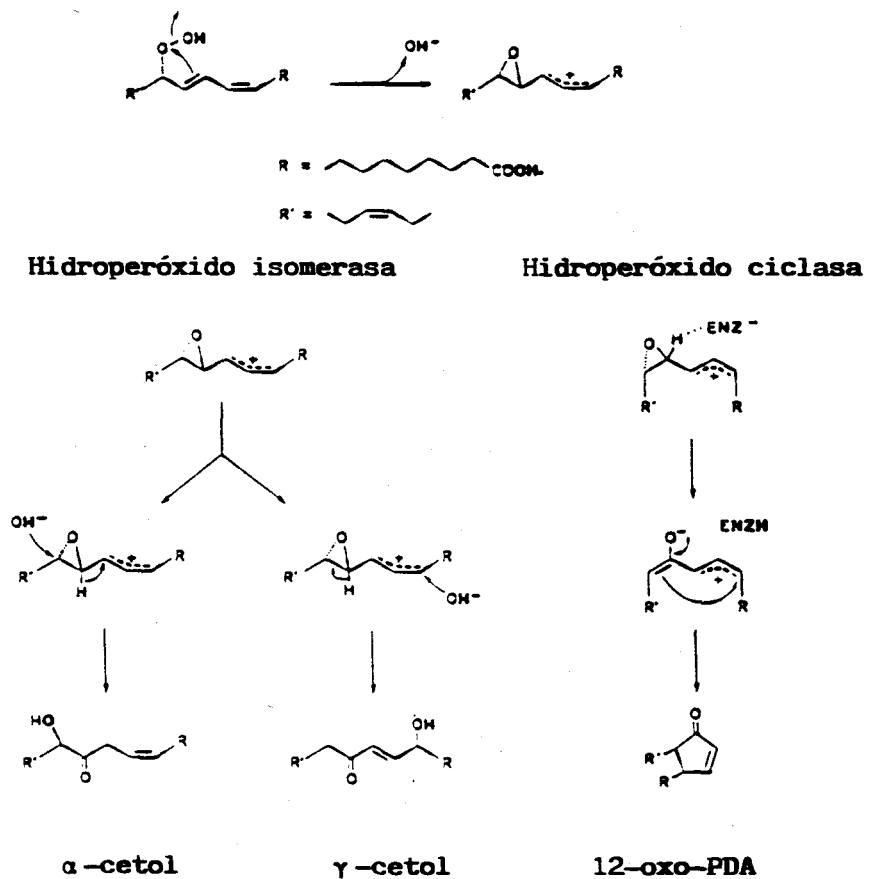


Figura 5.- Mecanismo propuesto para la acción de la hidroperóxido isomerasa e hidroperóxido ciclasa.

Hidroperóxido ciclasa

Los únicos sustratos posibles para hidroperóxido ciclasa son los hidroperóxidos con insaturación en ω -3. En plantas, el ácido 13-hidroperoxilinolénico es probablemente el único sustrato posible para este enzima. El producto que se obtiene es conocido como ácido 12-oxo-fitodienoico (12-oxo-PDA), y está constituido por un anillo ciclopentenona con dos cadenas laterales que tienen una configuración Z respecto al plano del anillo ciclopentenona (Zimmerman y Feng, 1978). Según los datos obtenidos, es bastante probable que las actividades hidroperóxido isomerasa e hidroperóxido ciclasa estén asociados a la misma proteína, no habiendo sido separadas hasta la fecha (Fig. 5).

El 12-oxo-PDA es un compuesto intermediario en la ruta enzimática que lleva a la biosíntesis del ácido jasmónico (Vick y Zimmerman, 1983). En primer lugar, el doble enlace del anillo ciclopentenona es reducido por NADPH en presencia de 12-oxo-PDA reductasa (Vick y Zimmerman, 1986), finalizando con tres pasos de β -oxidación en la cadena lateral carboxílica (Fig. 6).

Formación de derivados diviniléter

Sólo los hidroperóxidos en posición 9 del ácido linoleico y linolénico pueden ser sustratos para esta reacción. Esta consiste básicamente en la inserción de un oxígeno del grupo hidroperóxido en la cadena hidrocarbonada para formar un derivado con estructura de diviniléter. Los productos obtenidos a partir de los 9-hidroperóxidos de los ácidos linoleico y linolénico se denominan respectivamente ácidos colneleico y colnelénico (Galliard y Chan, 1980). Hasta ahora, la patata es el único material biológico conocido que tiene la capacidad de producir estos derivados.

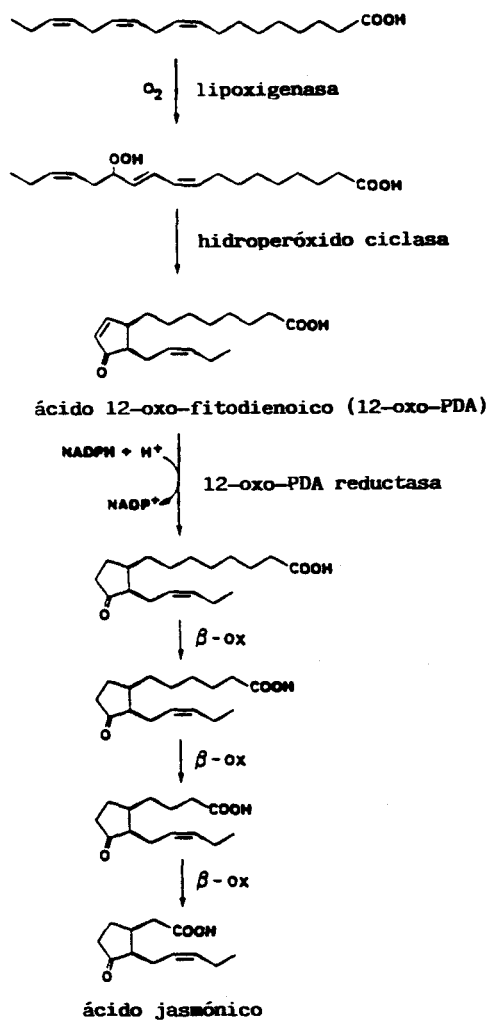


Figura 6.- Ruta biosintética del ácido jasmónico (Vick y Zimmerman, 1986).

VI. POSIBLE PAPEL FISIOLÓGICO DE LA LIPOXIGENASA

A pesar de la gran cantidad de información que existe concerniente al estudio de LOX, pocas conclusiones se pueden extraer sobre su posible papel fisiológico en plantas. Por el contrario, los productos de oxidación del ácido araquidónico mediante la ruta de LOX en animales, conocidos como eicosanoides y que incluye a prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos, tienen un demostrado papel fisiológico de gran importancia como reguladores del metabolismo en mamíferos. La causa principal de este hecho radica en la ausencia de bioensayos suficientemente satisfactorios que aporten datos concluyentes de la función fisiológica de los octadecanoides (productos de la cascada de los ácidos linoleico y linolénico en plantas).

Existen tres áreas de la fisiología vegetal donde LOX parece estar implicada: crecimiento y desarrollo, senescencia, y respuesta a daño del tejido vegetal o resistencia a plagas. En cualquiera de estas tres grandes áreas es posible encuadrar el posible papel fisiológico de cada uno de los metabolitos de la ruta de la LOX. La discusión que se puede plantear al respecto está basada desafortunadamente más en la especulación que en la evidencia experimental.

Hidroperóxidos

Biosíntesis de etileno, senescencia y regulación enzimática, son tres aspectos de la fisiología vegetal en los que se especula pueden estar involucrados los hidroperóxidos de los ácidos grasos.

La biosíntesis de etileno se puede clasificar en dos categorías, de una parte estaría la biosíntesis normal o biológica, que se da en ciertas etapas del desarrollo de la planta, y de otra la biosíntesis de etileno en respuesta a un estrés físico, químico o biológico de la planta. La ruta biosintética de etileno partiendo de S-adenosilmetionina es bastante bien conocida excepto en lo que se refiere al paso final que convierte el ACC

en etileno. Existe un acuerdo casi unánime sobre la necesidad de oxígeno y la participación de radicales libres en esta conversión, y debido a esto se ha sugerido la participación de LOX en este proceso. Algunos autores han demostrado que LOX está involucrada en la producción *in vitro* de etileno bien de forma directa o indirecta (Lynch y Thompson, 1984; Kacperska y Kubacka, 1985), pero otras experiencias indican que las propiedades de los sistemas *in vitro* no se corresponden con las propiedades de los sistemas *in vivo* (Lynch *et al.*, 1985). Las conclusiones que se extraen, de las experiencias llevadas a cabo hasta ahora, sugieren la no participación de LOX en la biosíntesis de etileno *in vivo* por la ruta normal, no excluyéndose el que estuviera involucrada en la producción de etileno de estrés.

La senescencia vegetal es otro área de investigación donde LOX ha sido implicada. Pauls y Thompson (1984) describen el proceso senescente como el resultado de un incremento en la concentración de productos procedentes de la peroxidación lipídica en membranas celulares, lo cual les hace adquirir una mayor rigidez, haciéndose más permeables y llegando incluso a la desintegración. En hojas de guisante, la actividad LOX se ve incrementada durante el proceso de senescencia, y ésta puede ser retardada por tratamiento de las hojas con inhibidores de LOX (Leshem *et al.*, 1979). Sin embargo, se han observado evidencias que no son consistentes con un papel de LOX en la senescencia. Por ejemplo, se ha demostrado un descenso de la actividad LOX en trigo y centeno senescentes (Kar y Feirabend, 1984). En realidad, se observa una alta actividad LOX en tejidos que están creciendo rápidamente como las semillas en germinación. En este caso, los hidroperóxidos formados podrían degradar las membranas de los células de almacén de los cotiledones para facilitar la provisión de nutrientes al nuevo tejido que se está desarrollando, o bien puede ser metabolizado por otras enzimas como hidroperóxido liasa, isomerasa o ciclasa que tienen también una alta actividad en la germinación.

Los hidroperóxidos son productos altamente reactivos con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, debido a esto, también se sugiere un papel regulador de la actividad enzimática para LOX. Douillard (1981) propone a

los hidroperóxidos como posibles reguladores de la actividad de algunos enzimas del ciclo de Calvin en el cloroplasto.

Aldehidos y ω -oxoácidos

Los aldehidos y ω -oxoácidos son los productos resultantes de la lisis de los hidroperóxidos por acción del enzima hidroperóxido liasa. El ácido 12-oxo-*E*-10-dodecenoico provoca el efecto de la herida vegetal, ya que estimula la formación del callo, por lo que se le propone como el componente activo de la hormona de cicatrización, también llamada traumatina (Zimmerman y Coudron, 1979). El ácido traumático (ácido *E*-2-dodecenoico) fue propuesto originalmente como el componente activo de la traumatina, pero posteriormente se comprobó que no era más que un producto de oxidación del oxoácido durante su purificación. Por otra parte, no se ha encontrado todavía una actividad fisiológica donde estuvieran implicados los ácidos 9-oxo-nonanoicos que resultan de la lisis enzimática de los 9-hidroperóxidos de los ácidos linoleico y linolénico.

El papel fisiológico de los aldehidos también es bastante enigmático. Sin embargo, se sabe que los aldehidos α,β -insaturados presentan una alta toxicidad debido a la gran reactividad de la función enal con grupos sulfhidrilo, amino e hidroxilo a través de reacciones de adición o formación de bases de Schiff (Schauenstein *et al.*, 1977). Es por ello, por lo que se ha sugerido que los aldehidos podrían participar en un mecanismo de defensa de la planta, confirmándose por las propiedades antifúngicas y bactericidas demostradas por *E*-2-hexenal (Mayor *et al.*, 1960; Schildknecht y Rauch, 1961).

Otro posible papel de estos productos sería la regulación de rutas metabólicas vía la inhibición de enzimas que contengan grupos sulfhidrilos esenciales para la catálisis enzimática.

Cetoles

Los α y γ -cetoles parecen ser productos finales de su ruta biosintética según las evidencias experimentales que se tiene hasta ahora, ya que no se ha encontrado ruta metabólica que los transforme en otros productos. Se ha comprobado que sus concentraciones no cambian tan dramáticamente como lo hace la actividad de los enzimas que los sintetizan, lipoxigenasa e hidroperóxido isomerasa. Esto podría ser debido a una compartimentación que separa enzimas y sustratos, compartimentación que es perdida en la maceración de tejidos, lo que provoca un incremento de la concentración de α -cetol como han demostrado Vick y Zimmerman (1982). Los cetoles podrían estar involucrados en un mecanismo de protección de la planta contra un exceso tóxico de hidroperóxidos, los cuales sería convertidos en los teóricamente inócuos cetoles.

Schavenstein *et al.* (1977), por el contrario, proponen a los cetoles como reguladores de la actividad enzimática dada su reactividad con grupos sulfhidrilo, demostrada posteriormente en reacciones con glutatona que podrían estar catalizadas enzimáticamente.

12-oxo-PDA y ácido jasmónico

La estructura ciclopentanona del 12-oxo-PDA es similar a la que tiene la prostaglandina A_1 de animales. Se especula con un papel regulador del 12-oxo-PDA en el metabolismo vegetal de igual forma que las prostaglandinas tienen una poderosa actividad en animales. Aunque 12-oxo-PDA pueda tener una actividad fisiológica por sí mismo, es más probable que su papel real en el metabolismo vegetal sea el de servir como precursor para la síntesis del ácido jasmónico. El ácido jasmónico y su éster metílico han sido detectados en gran número de especies vegetales, experimentándose un gran interés investigador en los últimos años debido a que se ha comprobado que ambos compuestos provocan inhibición del crecimiento y senescencia vegetal (Ueda y Kato, 1980, 1981, 1982; Satler y

Thimann, 1981; Dathe *et al.*, 1981; Yamane *et al.*, 1982; Tsurumi y Asahi, 1985).

La biosíntesis del ácido jasmónico puede ser probablemente el mejor ejemplo que se pueda obtener de la función metabólica de LOX vegetal. Algunos autores sugieren que el ácido jasmónico es una hormona vegetal que no se había descrito con anterioridad. La mayor parte de la bibliografía concerniente al ácido jasmónico lo involucran en la inhibición del crecimiento y aparición del síndrome de senescencia, pero también es normal encontrarlo en tejidos vegetales que están creciendo activamente (Meyer *et al.*, 1984). Por lo tanto, el ácido jasmónico ha de tener alguna función fisiológica en otras fases del desarrollo que aún no han sido descubiertas.

Los últimos trabajos sugieren que el ácido jasmónico puede actuar interfiriendo con la manera en que otros conocidos reguladores del crecimiento vegetal estimulan la actividad celular, mediante la síntesis de glicopéptidos específicos (Anderson, 1988).

Pigmentos oxidados

Aunque las evidencias apuntan a que el ácido abscísico es sintetizado por la ruta biosintética isoprenoide a partir del ácido mevalónico, es posible que una ruta alternativa sea operativa en el reino vegetal e involucre a LOX. En una reacción de cooxidación con ácido linoleico y catalizada por LOX, la violaxantina es lisada para dar xantoxina (Firm y Friend, 1972), la cual es un precursor del ácido abscísico como se ha demostrado en algunas especies vegetales (Taylor y Burden, 1973).

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIAL BIOLÓGICO

Como material biológico se utilizó semillas de garbanzo (*Cicer Arietinum* var. Pedroxillano) suministrada por la empresa KOIPESOL, S.A. (Andújar, Córdoba). A partir de estas semillas, se obtuvo su harina por trituración y posterior tamización a través de una malla de 0.4 mm.

II. METODOS Y DETERMINACIONES ANALITICAS

II.1. Actividad lipoxigenasa

La medida de la actividad LOX se llevó a cabo espectrofotométricamente según el método de Axelrod *et al.* (1981), mediante el seguimiento del incremento de absorbancia a 234 nm debido al dieno conjugado que se forma por hidroperoxidación enzimática. El coeficiente de extinción molar para este compuesto es de $25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Verhagen *et al.*, 1977).

Por otra parte también se realizó la medida de una actividad enzimática secundaria siguiendo el incremento de absorbancia a 280 nm, cromóforo correspondiente a un cetodieno conjugado (Vioque y Holman, 1962) con un coeficiente de extinción molar de $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Verhagen *et al.*, 1977).

II.1.1. Sustrato

Se prepararon disoluciones de ácido linoleico (o cualquier otro ácido poliinsaturado utilizado como sustrato) en concentración de 10mM. Para ello, se siguió el siguiente procedimiento: 70 mg de ácido poliinsaturado son emulsionados en 2.5 ml de agua desionizada y desoxigenada con la ayuda de 90 μl de Tween-20. Después de formar las sales sódicas, por adición de 140 μl de NaOH 2N, se lleva hasta un volumen de 25 ml con agua desionizada y desoxigenada. A partir de esta disolución se obtuvieron alícuotas de 2.5 ml que se almacenan a -25°C hasta el momento de su utilización.

II.1.2. Medida de la actividad enzimática

La mezcla de reacción habitual contenía 3 ml de tampón fosfato sódico 50mM, pH 6.0 ó 5.5 dependiendo del isoenzima, 50 μl de la disolución de

sustrato 10mM y la cantidad de enzima suficiente (1-5 μ l) para que el incremento de absorbancia a 234 nm en los 30 primeros segundos de reacción no fuera superior a 0.15 unidades.

Una unidad de actividad LOX se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μ mol de hidroperóxido en un minuto. Por otra parte, se define la unidad de la actividad formadora de cetodieno (FCD) como la cantidad de enzima necesaria para la formación de un μ mol de cetodieno en un minuto.

II.2. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Este método consiste en la adición de 3 ml de reactivo de Bradford a 0.1 ml de muestra. Tras dejar desarrollar el color durante 10 min a temperatura ambiente, se mide el incremento de absorbancia a 595 nm. El reactivo de Bradford se prepara disolviendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 ml de etanol 50% (v/v), añadiendo 100 ml de H_3PO_4 85% (p/v) para completar con agua desionizada hasta 1 l. El reactivo se filtra antes de su utilización.

Las rectas de calibrado fueron realizadas con albúmina suero bovino como proteína patrón.

En el seguimiento de la elución de proteína en las distintas cromatografías se midió la absorbancia a 280 nm, máximo correspondiente al triptófano y en menor medida a la tirosina presentes en las proteínas.

II.3. Aislamiento y purificación

II.3.1. Preparación del extracto crudo

El extracto crudo se preparó a partir de 50 g de harina de garbanzo

(tamiz 0.4 mm) y 350 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6.8 por agitación durante 2 h a una temperatura de 0-4°C (temperatura que se mantuvo constante durante todo el proceso de aislamiento y purificación). Tras la filtración del extracto a través de 4 capas de gasa hidrófila, se centrifugó a 48000 g durante 20 min. La filtración subsecuente a través de 8 capas de gasa hidrófila da lugar a un filtrado que se considera como extracto crudo.

II.3.2. Fraccionamiento con sulfato amónico

Mediante la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se realizó un fraccionamiento de las proteínas del extracto crudo. Este se lleva al 40% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (226 g/l) mediante la adición lenta de la sal, en agitación suave, y controlando la evolución del pH hacia valores ácidos con NaOH 2N. Después de 1 h de reposo se centrifuga a 35000 g durante 20 min. Tras la filtración se desecha el precipitado. El sobrenadante se lleva al 65% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (153 g/l) en idénticas condiciones. Después de la centrifugación y filtración se desecha el sobrenadante y el precipitado se redissuelve en aproximadamente 12 ml de tampón sódico 50mM, pH 6.8.

II.3.3. Cromatografía de exclusión molecular

El precipitado procedente del fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ redissuelto en tampón, fue cargado en una columna (89 x 2.8 cm) de Sephacryl S-300 equilibrada con tampón fosfato sódico 50mM, pH 6.8. La elución, que se realiza con el mismo tampón de equilibrio, se lleva a cabo con un flujo de 8.7 ml/h recogiendo fracciones de 4.3 ml. Se sigue la elución de proteínas por medida de absorbancia a 280 nm, así como la medida de actividad enzimática. Las fracciones con actividad LOX se reúnen para ser purificadas por cromatografía de intercambio aniónico.

Esta misma columna fue utilizada para la determinación del peso molecular y radio de Stokes de las proteínas con actividad LOX. Para

ello, la columna es previamente equilibrada con tampón fosfato sódico 50mM, NaCl 0.1M, pH 7.5. La elución se realiza con este tampón a un flujo de 8.25 ml/h, recogiendo fracciones de 2.75 ml. Como patrones se utilizan: azul dextrano (1 mg/ml), catalasa de hígado bovino (5 mg/ml), ferritina de bazo de caballo (0.5 mg/ml), alcohol deshidrogenasa de levadura (2 mg/ml), albúmina de suero bovino (7 mg/ml), ovoalbúmina (7 mg/ml), quimotripsinógeno A de páncreas bovino (3 mg/ml) y ribonucleasa A de páncreas bovino (10 mg/ml).

II.3.4. Cromatografía de intercambio aniónico

La fracciones con actividad LOX procedentes del apartado anterior fueron recogidas y cargadas en un columna (41 x 3.2 cm) de dietilaminoetil celulosa DE-52. Después de aplicada la muestra, ésta es eluída con 75 ml de tampón de equilibrio fosfato sódico 50 mM pH 6.8 a un flujo de 22.1 ml/h, recogiendo fracciones de 3.7 ml. La elución de la LOX se realiza mediante un gradiente lineal de fuerza iónica del tampón. Se utilizan 500 ml de tampón de equilibrio más 500 ml de tampón fosfato sódico 200mM pH 6.8 manteniéndose el mismo flujo y volumen de fracción. Durante la elución se sigue el contenido de proteína de las fracciones (280 nm), la actividad LOX a pH 5.5 y 6.0, la actividad formadora de cetodienos (FCD) así como la conductividad del eluyente de la columna.

II.3.5. Cromatografía hidrofóbica

Cada una de las colecciones de tubos con actividad LOX pH 5.5 y 6.0 fueron reunidas y acondicionadas con un 5% (p/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Estos extractos enzimáticos fueron aplicados a sendas columnas (29 x 1.6 cm) de fenil-sefarosa CL-4B, previamente equilibradas con tampón fosfato sódico 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5% (p/v), pH 6.45. Una vez cargada la muestra, se inicia la elución de las proteínas con un gradiente creciente de etilenglicol y decreciente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para ello, se utilizan 150 ml de tampón de equilibrio y 150 ml de tampón fosfato sódico 25mM, etilenglicol 50% (p/v),

pH 6.45. El flujo es de 7.3 ml/h y el volumen de las fracciones recogidas 2.4 ml. Al igual que en las anteriores cromatografías se sigue el perfil de proteínas y actividad LOX.

II.4. Cromatografía líquida rápida de proteínas

Mediante el uso de la técnica de FPLC se realizó el seguimiento del proceso de purificación de las proteínas con actividad LOX. Se hace uso de una columna intercambiadora aniónica Mono Q HR 5/5 (5 x 50 mm) y una carga de 500 μ l de las disoluciones proteicas. Estas son previamente acondicionadas con el tampón de equilibrio, fosfato sódico 50 mM pH 6.8 (eluyente A), mediante el uso de columnas Sephadex G-25 (PD-10). El programa de análisis establecido es el siguiente: la carga de proteínas se lleva a cabo en 0.5 min, realizándose posteriormente un lavado con el tampón de equilibrio durante 9.5 min. Entonces, durante 2 min, se realiza un gradiente de fuerza iónica entre el eluyente A y el B (tampón fosfato sódico 200mM, pH 6.8) hasta alcanzar el 12% de B. Tras un periodo isocrático de 13 min, comienza un nuevo gradiente de fuerza iónica desde el 12% al 62% de eluyente B en 25 min. El flujo al que se efectúa la cromatografía es de 1 ml/min, recogándose fracciones de 2 ml para medida de actividad LOX y siendo monitorizada automáticamente la absorbancia a 280 nm.

II.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los estudios por electroforesis en gradiente de poliacrilamida y SDS de las muestras proteicas se realizaron según el método de Laemmli (1970) modificado posteriormente por Gueguen *et al.* (1984).

Los geles de electroforesis (135 x 75 x 1.5 mm) estaban formados por un gradiente de poliacrilamida 7-20% (p/v) y sacarosa 0-6% (p/v), con SDS 0.1% (p/v), TEMED 0.055% (v/v) y persulfato amónico 0.025% (p/v) en tampón Tris-HCl 0.4M. Asimismo, contenían un pregel concentrador, de

aproximadamente 1 cm, compuesto por poliacrilamida 7% (p/v), sacarosa 6% (p/v), SDS 0.1% (p/v), TEMED 0.05% (v/v) y persulfato amónico 0.04% (p/v) en tampón Tris-HCl 60 mM.

Los geles se prepararon con un formador de gradiente. Para ello, se coloca en el primer vaso del formador la disolución de acrilamida 7%, obtenida mezclando 12,84 ml de una disolución de acrilamida 30% (p/v) y bisacrilamida 0.8% (p/v), además de 0.55 ml de SDS 10% (p/v), 30 μ l de TEMED, 124 μ l de persulfato amónico 10% (p/v) recién preparado, 11 ml de tampón Tris-HCl 2M pH 8.8 y 30.61 ml de agua desionizada. En el segundo vaso del formador de gradiente se carga la disolución correspondiente al 20% de acrilamida. Esta consiste en las mismas cantidades de las disoluciones de SDS, TEMED, persulfato amónico y tampón Tris-HCl anteriores más 36.66 ml de la disolución de acrilamida-bisacrilamida, 5.50 ml de sacarosa 60% (p/v) y 1.26 ml de agua desionizada. Esta mezcla en gradiente, para 5 geles, se lleva a cabo durante 30 min a 0-4°C con el correspondiente número de cartuchos formadores de geles previamente ocupados por metanol 50% (v/v). Se deja polimerizar a dicha temperatura durante una noche. Una vez retirada la disolución protectora de metanol 50%, se carga a temperatura ambiente el pregel de concentración, que consiste en una mezcla de 12 ml de la disolución madre de acrilamida-bisacrilamida, 0.5 ml de SDS 10%, 5 ml de la disolución de sacarosa, 6 ml de tampón Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 25 μ l de TEMED, 200 μ l de persulfato amónico y 26.5 ml de agua desionizada. Inmediatamente se introduce un peine formador de pocillos que se retira una vez polimerizado este pregel concentrador (aproximadamente 1h). De esta forma, se obtiene un pregel de concentración de aproximadamente 1 cm y un gel de separación de alrededor de 12.5 cm.

El tampón de electroforesis consiste en una disolución de Tris 50mM, glicina 0.38M y SDS 0.1% (p/v).

Antes de la carga de las proteínas, se realiza un equilibrado del gel de electroforesis sometándolo a una intensidad de 25 mA/gel durante 20 min. Las muestras se colocan en los pocillos disueltas en tampón de

solubilización que consiste en una disolución de SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0.003% (p/v) como marcador del frente de electroforesis, en tampón Tris-HCl 63mM, pH 6.8. Una vez cargadas la muestras, el gel se somete a las mismas condiciones eléctricas que en el equilibrio del gel hasta que el marcador del frente llegue al gel separador, cambiando entonces a una intensidad de 50 mA/gel (400 V, 100W). El proceso electroforético termina cuando el azul de bromofenol llega al final del gel, proceso que dura aproximadamente 100 min.

La visualización de las proteínas se realizó por tinción con plata haciendo uso del método de Henkeshoven y Dernick (1985). Este consiste en una impregnación del gel con AgNO_3 0.1% (p/v) durante 30 min, tras haber sido fijadas las proteínas en el gel con ácido tricloroacético 20% (p/v) durante 1 h y posterior lavado de éste con etanol 10% (v/v) y agua destilada. El disolvente revelador consiste en Na_2CO_3 2.5% (p/v) y formaldehido 0.02% (v/v), aplicándose repetidamente hasta aparición de las manchas correspondientes a las proteínas teñidas. El proceso revelador se interrumpe por lavado del gel con ácido acético 1% (v/v) y agua destilada. Para retirar el color del fondo del gel y aumentar la resolución entre bandas proteicas, se utiliza el reductor de Farmer 0.5% (ferricianuro potásico 0.15% , tiosulfato sódico 0.3% y carbonato sódico 0.05%) y posterior lavado del gel con agua destilada.

II.6. Isoelectroenfoque

El cálculo de los puntos isoeléctricos de las proteínas con actividad LOX purificadas se determinó por isoelectroenfoque haciendo uso de la técnica de FPLC con columna Mono P HR 5/20. Esta columna contiene una matriz con características de intercambiador aniónico diseñada especialmente para la separación de moléculas en función de sus puntos isoeléctricos.

En primer lugar, la fase cromatográfica es equilibrada con tampón imidazol-HCl 25mM pH 6.35 al que sigue la carga de las muestras. Estas

eran previamente acondicionadas con el tampón de equilibrio anterior mediante el uso de microcolumnas Sephadex G-25 (PD-10). Una vez efectuada la carga, se lleva a cabo la elución de las proteínas gracias a un gradiente de pH obtenido por el paso de Polybuffer 74-HCl pH 3.9 (dilución 1:8) a través de la columna. El flujo utilizado es de 0.5 ml/min, recogiendo fracciones de 1 ml para determinación de pH y actividad LOX. Las proteínas son monitorizadas automáticamente (280 nm) durante el desarrollo cromatográfico.

II.7. Espectrofotometría UV-Vis

Los espectros de absorción UV-Vis fueron realizados en el rango 250-800 nm con los isoenzimas LOX-1 y LOX-2 purificados en concentración de 0.217 y 0.084 mg/ml respectivamente. Ambas proteínas habían sido previamente acondicionadas con agua desionizada usando microcolumnas de Sephadex G-25 (PD-10).

II.8. Análisis de aminoácidos

Para el análisis de la composición en aminoácidos de los isoenzimas de LOX de garbanzo se hizo uso de la técnica descrita por Henrikson y Meredith (1984). Muestras conteniendo 0.108 y 0.073 mg de LOX-1 y LOX-2 respectivamente, en viales con tapón de teflón y atmósfera de nitrógeno, son hidrolizadas a 115°C durante 24, 48, 72 y 96 h en HCl 6N. Después de la hidrólisis, el exceso de HCl es eliminado por evaporación con corriente de nitrógeno y adición de 0.2 ml de agua desionizada por dos veces, entonces se forman los derivados feniltiocarbamil de los aminoácidos por reacción de éstos con fenilisotiocianato. Los aminoácidos derivatizados son separados por HPLC con una columna de fase reversa Novapack C18 5 µm (150 x 3.9 mm) y detección a 254 nm. La fase móvil está constituida por una mezcla en gradientes crecientes y decrecientes de las disoluciones siguientes: acetato de sodio trihidrato (19 g/l, pH 6.4 con trietilamina 3.6M):acetonitrilo (94:6, v/v) y acetonitrilo:agua (60:40, v/v).

Los residuos de cisteína libres contenidos en las proteínas fueron determinados según el método de Ellman (1959). La mezcla de reacción contiene, en un volumen final de 0.84 ml, tampón fosfato sódico 50mM pH 6.8, urea 6M, 0.127 mg de LOX-1 ó 0.044 mg de LOX-2, y DTNB 50 veces en exceso respecto a la cantidad de proteína. Transcurridos 15 min, se mide la cantidad de 5-tio-2-nitrobenzoato liberado en la reacción por el incremento en absorbancia a 412 nm, considerando un coeficiente de extinción molar de $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

El número total de grupos -SH fue determinado en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Cavallini *et al.*, 1966). Alicuotas de las disoluciones de proteínas son incubadas a 38°C durante 30 min en un volumen de 1 ml conteniendo: 480 mg de urea, 33 μl de AEDT 0.5M en NaOH 2N y 333 μl de NaBH_4 2.5% (p/v). Al cabo de este tiempo, se añade 167 μl de una disolución de KH_2PO_4 1M que contiene HCl 0.2N, y después de 5 min, 667 μl de acetona. Posteriormente, se hace pasar por la mezcla una corriente de nitrógeno durante 5 min, se añade 167 μl de DTNB 10mM y se vuelve a pasar nitrógeno durante 2 min. Transcurridos 15 min, se mide el incremento de absorbancia a 412 nm.

La diferencia entre el número total de grupos -SH y los residuos de cisteína libres indican el número de puentes disulfuro existentes en las proteínas.

El contenido en triptófano de los isoenzimas de LOX se calculó por el método de Edelhoch (1967). Se preparan disoluciones de distinta concentración de ambas proteínas en presencia de hidrocloreuro de guanidinio 6M, calculándose los coeficientes de extinción molar de las proteínas a las longitudes de onda de 280 y 288 nm. El número de moléculas de triptófano por molécula de proteína viene dado por la fórmula siguiente:

$$N_{\text{Trp}} = (E_{288}/3103) - (E_{280}/10318)$$

II.9. Determinación de hierro

El contenido en hierro que presentan ambos isoenzimas de LOX fue determinado con ayuda de un espectrofotómetro de absorción atómica equipado con cámara de grafito pirolizado HGA 400 y muestreador automático.

Las medidas se llevan a cabo tanto por obtención previa de una recta patrón de hierro (FeCl_3) en el intervalo 250-750 ppb, como por el sistema denominado de adición estándar, añadiendo 400, 800 y 1200 ppb de hierro a las muestras proteicas antes de su análisis por absorción atómica. La detección de hierro se realiza a 249 nm.

II.10. Cooxidación de pigmentos

La cooxidación de pigmentos por LOX se pone claramente de manifiesto por la decoloración de éstos. Para el análisis de los potenciales cooxidadores de pigmentos de ambas isoenzimas de LOX de garbanzo, se prepararon disoluciones sustrato de β -caroteno y acetato de retinol de la siguiente forma (Ben-Aziz *et al.*, 1971): 1 mg de β -caroteno (1.525 mg de acetato de retinol ó 1 mg de clorofila) es disuelto en 1 ml de cloroformo al que se había añadido previamente 36 μ l de Tritón X-100. De esta disolución madre, se toma 0.1 ml, se evapora en corriente de nitrógeno y se disuelve en 1 ml de AEDT 0.25% (p/v) en tampón fosfato sódico 50 mM pH 5.5 (ó 6.0 para estudios con LOX-2). A esta disolución se añade 2.5 ml de ácido linoleico 10 mM (preparada según II.1.1.) y 16.5 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 5.5 (ó 6.0 para LOX-2).

La reacción de cooxidación se lleva a cabo por incubación durante 10 min a 20°C de 2 ml de la disolución de sustrato con distintas cantidades de isoenzimas de LOX purificadas. La decoloración de los pigmentos se sigue espectrofotométricamente a 460 nm para el β -caroteno y a 330 nm para el acetato de retinol. Asimismo, se estudia paralelamente la producción de hidroperóxidos y cetodienes por medida a 234 nm y 280 nm

respectivamente.

II.11. Análisis de los productos de reacción

II.11.1. Obtención de los metabolitos

Los productos de reacción se obtuvieron mediante la incubación de ambos isoenzimas con ácido linoleico. El medio de incubación consiste en 40 ml de tampón fosfato sódico 50mM pH 5.5 ó 6.0 (dependiendo del isoenzima) saturado en oxígeno, al que se añade 5 ml de ácido linoleico 10mM y disoluciones de enzima. Tras 30 min de reacción con agitación constante a 20°C y borboteo continuo de oxígeno, la reacción se detiene por adición de HCl 2N hasta un pH de 1.5.

Los metabolitos obtenidos a partir del ácido linoleico, por acción enzimática, son extraídos del medio de reacción con una microcolumna de fase reversa C18, previamente activada con 10 ml de metanol y lavada con 30 ml del tampón utilizado en la incubación. Después de pasar a través de la columna el medio de reacción y retirar el exceso de agua con hexano, los productos de reacción son eluidos de la microcolumna con 2 ml de metanol. Estos productos son metilados con diazometano según el método de Cohen (1984). Este se obtiene mezclando en éter etílico 2-(2-etoxietoxi)-etanol con NTSA y KOH 60% (p/v), siendo recogidos los gases formados en éter etílico por arrastre con nitrógeno. La disolución de diazometano en éter etílico se añade a los productos de reacción hasta persistencia de color amarillo, indicativo de exceso de diazometano y final de la reacción de metilación.

II.11.2. Metabolitos marcados radioactivamente

La reacción enzimática en presencia de [1-¹⁴C]-13-LAOOH exigió la preparación previa de este compuesto. Acido linoleico marcado radioactivamente en el carbono 1 (1628200 dpm) era sonificado con 1 ml de

ácido linoleico 10mM (preparado según II.1.1.). A esta disolución se le añadían 20 ml de tampón Tris-HCl 200mM pH 9, saturado de oxígeno, y 150 μ l de una disolución de LOX de soja comercial (97 U/ml). Después de llevar a cabo la reacción enzimática durante 3 min, en agitación y borboteo continuo de oxígeno y a una temperatura de 0-4°C, era detenida por adición de HCl 2N hasta pH 1.5. A continuación los productos de reacción eran obtenidos con una microcolumna C18 como se ha indicado en el apartado anterior. Estos productos fueron desarrollados por TLC en sílice con hexano:éter etílico:ácido acético (50:50:1, v/v/v) y la banda de 13-LAOOH raspada y extraída con metanol. De esta forma se obtiene una disolución de [1-¹⁴C]-13-LAOOH 4.515mM con 1229160 dpm/ml.

El sustrato para la reacción de LOX-1 de garbanzo consiste en 400 μ l de la disolución de 13-LAOOH marcado radioactivamente, cuya obtención se ha descrito antes, que era evaporado con corriente de nitrógeno y rediseuelto en 2 ml de ácido linoleico 10mM por sonicación. Posteriormente, se sigue el mismo proceso de incubación enzimática y obtención de los metabolitos que se ha descrito en el apartado anterior. Los productos de la reacción anterior, tras su metilación, son analizados por TLC con un desarrollo doble de hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1, v/v/v). Las bandas radioactivas son detectadas con un analizador lineal de radioactividad Berthold LB 2820-1 siendo el flujo de gas PR (metano al 10% en argón) de 20 ml/min, y por autorradiografía con película radiográfica médica de rayos X (Valca película rápida 90''). Los productos de las placas TLC son visualizados por pulverización de éstas con ácido sulfúrico 50% y posterior calentamiento a 300°C.

II.11.3. Cromatografía líquida de alta resolución

Los productos de la reacción enzimática con los isoenzimas LOX-1 y LOX-2, ya metilados, se analizaron por HPLC en una columna LiChrosorb Si 60 5 μ m (250 x 4 mm). La fase móvil es hexano:éter etílico (92:8, v/v) y el flujo de elución de 1.25 ml/min. La detección se lleva a cabo simultáneamente a 234 nm, para el análisis de hidroperóxidos, y a 270 nm,

para el de los cetodienos. Para la identificación de los hidroperóxidos se utilizan patrones obtenidos mediante reacción del ácido linoleico con LOX comercial de soja para el 13-LAOOH, y de patata para el 9-LAOOH. A partir de la disolución de 13-LAOOH obtenida con LOX de soja (que contenía un 5% de 9-LAOOH) se obtienen patrones de cetodienos por oxidación con CrO_3 -piridina (Smith *et al.*, 1960).

El análisis e identificación de cada uno de los isómeros producidos en la reacción enzimática se efectuó mediante las técnicas de cromatografía de gases-espectrometría de masas y espectrofotometría IR. Para ello, el primer paso consiste en la obtención por separado de la totalidad de los cetodienos por una parte y de los hidroperóxidos por otra. Esto se realiza mediante el uso de la técnica de HPLC con columna LiChrosorb Si 60 $7\mu\text{m}$ (250 x 10 mm) a un flujo de 2 ml/min, consitiendo la fase móvil en hexano:isopropanol (97.5:2.5, v/v).

Una vez obtenidos todos los hidroperóxidos y cetodienos de forma separada se procedió al aislamiento de cada uno de los isómeros, de nuevo por HPLC, para su posterior identificación. En este sentido y dada la inestabilidad que presentan los hidroperóxidos en el inyector del cromatógrafo de gases, éstos son reducidos a sus correspondientes derivados hidroxilados mediante el uso de NaBH_4 (1 mg/ml), no afectando esta reducción a los dobles enlaces de las moléculas. Tras ser filtrados y extraídos tres veces con hexano, se separan por HPLC con columna LiChrosorb Si 60, $7\mu\text{m}$, (250 x 10 mm) con un flujo de 4 ml/min durante 10 min, para disminuir hasta los 12 min a 2ml/min, que se mantiene hasta el final del análisis. La fase móvil se compone de hexano:isopropanol (99:1, v/v), y la detección se realiza a 230 nm, recogándose cada uno de los isómeros por separado. En el caso del aislamiento de los isómeros de los cetodienos formados en la reacción enzimática, al igual que antes, éstos se obtuvieron por HPLC en las mismas condiciones cromatográficas descritas al inicio de este apartado para el análisis de los productos de la reacción enzimática pero con un flujo de 0.5 ml/min, y un volumen de inyección cuatro veces mayor (20 μl).

II.11.4. Cromatografía de gases-espectrometría de masas

Tanto los isómeros de los cetodienos, como los de hidroxidienos procedentes de los hidroperóxidos, fueron identificados por espectrometría de masas en un sistema VG AEI MS-30 al cual se encuentra acoplado un cromatógrafo de gases HP-5890 II equipado con columna capilar SP 2380 BP (30 m x 0.25 mm). Los cetodienos son analizados en condiciones isoterms a 200°C durante 5 min para aumentar posteriormente a 2°C/min hasta alcanzar los 250°C utilizando He (1 ml/min) como gas portador. El análisis de los hidroxidienos conlleva la formación previa de los derivados trimetilsilados por adición de 100 µl de BSTFA y calentamiento durante 30 min a 70°C. Los hidroxidienos se analizan tal como se obtienen por HPLC o tras reducción de los dobles enlaces. Para ello, se lleva a cabo su hidrogenación durante 30 min, utilizando PtO₂ como catalizador. Una vez obtenidos los derivados sililados se realizan los espectros de masas de cada isómero después de su elución por cromatografía gaseosa en condiciones isoterms a 190°C. Todos los productos eluidos de la columna capilar fueron ionizados a 70 eV y registrados en un intervalo de m/e de 40-500.

II.11.5. Espectrofotometría IR

A fin de confirmar la identificación por espectrometría de masas, se efectuó un análisis IR, tanto de los cetodienos como de los hidroxidienos, principalmente para identificar la presencia de dobles enlaces de tipo *E* en las moléculas. Este análisis se realiza en película sobre KBr en un sistema Perkin-Elmer 782 Infrared Spectrophotometer.

III. REACTIVOS Y APARATOS

III.1. Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron suministrados por las casas comerciales que a continuación se detallan.

La casa Merck suministró los productos para la obtención de los tampones de trabajo como Tris, hidrogenofosfato y dihidrogenofosfato sódico, dihidrogenofosfato potásico, imidazol, glicina, sulfato amónico y etilenglicol. También procedía de esta casa éter etílico, ácido *o*-fosfórico, trimetilamina, hidrocloreuro de guanidinio, sacarosa, persulfato amónico, carbonato sódico, acetato sódico, urea, cloruro férrico, acetato sódico, óxido crómico, sulfocianuro sódico, *o*-fenantrolina, ditizona y óxido platínico.

De la casa Sigma Chemical Co. procedían los siguientes compuestos: los ácidos poliinsaturados linolénico, γ -linolénico y araquidónico, así como Tween-20, Triton X-100, TEMED, nitrato de plata, fenilisotiocianato, DTNB, LOX 1 de soja, azul de bromofenol, DTT, β -mercaptoetanol, IAA, MMTS, NEM, *p*-HMB, EDC, GEE y los pigmentos clorofila a, β -caroteno y acetato de retinol.

Los disolventes con calidad HPLC se adquirieron a Romil Chemical Ltd. Estos fueron etanol, metanol, acetona, cloroformo, hexano e isopropanol.

Pharmacia Fine Chemical suministró la mayoría de los productos relacionados con la separación y estudio molecular de las proteínas, como Sephacryl S-300, fenil-sefaroza CL-4B, columnas Sephadex G-25 (PD-10), azul dextrano, catalasa de hígado bovino, ferritina de bazo de caballo, alcohol deshidrogenasa de levadura, albúmina de suero bovino, ovoalbúmina, quimotripsinógeno A y ribonucleasa A de páncreas bovino, Polybuffer 74, colecciones de patrones de proteínas para electroforesis de alto (67-669 KDa) y bajo peso molecular (14.4-94 KDa). La fase cromatográfica

dietilaminoetil celulosa DE-52 fue suministrada por la casa Whatman Biosystems Ltd.

De Panreac procedía el glicerol y formaldehido, así como los ácidos acético, tricloroacético y clorhídrico. También tenían esta procedencia hidróxido sódico, ferricianuro potásico, tiosulfato sódico, sulfato ferroso, y los cloruros de manganeso, cálcico, de bario, mercúrico, de magnesio, de cobalto, de zinc y cúprico.

Nu-Chek-Prep. Inc. suministró el ácido linoleico, y Amersham, el ácido linoleico marcado en el carbono 1.

LKB suministró acrilamida y bisacrilamida; Serva, azul de Coomassie G-250 y SDS; Baker Chemical B.V., 2-(2-etoxietoxi)-etanol y microcolumnas C18; Fluka Chemie A.G., borohidruro sódico, NTSA y TNBS; Macherey-Nagel, placas TLC (10 x 20 cm) S11 G-25 UV₂₅₄₊₃₆₆; Supelco Inc., BSTFA, y Valca, películas (rápida 90'') médica de rayos X.

III.2. Aparatos

Las medidas espectrofotométricas, tales como actividad enzimática, espectros de absorción UV-Vis y determinación de proteínas, se efectuaron en un Hewlett-Packard 8450 A UV-VIS Spectrophotometer conectado a un HP 7225A Plotter.

Los espectros de masas de los distintos isómeros de cetodienos e hidroxidienos trimetilsililados se realizaron en un Mass Spectroscopy VG AEI MS-30, al cual está acoplado un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890-II con una columna SP 2380 BP (30 m x 0.25 mm).

Una unidad Perkin-Elmer 782 Infrared Spectrophotometer sirvió para la realización de los espectros IR de los isómeros de los cetodienos e hidroxidienos.

La determinación del contenido de hierro en las proteínas se realizó con un Perkin-Elmer 3030 Atomic Absorption Spectrophotometer, equipado con una cámara de grafito pirolizado HGA 400 y muestreador automático.

El isoelectroenfoque y análisis del grado de pureza de los isoenzimas en las distintas etapas de purificación se llevó a cabo en un sistema FPLC de Pharmacia. Este consiste en una unidad Liquid Chromatography Controller LCC-500 Plus, dos bombas P-500, columnas Mono P HR 5/20 (isoelectroenfoque) y Mono Q HR 5/5 (intercambio aniónico), Monitor UV-M a 280 nm, y un colector de fracciones Fracc-100.

Las cromatografías para la purificación de las proteínas se realizaron en cámara fría a 4°C, utilizando columnas de vidrio, bombas peristálticas P-1 y colectores de fracciones Fracc-100 y Fracc-300 de Pharmacia.

El análisis y separación de los metabolitos obtenidos en la reacción enzimática fueron llevados a cabo con un sistema de HPLC Hewlett-Packard 1090 con columnas LiChrosorb Si 60 5 μm (250 x 4 mm) y 7 μm (250 x 10 mm), controlado por una unidad HP-85B, al cual están conectados un registrador HP-Think Jet y un HP-7470A Plotter. El análisis de los aminoácidos se realizó en un sistema de HPLC Waters Assoc. con columna Novapack C18 5 μm (150 x 3.9 mm).

Las electroforesis de las proteínas se realizaron con ayuda de una unidad GE-2/4 y fuente de alimentación eléctrica ECPS 3000/150, ambas de Pharmacia.

Mediante un analizador lineal de radioactividad Berthold LB 2820-1 controlado por un ordenador Apple IIe, al cual está conectada una impresora Epson RX-80, se efectuó la medida de la radioactividad existente en las distintas bandas procedentes del desarrollo TLC de muestras radioactivas.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en centrífugas refrigeradas

Beckman L8-70M Ultracentrifuge con rotor T-30 y Sorvall Instruments RC5C con rotor SS-34.

La harina de garbanzo se obtenía con un picador universal Taurus y posterior tamización a través de una malla de 0.4 mm.

Las medidas de pH se efectuaron con un pH-metro Crison Digit 501; la sonicación para la obtención de sustratos, con un sonicador Bransonic 221; la obtención de extractos crudos a partir de semillas germinadas, con un Omni-mixer Sorvall; la concentración de proteínas en disolución con cartuchos concentradores Amicon A25 de 0.5 ml, y el agua desionizada con un sistema Milli-Q Water System de Millipore.

RESULTADOS

I. PURIFICACION DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD LIPOXIGENASA

I.1. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad LOX se realizó por medida del incremento en absorbancia a 234 nm (según se describe en Materiales y Métodos) debido al cromóforo que se obtiene en la formación del hidroperóxido (Axelrod *et al.*, 1981). Las cinéticas de formación de hidroperóxidos son casi, pero no totalmente, lineales durante el primer minuto de reacción (Figs. 14 y 15), por lo que se optó por la medida de la actividad LOX durante los 30 primeros segundos de la reacción para asegurar la linealidad y máxima pendiente de la producción de hidroperóxidos frente al tiempo de reacción.

I.2. Determinación de proteínas

Las concentraciones de proteínas en las distintas muestras se determinaron por el método de Bradford (1976) según se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 7, se recoge la recta de calibrado en el rango 0-60 μg de proteínas totales. Las medidas se realizaron siempre por triplicado.

I.3. Aislamiento y purificación

I.3.1. Obtención del extracto crudo

Se realizaron diversas experiencias con semillas de garbanzo encaminadas a la obtención extractos crudos con los más altos niveles de actividad LOX. Los mejores resultados se obtuvieron a partir de harina de garbanzo, por agitación en frío (0-4°C) con tampón fosfato sódico 50mM, pH 6.8, durante 2 h, en comparación con las semillas de garbanzo germinadas en vermiculita húmeda a 25°C en la oscuridad. En este caso, las semillas

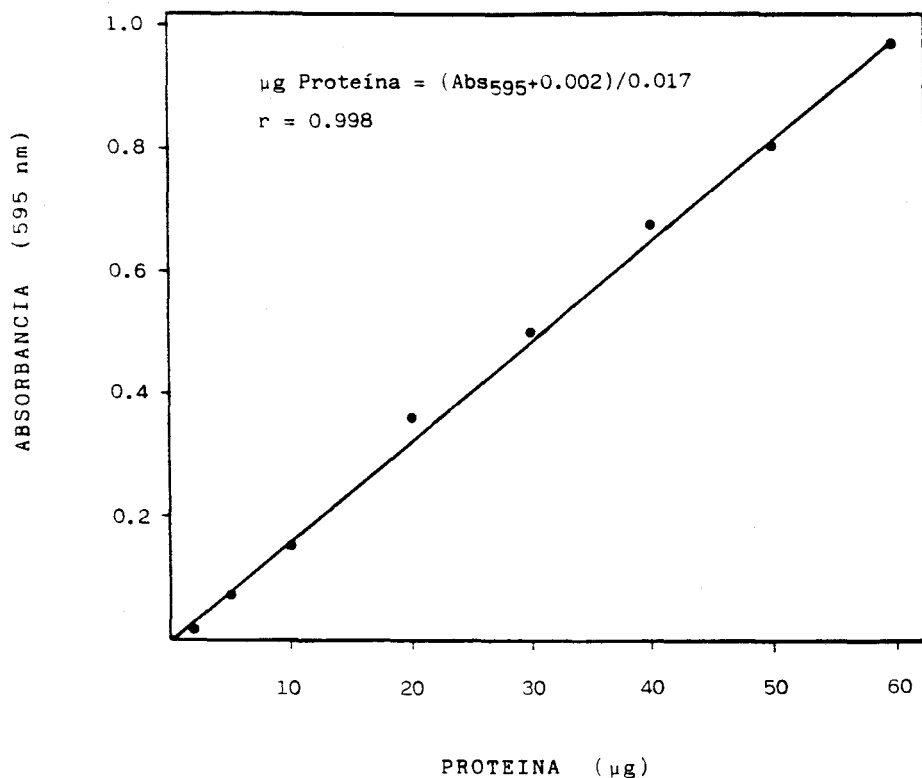


Figura 7.- Recta de calibrado para la determinación de proteínas por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

en germinación fueron trituradas en Omnimixer con cinco sesiones de 20 segundos, con filtración y centrifugación posterior a 48000 g durante 20 min. El estudio de la actividad LOX en los distintos extractos enzimáticos obtenidos durante la germinación de las semillas, evidencian una pérdida de actividad LOX durante este proceso (Tabla I).

Tabla I.- Actividad lipoxigenasa de extractos crudos de garbanzo en los primeros días de germinación.

Germinación (días)	Actividad LOX (U/g PF)	Actividad específica (U/mg)
- (seca)	316.7	6.73
1 (hidratada)	113.3	3.55
2	94.4	2.63
3	70.2	2.26

Una vez establecido que el material biológico a utilizar sería la harina de garbanzo obtenida según se describe en Materiales y Métodos, se realizaron pruebas con la intención de determinar el grado de asociación de la actividad LOX con las membranas. La solubilización parcial y selectiva de proteínas puede ser obtenida por varios métodos, siendo el uso de detergentes no iónicos el que dan lugar a mejores resultados (Helenius y Simons, 1975). Diversas experiencias de extracción utilizando independientemente Tritón X-100 y Tween-20 0.2%, con y sin la ayuda de sonicación, mostraron que las proteínas con actividad LOX de garbanzo no se encontraban asociadas a la fase particulada. De la misma forma, la totalidad de la actividad LOX presente en el extracto crudo era recogida en el sobrenadante tras su ultracentrifugación a 150000 g.

Por otra parte, se ha demostrado que los polifenoles que se encuentran en el garbanzo no provocan inactivación de la actividad LOX. El uso de PVP en un 25% (p/v) en la obtención del extracto crudo, no dio lugar a una diferencia significativa en cuanto a la cantidad de actividad enzimática. Tampoco el uso de columnas de Sephadex G-25 (PD-10), para eliminar del extracto crudo posibles inactivadores con peso molecular menores de 5000 Da, dio lugar a cambios en la actividad enzimática.

A partir de los resultados obtenidos, se llegó a un sistema de extracción de la actividad LOX de garbanzo que consistía simplemente en la agitación en frío de harina de garbanzo con 7 volúmenes de tampón fosfato sódico 50mM pH 6.8, según queda recogido en el apartado II.3.1. de Materiales y Métodos.

I.3.2. Fraccionamiento con sulfato amónico

Aprovechando la variabilidad en respuesta frente a la concentración de sales neutras de las diferentes proteínas que forman parte de un extracto proteico, éstas pueden ser separadas por insolubilización con sulfato amónico, sal que presenta una gran solubilidad en agua, lográndose alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas.

Se realizaron experiencias con alícuotas de 20 ml de extracto crudo a fin de determinar el porcentaje de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el cual precipitaban las proteínas con actividad LOX. Así, se demostró que dichas proteínas con actividad LOX son insolubilizadas prácticamente en su totalidad (alrededor del 85%) en el intervalo 40-65% de saturación de esta sal. Este intervalo de fraccionamiento contiene aproximadamente el 30% de las proteínas originales del extracto crudo (Fig. 8).

I.3.3. Cromatografía de exclusión molecular

El segundo paso en la purificación de la lipoxigenasa de garbanzo corresponde a una cromatografía de exclusión molecular. La Figura 9 muestra el perfil de elución a través de Sephacryl S-300 del precipitado redissuelto procedente del fraccionamiento con sulfato amónico. En esta etapa se logra recoger la totalidad de la actividad enzimática con que se carga la columna, eliminándose más de la mitad del contenido en proteínas.

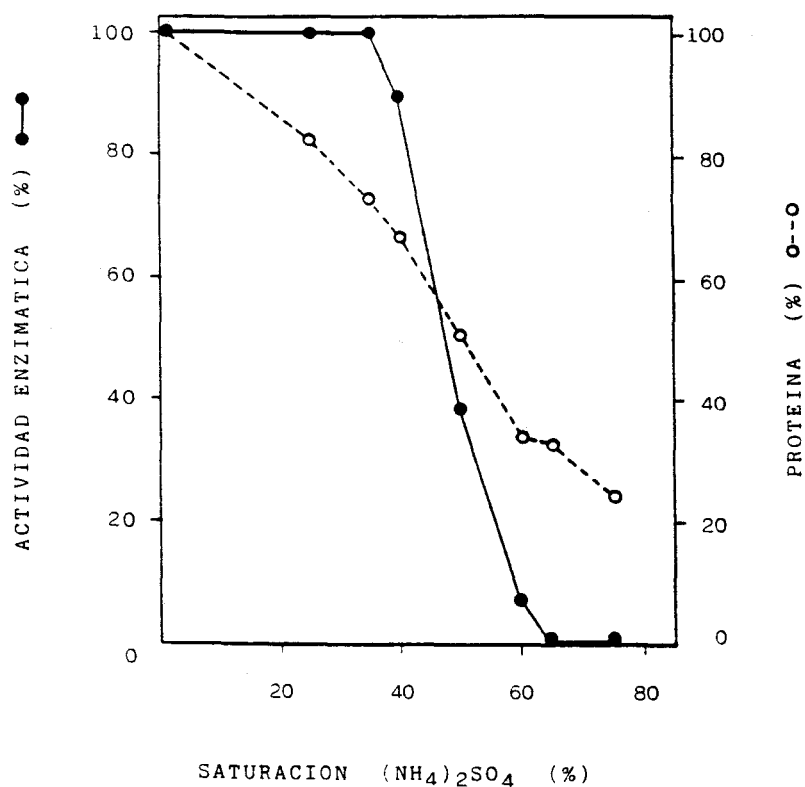


Figura 8.- Fraccionamiento por precipitación con sulfato amónico del extracto crudo. A 20 ml de éste se va añadiendo sulfato amónico en distintos porcentajes de saturación, determinándose en el sobrenadante la actividad lipoxigenasa ($\bullet\text{---}\bullet$) y la proteína ($\circ\text{---}\circ$). El 100% de actividad corresponde a 23.49 U/ml, y el de proteína a 8.50 mg/ml.

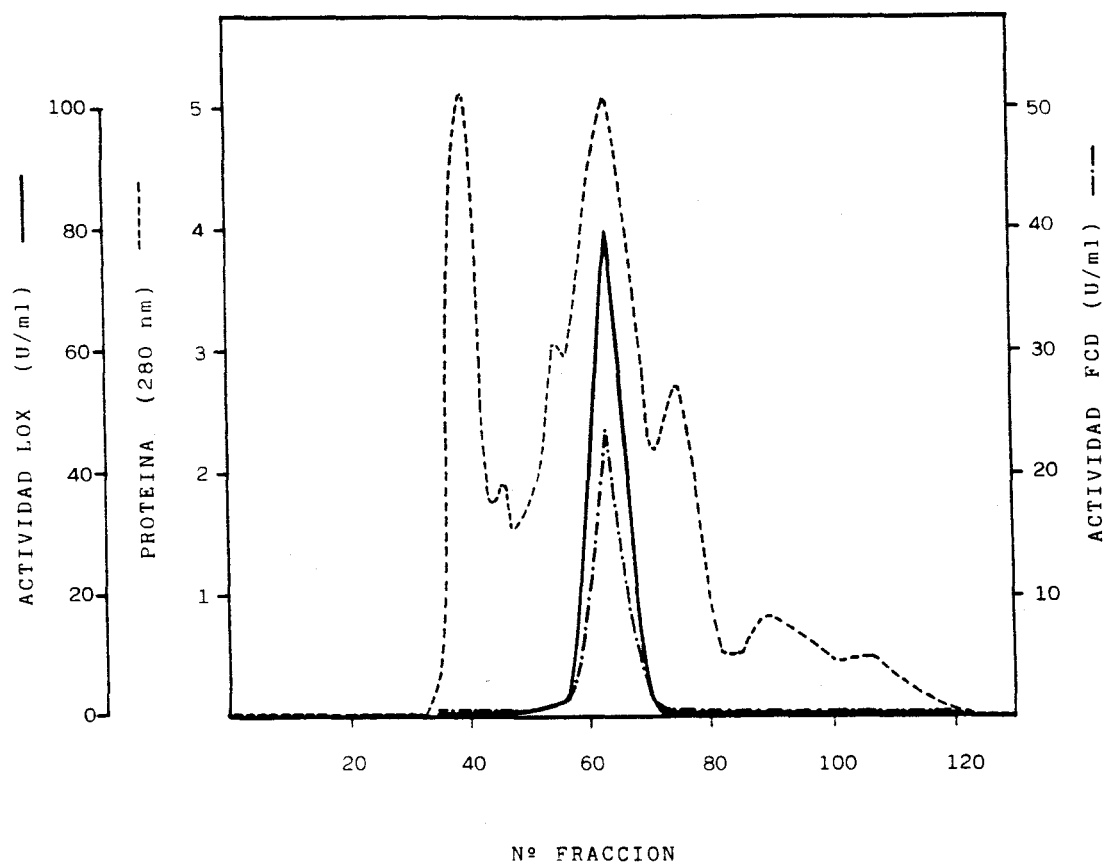


Figura 9.- Cromatografía de exclusión molecular sobre Sephacryl S-300 (89 x 2.8 cm) del precipitado procedente del fraccionamiento con sulfato amónico del extracto crudo (entre el 40 y 65% de saturación), rediseuelto en tampón fosfato sódico 50mM, pH 6.8. El flujo de elución fue regulado a 8.7 ml/h, recogiéndose fracciones de 4.3 ml.

I.3.4. Cromatografía de intercambio aniónico

En esta etapa de purificación se lleva a cabo la separación de dos isoenzimas con actividad LOX presentes en garbanzo, gracias a la pequeña, pero suficiente, diferencia existente entre ambos en cuanto al comportamiento ácido-base. El gradiente de fuerza iónica entre 50 y 200mM de fosfato sódico pH 6.8 en la columna de dietilaminoetil celulosa hace que un isoenzima, que denominamos LOX-1, sea eluido antes que el otro (LOX-2) de carácter más aniónico. El cálculo, en base a los valores de conductividad, de la concentración del tampón necesaria para la elución de ambos isoenzimas revelan que LOX-1 no es retenida por la fase cuando la concentración del tampón es de aproximadamente 70mM, mientras que LOX-2 no es eluida de la columna hasta alcanzar una concentración de alrededor de 95mM en fosfato sódico pH 6.8.

La Figura 10 muestra el perfil cromatográfico del extracto procedente de la exclusión molecular. Durante el lavado de la columna con el tampón de equilibrio se eluye una gran cantidad de proteína no retenida por la fase de intercambio o con escasas características aniónicas. Cuando entra en juego el cambio en fuerza iónica aparecen dos picos de proteína con actividad LOX que son recogidos por separado para su ulterior purificación en la siguiente etapa.

I.3.5. Cromatografía hidrofóbica

El último paso de purificación tuvo en realidad dos funciones diferentes. De una parte, dio lugar a una purificación de los isoenzimas, esencialmente de LOX-2, y de otra el acondicionamiento de dichas proteínas con aproximadamente un 25% de etilenglicol que se mostró como un buen estabilizante de la actividad LOX.

La cromatografía hidrofóbica en fenil-sefarosa de ambos extractos enzimáticos con actividad LOX procedentes del intercambio aniónico es recogida en la Figura 11. Del perfil de elución obtenido para ambos

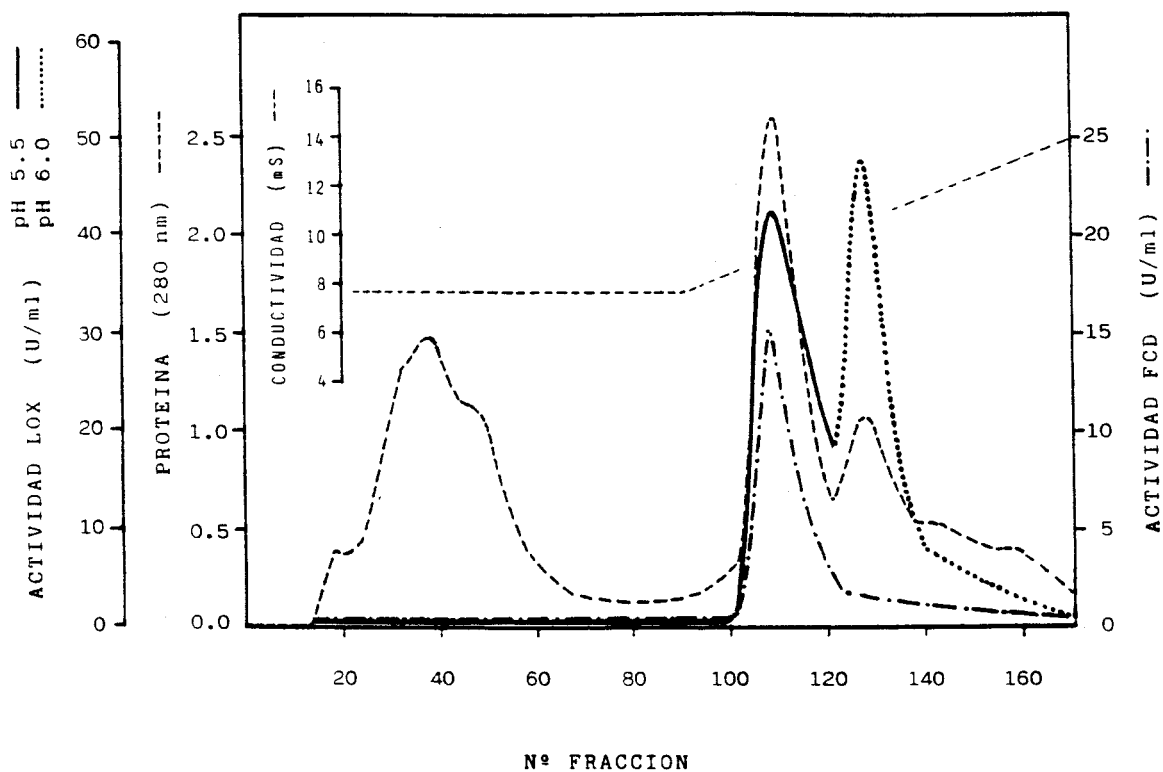


Figura 10.- Cromatografía de intercambio aniónico sobre dietilaminoetil celulosa DE-52 (41 x 3.2 cm) de la preparación de lipoxigenasa procedente de la cromatografía de exclusión molecular. El flujo de elución era 22.1 ml/h y las fracciones recogidas de 3.7 ml.

isoenzimas en esta fase cromatográfica, se deduce que LOX-2 posee un menor carácter hidrofóbico que LOX-1. Ya se vio en la anterior etapa de purificación que LOX-2 necesita una mayor fuerza iónica para ser eluida de la columna, lo que significa una mayor concentración de grupos cargados en la parte exterior de la proteína en comparación con LOX-1. Esto sugiere generalmente un menor de carácter hidrofóbico de la proteína.

Mediante el gradiente lineal de etilenglicol se consigue en ambas cromatografías una "limpieza" de proteínas que no presentan actividad LOX. A tenor de los resultados obtenidos, y recogidos en la Tabla II, parece que en el proceso cromatográfico se produce una inactivación enzimática, especialmente en el caso de LOX-1, cuya actividad específica disminuye significativamente respecto a la etapa de intercambio aniónico.

I.4. Criterios de pureza

Se utilizan dos métodos diferentes para evaluar la pureza de las preparaciones enzimáticas correspondientes a ambos isoenzimas de LOX de garbanzo durante el proceso de purificación.

I.4.1. Cromatografía líquida rápida de proteínas

En la Figura 12 se recogen los análisis cromatográficos por la técnica de FPLC, con columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5, de los extractos enzimáticos obtenidos en los tres últimos pasos de purificación de las proteínas con actividad LOX presentes en garbanzo.

Gracias a esta técnica tan resolutive, se puede comprobar cómo la etapa de purificación que hace uso del intercambio aniónico da lugar a isoenzimas de LOX bastante puras, especialmente el extracto de LOX-1. En esta etapa, el extracto de LOX-2 queda parcialmente impurificado, entre otras proteínas, por LOX-1. Asimismo, esta técnica permite demostrar que la última etapa de purificación (cromatografía hidrofóbica) da lugar a dos

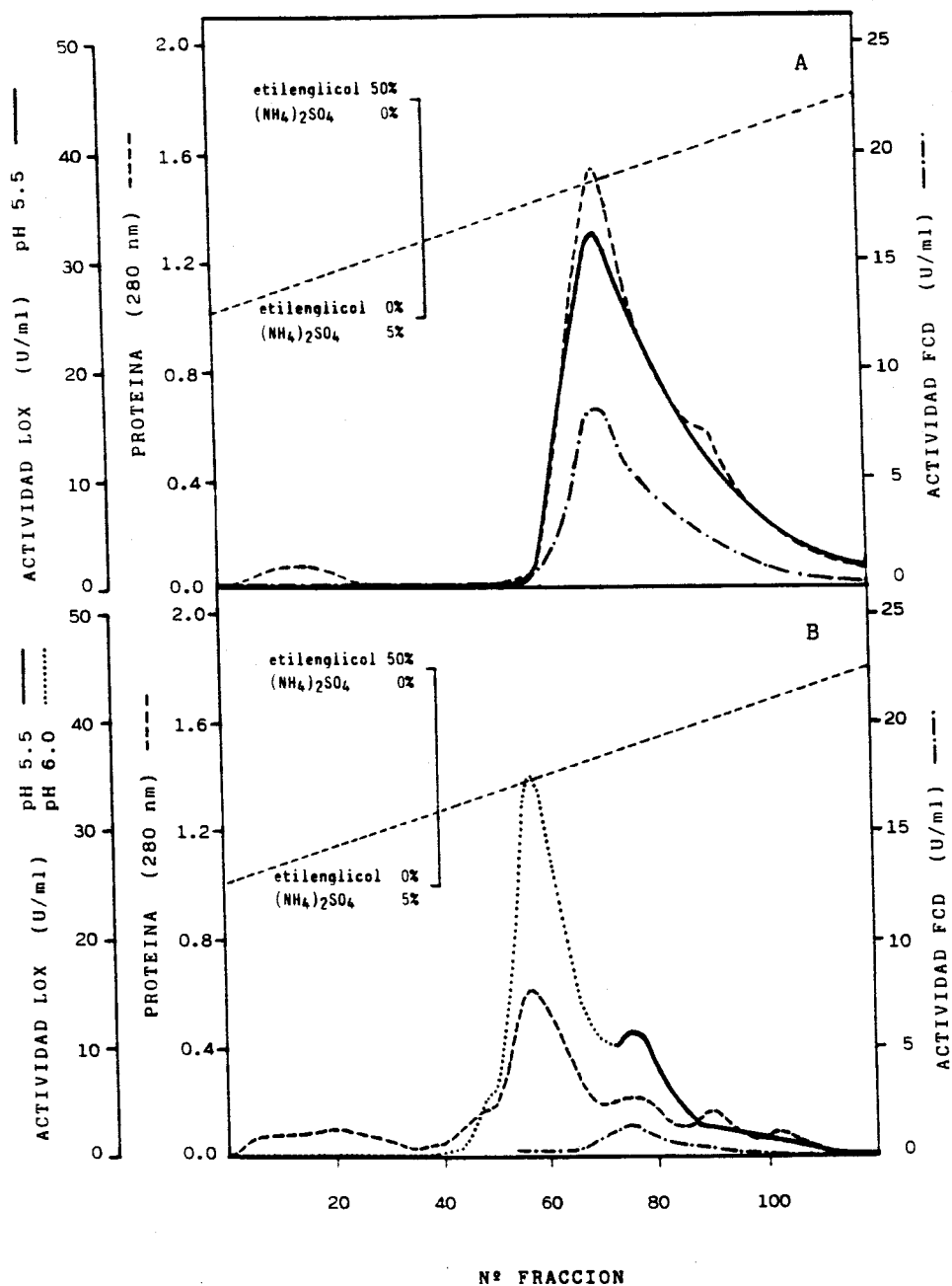


Figura 11.- Cromatografía hidrofóbica en fenil-sefaroza CL-4B (29 x 1.6 cm) de las preparaciones enzimáticas obtenidas en la cromatografía de intercambio aniónico: A. LOX-1; B. LOX-2. La elución se llevó a cabo a 7.3 ml/h y el volumen de las fracciones recogidas 2.4 ml.

Tabla II.- Separación y purificación de isoenzimas de lipoxigenasa de garbanzo.

Etapa	V (ml)	Act. (U)	Prot. (mg)	Act.esp. (U/mg)	Pur. (veces)	Rend. (%)
EC	265.0	9087	2260.00	4.02	1.0	100.0
Sobrenad. 40%						
(NH ₄) ₂ SO ₄	277.5	7666	1736.50	4.44	1.1	84.4
Ppdo. 65-40%						
(NH ₄) ₂ SO ₄	12.6	7066	672.35	10.51	2.61	77.8
S-300	88.5	7065	289.80	24.38	6.06	77.8
DE-52						
LOX-1	64.5	4058	55.88	72.63	18.07	44.7
LOX-2	72.0	2018	30.04	67.18	16.71	22.2
CL-4B						
LOX-1	64.0	1649	27.70	61.12	15.20	18.2
LOX-2	36.5	884	10.72	81.53	20.28	9.7

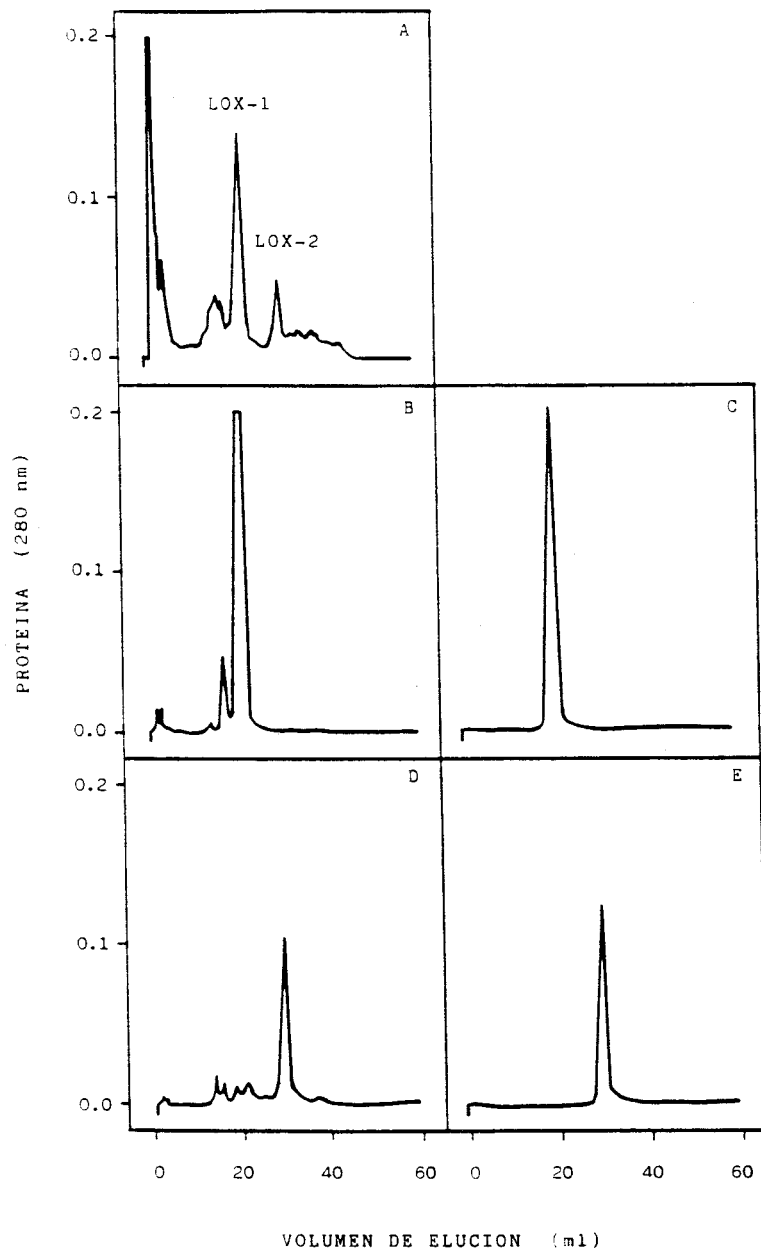


Figura 12.- Análisis por FPLC en columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 (5 x 50 mm) de las preparaciones obtenidas en las tres últimas etapas de purificación. El flujo de elución era 1 ml/min, recogiendo fracciones de 2 ml. Las preparaciones corresponden a: A. Cromatografía de exclusión molecular; B. LOX-1 de intercambio aniónico; C. LOX-1 de cromatografía hidrofóbica; D. LOX-2 de intercambio aniónico; E. LOX-2 de cromatografía hidrofóbica.

isoenzimas de LOX de gran pureza, ya que la observación de los perfiles de proteínas muestran a un único pico simétrico de proteínas en ambos casos.

I.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las preparaciones enzimáticas de LOX-1 y LOX-2 fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida 7-20% con SDS seguidas de la tinción con plata como se describe en Materiales y Métodos. Ambos isoenzimas purificados muestran una movilidad muy similar en el desarrollo electroforético (Fig. 24), estando aparentemente constituidos por una única banda proteica. Una observación detenida de las manchas muestra que en realidad existe una banda estrecha de mayor movilidad electroforética, parcialmente solapada a la principal en ambos casos. Dicha banda podría ser debida a un diferente desarrollo de las proteínas que están cerca de los cristales de la placa durante el proceso de electroforesis, o bien debida a los mismos isoenzimas de LOX parcialmente desnaturalizados, quizás por pérdida de su átomo de hierro. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que esta banda secundaria era de mayor intensidad a medida que la muestra proteica que se sometía a electroforesis llevaba más tiempo preparada, especialmente en el caso de LOX-2.

Se realizaron intentos de tinción de actividad LOX en los geles siguiendo el método de Guss *et al.* (1967) con resultados negativos, debido con toda probabilidad a una inactivación de los isoenzimas en el desarrollo electroforético. La reacción cromogénica consiste en la incubación a 25°C durante 30 min del gel en un medio de reacción consistente en ácido linoleico 2.5mM en tampón fosfato sódico 50mM pH 6.0. Después de la reacción enzimática, el tratamiento con una disolución de KI 5% (p/v) y ácido acético 15% (v/v) da lugar en unos minutos a unas bandas de color marrón azulado donde existen proteínas con actividad LOX.

II. PROPIEDADES CATALITICAS

II.1. Efecto del pH sobre la actividad lipoxigenasa

La dependencia con el pH de la actividad enzimática de ambos isoenzimas de LOX en el intervalo 3.5-9 queda recogida en la Figura 13. LOX-1 muestra un pH óptimo de actuación de aproximadamente 5.5, conservando un 20% de actividad LOX a pH 3.5, pero es totalmente inhibida a valores de pH ligeramente básicos. LOX-2 tiene un pH óptimo de actividad de 6.0, perdiendo el 90% de la actividad enzimática a pH 3.5, y siendo también inhibida ésta a valores de pH superiores a 7.5.

II.2. Especificidad por sustrato

Tanto LOX-1 como LOX-2 muestran una gran afinidad por el ácido linoleico, principal ácido poliinsaturado en el reino vegetal. La Tabla III muestra esta mayor especificidad de ambos isoenzimas por este ácido diinsaturado.

Tabla III.- Especificidad de los isoenzimas de lipoxigenasa por diferentes ácidos poliinsaturados.

Sustrato	Actividad enzimática (%)	
	LOX-1	LOX-2
Acido linoleico (C18:2, ω -6)	100.0	100.0
Acido linolénico (C18:3, ω -3)	24.5	17.4
Acido γ -linolénico (C18:3, ω -6)	9.8	14.8
Acido araquidónico (C20:4, ω -6)	1.7	5.1

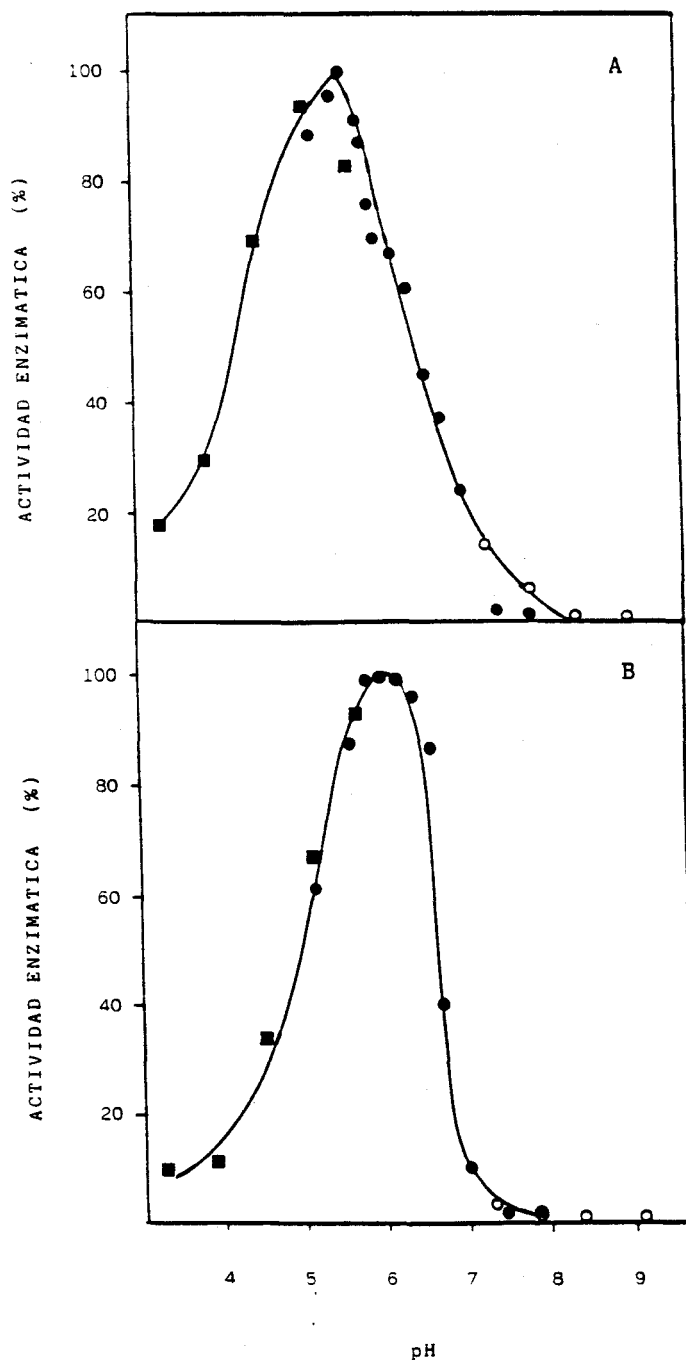


Figura 13.- Determinación del pH óptimo de actividad lipoxigenasa de los isoenzimas LOX-1 (A) y LOX-2 (B). Los distintos valores de pH se obtuvieron con los siguientes tampones: (■) acetato sódico 50mM; (●) fosfato sódico 50mM; (○) Tris-HCl 50mM.

Otros ácidos poliénoicos utilizados dan lugar a una menor actividad enzimática, siendo entre ellos el ácido linoléico el que más fácilmente es oxidado por ambas proteínas, aunque solo un 24% con LOX-1 y un 17.4% con LOX-2 respecto a la actividad que presentan ambas proteínas utilizando ácido linoleico como sustrato.

II.3. Cinética de reacción

Los isoenzimas de LOX presentan cinéticas de reacción claramente distintas al aumentar la concentración de ellos en la mezcla de reacción. En la Figura 14 se demuestra que un aumento de la concentración de LOX-2 en la mezcla de reacción da lugar a la formación de hidroperóxido de una forma prácticamente proporcional. Este modelo cinético, en cambio, no es observado por LOX-1. Como ya mostraron Christopher *et al.* (1972) con el isoenzima L-3 de soja, a medida que aumenta la concentración de LOX-1 de garbanzo en la mezcla de reacción se produce una disminución de la actividad específica del enzima (Fig. 15). Este efecto es más marcado en la cuantificación de los hidroperóxidos, ya que la producción de cetodienos (280 nm) demuestra una mayor conservación de la actividad específica al aumentar la concentración de LOX-1, aunque sigue sin existir linealidad entre la concentración de enzima y la actividad específica.

Por otra parte, ambos isoenzimas muestran una pérdida de actividad a lo largo de la incubación enzimática como se demuestra en la Figura 16. La adición de ácido linoleico 10mM a los 10 y 20 min del comienzo de la reacción provoca un pequeño aumento de la producción de hidroperóxidos, que representa aproximadamente un 20-30% de la velocidad inicial. El borboteo de oxígeno a los 10 y 20 min del comienzo de la reacción en cambio, no dio lugar a cambios en la producción de hidroperóxidos, lo que sugiere que la concentración de oxígeno no es un factor limitante de la reacción enzimática. La concentración de oxígeno a 20°C en tampón fosfato sódico 50mM es aproximadamente de 275mM (Robinson y Cooper, 1970), lo que explica la no participación del oxígeno en dicha pérdida de actividad enzimática.

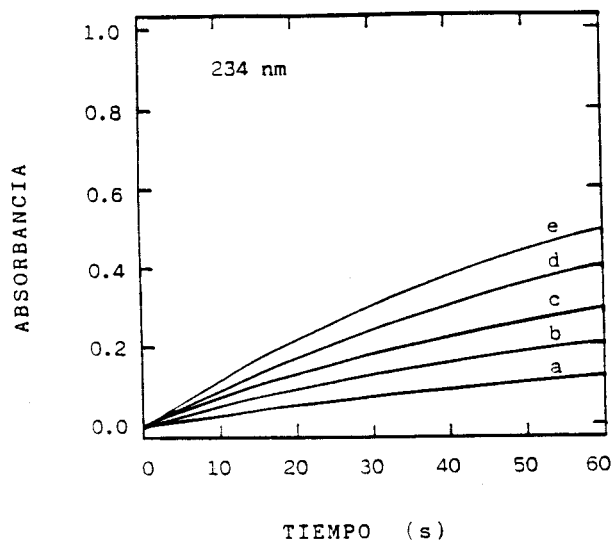


Figura 14.- Cinéticas de formación de hidroperóxidos por LOX-2. (a) 0.25 μg ; (b) 0.50 μg ; (c) 0.75 μg ; (d) 1.00 μg ; e. 1.25 μg .

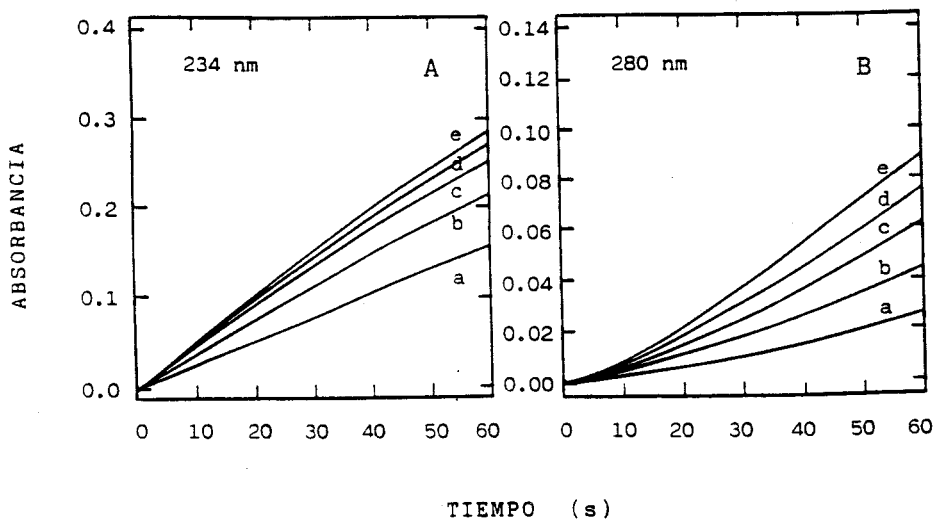


Figura 15.- Cinéticas de formación de hidroperóxidos (A) y cetodienes (B) por LOX-1. (a) 0.34 μg ; (b) 0.68 μg ; (c) 1.02 μg ; (d) 1.36 μg ; (e) 1.70 μg .

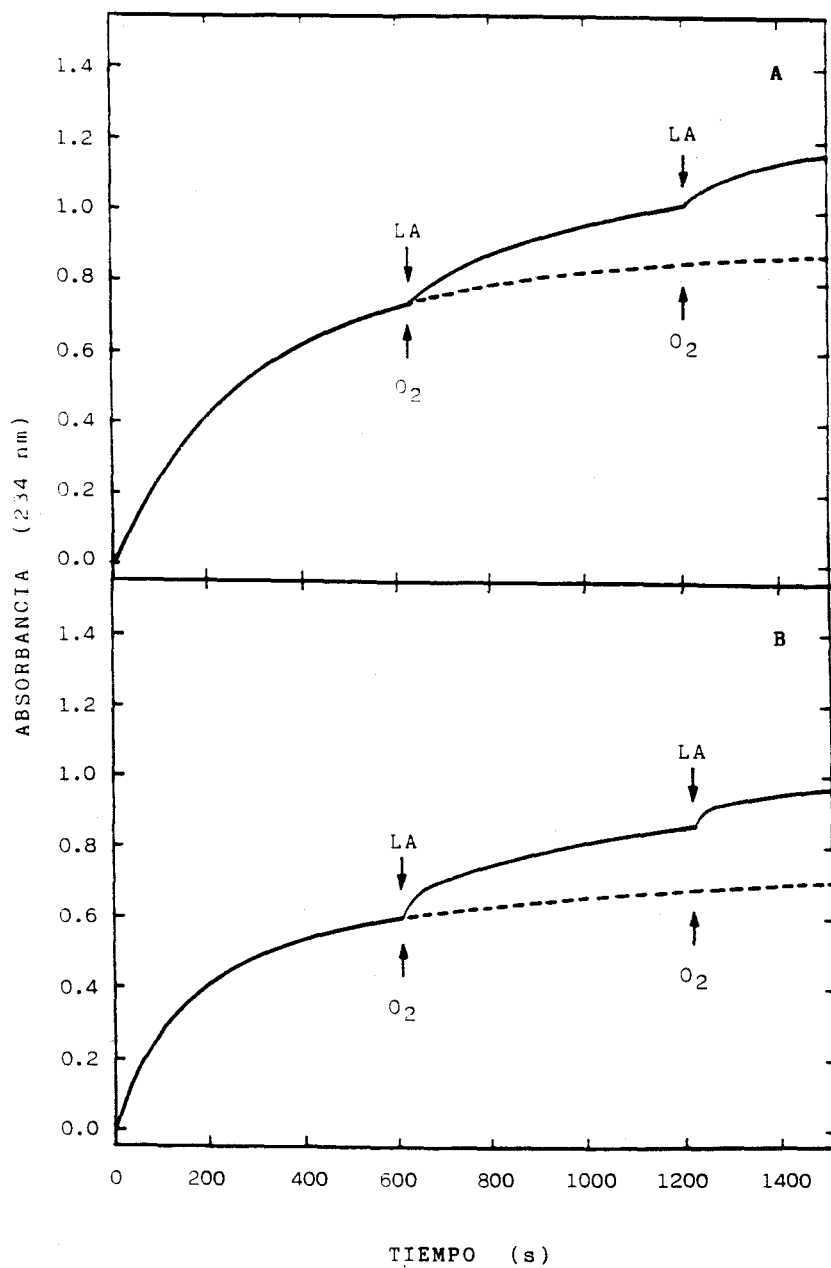


Figura 16.- Cinéticas de formación de hidroperóxidos por LOX-1 (A) y LOX-2 (B). A los 10 y 20 min se adicionaban 50 μ l de ácido linoleico 10mM a la cubeta de reacción (—), o era borboteado O₂ durante 15 s (----).

II.4. Determinación de parámetros cinéticos

Se han determinado las velocidades de reacción para concentraciones variables de ácido linoleico. Ambas proteínas presentan cinéticas típicas de Michaelis-Menten, mostrando LOX-1 una disminución de la velocidad de reacción a partir de concentraciones de ácido linoleico de 0.23mM, lo que sugiere una inhibición por sustrato de este isoenzima. Las representaciones de Lineweaver-Burk para cada uno de los isoenzimas de LOX, utilizando ácido linoleico como sustrato en el intervalo de concentración 17-385 μ M, son mostradas en la Figura 17. La extrapolación de la porción recta de las representaciones de dobles inversos da para LOX-1 un valor de constante de Michaelis-Menten aparente (K_M) de 192 μ M, una velocidad máxima de 17.76 nmol LAOOH·ml⁻¹·min⁻¹, y una actividad molecular de 7549 min⁻¹. LOX-2 demuestra una mayor afinidad por el ácido linoleico con $K_M = 51\mu$ M, $V_{max} = 5.59$ nmol LAOOH·ml⁻¹·min⁻¹ y una actividad molecular de 7852 min⁻¹.

II.5. Estabilidad de la actividad lipoxigenasa

II.5.1. Efecto de la temperatura

El proceso de desnaturalización que las proteínas experimentan cuando son sometidas a temperaturas elevadas supone la pérdida de solubilidad así como la inactivación enzimática, que en el caso de LOX-1 y LOX-2 es irreversible.

En la Figura 18 se muestran las cinéticas de desnaturalización térmica que presentan LOX-1 y LOX-2 a distintas temperaturas. Se observa que LOX-1 presenta una mayor estabilidad térmica que LOX-2. En términos absolutos se puede decir que LOX-1 es más estable que LOX-2 en un intervalo de temperatura 10°C mayor. De esta forma, LOX-1 no ve afectada su actividad catalítica cuando es incubada a 50°C durante 1h, mientras que LOX-2 es totalmente inactivada antes de que transcurran 50 min de incubación a dicha temperatura. La incubación a 60°C de ambos isoenzimas

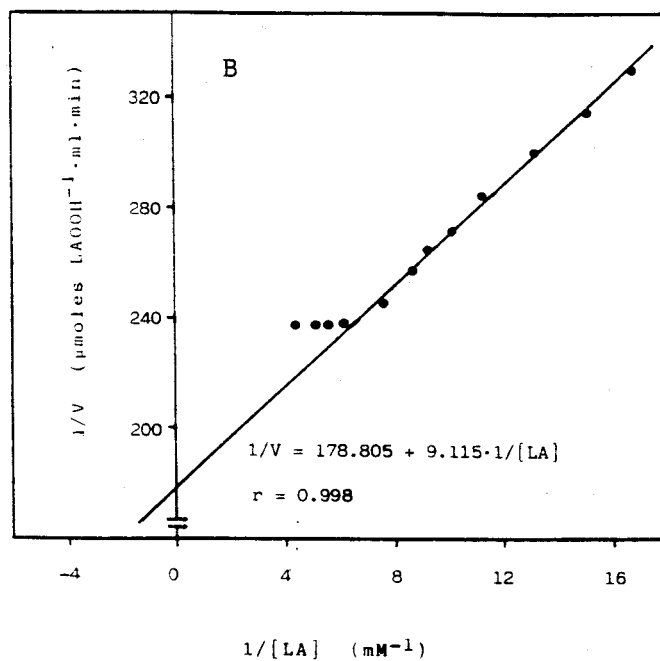
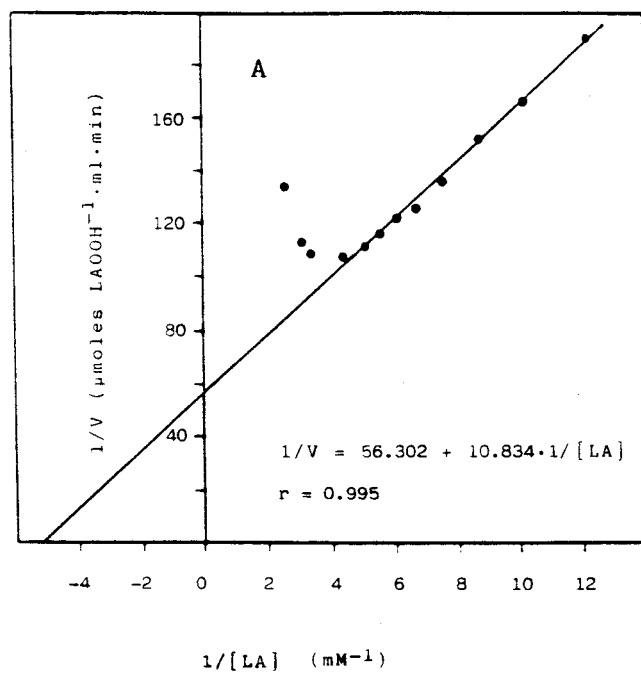


Figura 17.- Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de K_M para ácido linoleico de LOX-1 (A) y LOX-2 (B).

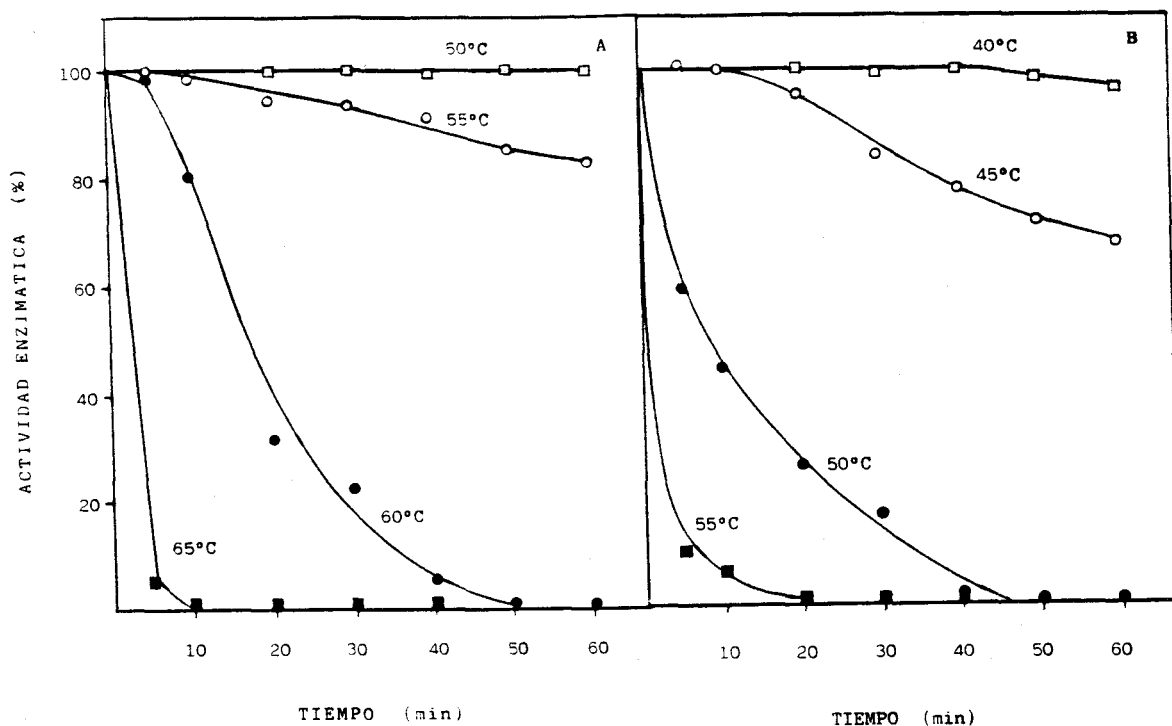


Figura 18.- *Cinéticas de desnaturalización térmica de LOX-1 (A) y LOX-2 (B). 1 ml de las preparaciones enzimáticas de LOX-1 y LOX-2 fueron incubadas a las temperaturas indicadas, extrayéndose alícuotas de 125 μ l a diferentes tiempos y acondicionándolas inmediatamente a 0-4°C. El 100% de actividad corresponde a 20.11 U/ml para LOX-1 y 9.68 U/ml para LOX-2.*

muestra que LOX-1 conserva un 20% de actividad después de 30 min de incubación, mientras que LOX-2 precipita y pierde su actividad enzimática en escasos minutos después de su exposición a dicha temperatura.

II.5.2. Almacenamiento

Se llevaron a cabo diferentes ensayos a fin de determinar la estabilidad que presenta la actividad enzimática de LOX-1 y LOX-2 a lo largo del tiempo de almacenamiento. Ambas proteínas necesitan la presencia de agentes protectores como glicerol o etilenglicol pues pierden rápidamente la actividad enzimática. El etilenglicol se mostró como el mejor agente protector y experiencias realizadas a dos concentraciones distintas de este compuesto dan lugar a los resultados recogidos en la Tabla IV.

Tabla IV.- Efecto de las condiciones de almacenamiento con etilenglicol sobre la actividad enzimática de LOX-1 y LOX-2.

Ioenzim	etilenglicol (%)	Tiempo de actividad media (días)		
		25°C	4°C	-25°C
LOX-1	25	24	150	150
LOX-1	45	56	234	340
LOX-2	25	7	95	25
LOX-2	45	7	25	8

Se ha comprobado de esta forma que LOX-1 conservada a -25°C con un 45% (v/v) de etilenglicol presenta un tiempo de actividad media de aproximadamente 1 año. LOX-2, en cambio, presenta los mejores resultados cuando es conservado a 4°C con etilenglicol 25% (v/v). El tiempo de actividad media de LOX-2 en estas condiciones es de 95 días.

II.6. Inhibición de la actividad lipoxigenasa

II.6.1. Efecto de los metales

En la Tabla V se puede observar el efecto causado por diferentes iones metálicos, en concentración de 1mM, sobre la actividad enzimática de los isoenzimas de LOX.

Tabla V.- Efecto de diferentes iones metálicos (concentración 1 mM) sobre la actividad enzimática de los isoenzimas de lipoxigenasa de garbanzo.

Ión metálico	Actividad enzimática (%)	
	LOX-1	LOX-2
-	100	100
Fe ³⁺	85	37
Fe ²⁺	96	67
Mg ²⁺	104	92
Ca ²⁺	103	55
Ba ²⁺	102	88
Hg ²⁺	84	0
Mn ²⁺	107	28
Co ²⁺	103	70
Zn ²⁺	102	64
Cu ²⁺	87	10

Se realizaron incubaciones de los diferentes iones metálicos en 200 μ l de las disoluciones enzimáticas a 0-4°C, midiéndose la actividad LOX a lo largo del tiempo hasta las 24 h. Se ha encontrado que en LOX-1, los diferentes iones metálicos pueden ejercer tanto efectos activadores como inhibidores de la actividad enzimática. Por el contrario, en el caso de LOX-2 las incubaciones con dichos iones siempre dan lugar a una inactivación del enzima en diferente grado. En este último isoenzima es de destacar la inactivación total provocada por el Hg^{2+} , la pérdida del 90% de la actividad con Cu^{2+} , del 68% con Mn^{2+} , así como más del 60% cuando el ión utilizado en la incubación es Fe^{3+} . A excepción del Mn^{2+} , estos mismos iones fueron los únicos capaces de provocar cierta inhibición (alrededor del 15%) sobre LOX-1. Por el contrario, el Mn^{2+} se muestra como el ión metálico que da lugar a una mayor activación enzimática de LOX-1 de entre los iones ensayados.

II.6.2. Efecto del ácido 13-hidroperoxioctadecadienoico

Incubaciones de 200 μ l de los isoenzimas de LOX con 13-LAOOH 0.12mM (obtenido según se describe en Materiales y Métodos) durante 24 h a 0-4°C dieron como resultado la inactivación enzimática de LOX-2 en un 40%, mientras que la actividad de LOX-1 permaneció inalterada en las mismas condiciones.

El empleo de 13-LAOOH en la mezcla de reacción en distintas concentraciones llevó a la observación de una inhibición de la actividad enzimática debido a este compuesto. Esta inhibición fue mayor en LOX-2 que en LOX-1 como podemos ver en la Figura 19, y en esta última se ven afectadas de igual manera la actividad formadora de hidroperóxidos como la formadora de cetodienos. Cuando en la mezcla de reacción se suprime el ácido linoleico, existiendo sólo 13-LAOOH, no se observó destrucción de éste, así como tampoco una transformación en el cetodieno correspondiente, al añadir LOX-1 a la mezcla de reacción.

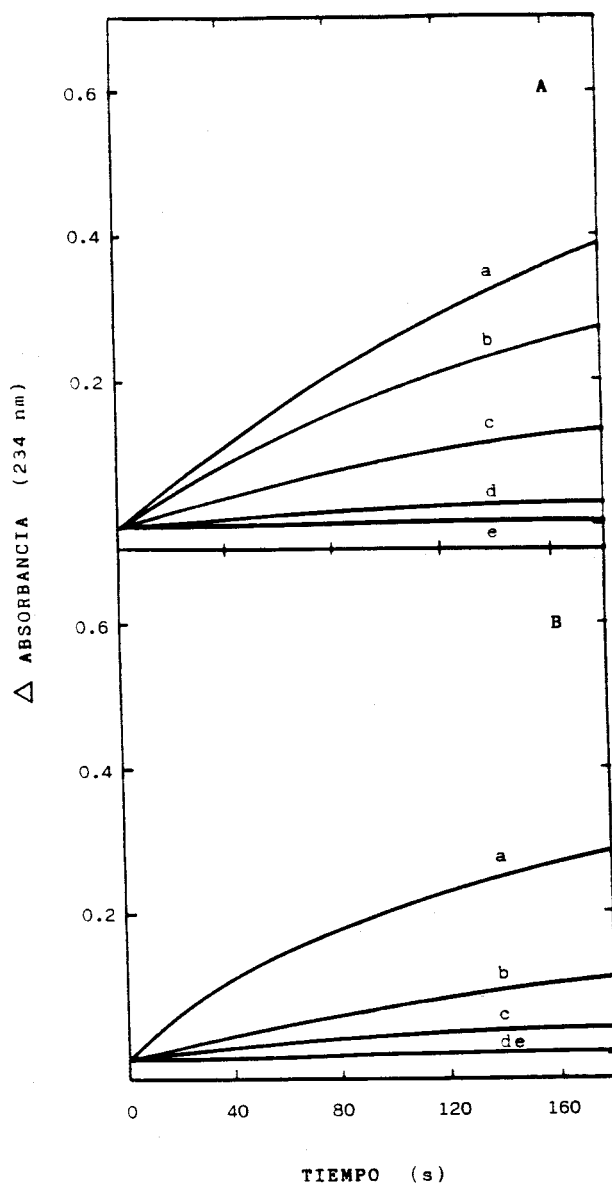


Figura 19.- Efecto del 13-LA00H sobre las cinéticas de formación de hidroperóxidos de LOX-1 (A) y LOX-2 (B). La mezcla de reacción contenía, además de ácido linoleico, diferentes concentraciones de 13-LA00H: (a) -; (b) $40\mu\text{M}$; (c) $80\mu\text{M}$; (d) $120\mu\text{M}$; (e) $80\mu\text{M}$ (sin ácido linoleico).

III. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

III.1. Espectro de absorción UV-Vis

LOX-1 y LOX-2 presentan espectros de absorción UV-Vis entre 250-800 nm muy similares, con un máximo de absorción a 279 nm en ambos casos, y no presentando prácticamente absorción en la región de 300-800 nm (Fig. 20). El cálculo del coeficiente de extinción molar, a partir de las concentraciones de ambos isoenzimas y de la absorbancia a 279 nm, da lugar a un valor de $169893 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para LOX-1, y de $154518 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para LOX-2.

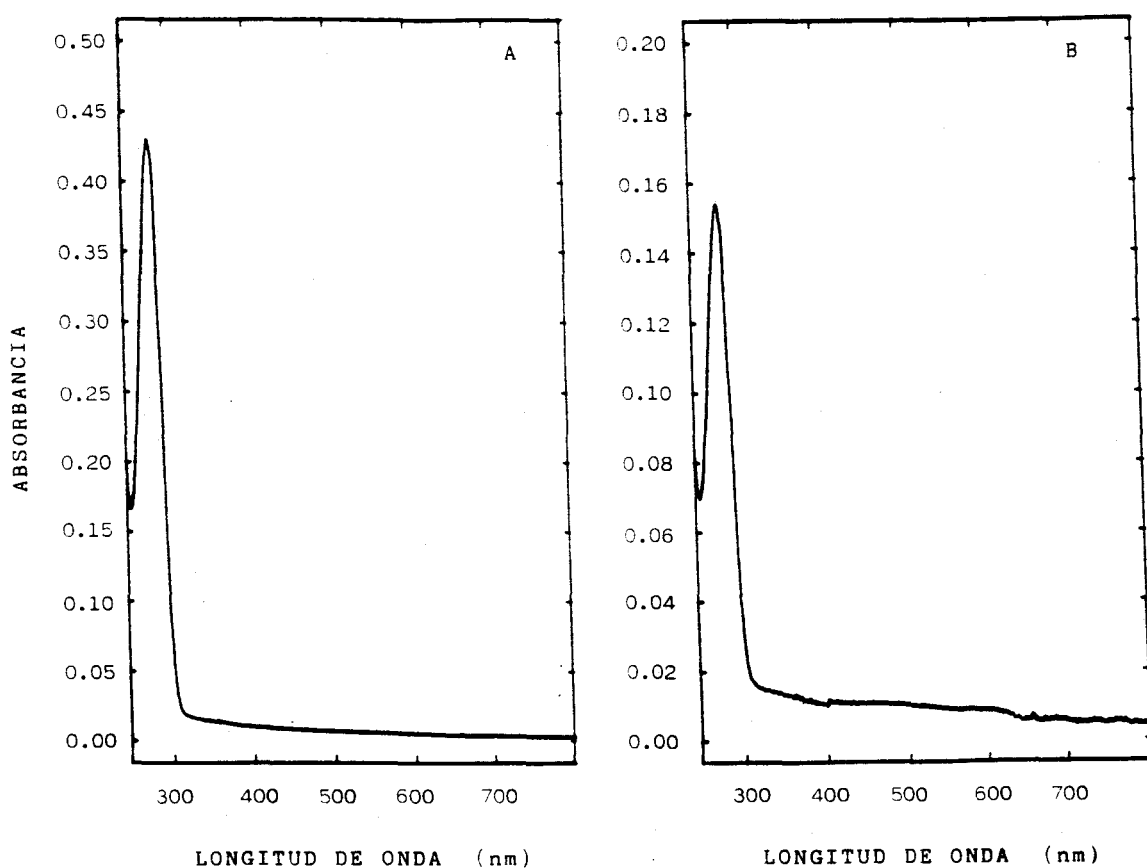


Figura 20.- Espectro de absorción UV-Vis de los isoenzimas de lipoxigenasa de garbanzo. A. LOX-1, 0.217 mg/ml; B. LOX-2, 0.084 mg/ml.

III.2. Estudio del tamaño molecular

III.2.1. Filtración en gel

Mediante el uso de una columna de Sephacryl S-300, tal como se describe en Materiales y Métodos, se realizó la determinación del peso molecular y radio hidrodinámico de LOX-1 y LOX-2. En la Figura 21 quedan recogidos los perfiles de elución que se encontraron para ambos isoenzimas de LOX de garbanzo y los patrones utilizados para la calibración. En la Tabla VI se muestran los resultados obtenidos. La interpolación de los valores obtenidos para LOX-1 y LOX-2 en la recta de calibrado de pesos moleculares resulta en un valor de 96336 ± 1200 Da para ambos isoenzimas (Fig. 22). A partir de la recta de calibrado de los radios hidrodinámicos (Fig. 23), se calcula un valor de 38.12 Å tanto para LOX-1 como LOX-2.

III.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La determinación del peso molecular de ambos isoenzimas mediante el uso de la técnica de electroforesis en gradiente de poliacrilamida 7-20% y SDS, dio lugar a un valor calculado para ambos isoenzimas de alrededor de 97000 Da (Fig. 24). Por otra parte, el tratamiento de LOX-1 y LOX-2 con β -mercaptoetanol 5% (v/v) y SDS 2% (p/v) durante 10 min a 100°C, llevó a la obtención de una sola banda proteica con la misma movilidad electroforética encontrada para las proteínas que no habían recibido dicho tratamiento. Se deduce de estos resultados que tanto LOX-1 como LOX-2 se componen de una única cadena polipeptídica.

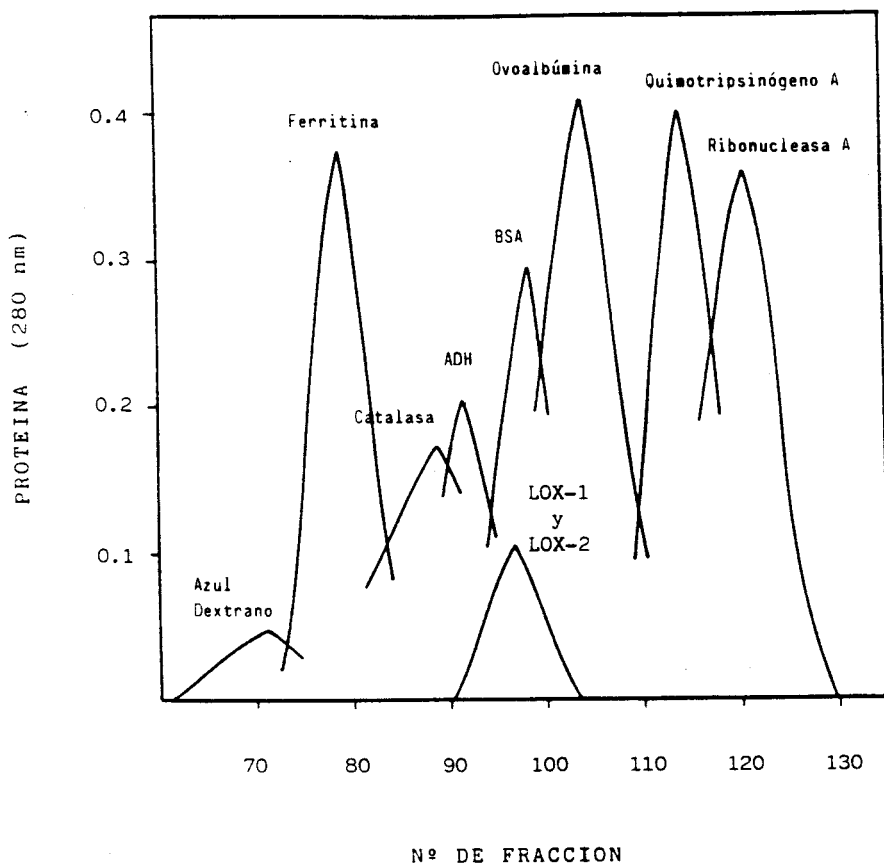


Figura 21.- Elución de LOX-1, LOX-2 y patrones para la determinación del tamaño molecular de los isoenzimas por filtración en gel Sephacryl S-300. La elución se llevó a cabo con tampón fosfato sódico 50mM, NaCl 0.1M, pH 7.5. El flujo se estableció en 8.25 ml/h y las fracciones recogidas eran de 2.75 ml.

Tabla VI.- Resultados para la determinación del peso molecular y radio hidrodinámico de LOX-1 y LOX-2 mediante filtración en gel.

Macromolécula	V elución (ml)	PM (Da)	K_{av}	R. Stokes (Å)	$(-\log K_{av})^{1/2}$
Azul dextrano	195.25	2000000	-	-	-
Ferritina	216.97	440000	0.094	61.0	1.013
Catalasa	343.92	232000	0.211	52.2	0.822
ADH	252.17	148000	0.247	46.0	0.779
BSA	271.15	67000	0.329	35.5	0.695
Ovoalbúmina	286.55	43000	0.396	30.5	0.634
Quimotripsinógeno A	314.05	25000	0.515	20.9	0.537
Ribonucleasa A	332.2	13700	0.593	16.4	0.476
LOX-1 y LOX-2	266.34	96336	0.308	38.1	0.715

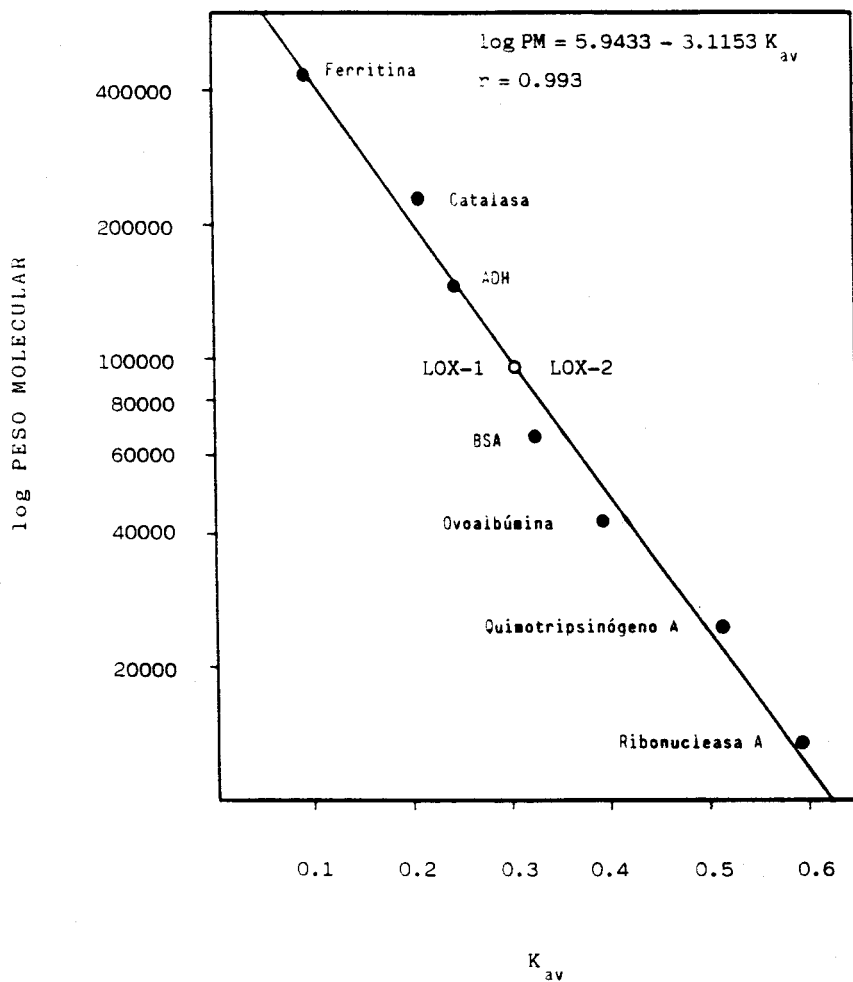


Figura 22.- Determinación del peso molecular de los isoenzimas de lipoxigenasa por filtración en gel Sephacryl S-300.

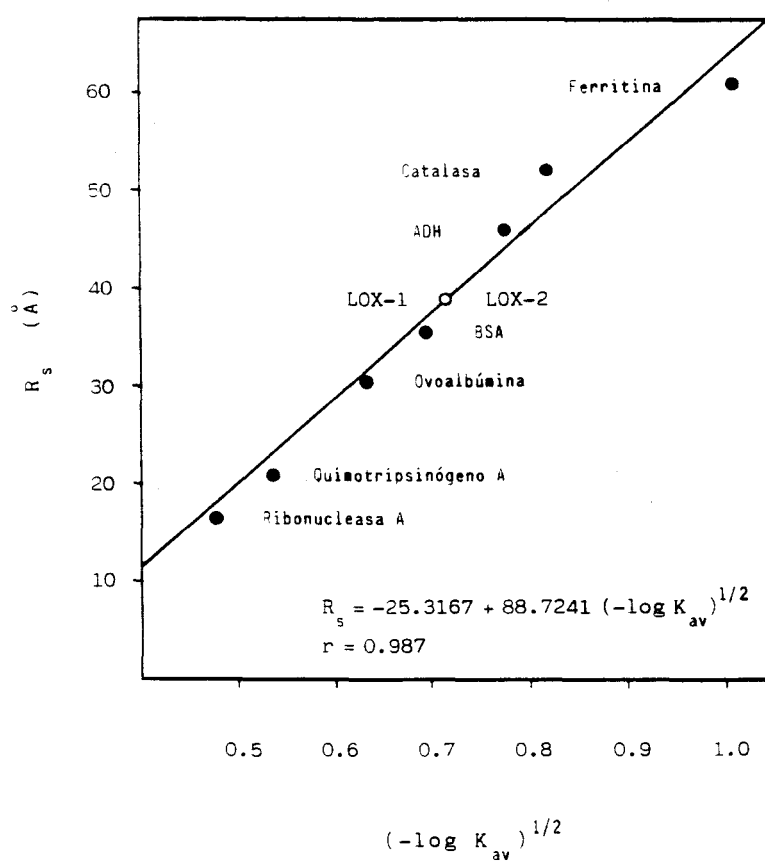


Figura 23.- Determinación del radio hidrodinámico de los isoenzimas de lipoxigenasa por filtración en gel Sephacryl S-300.

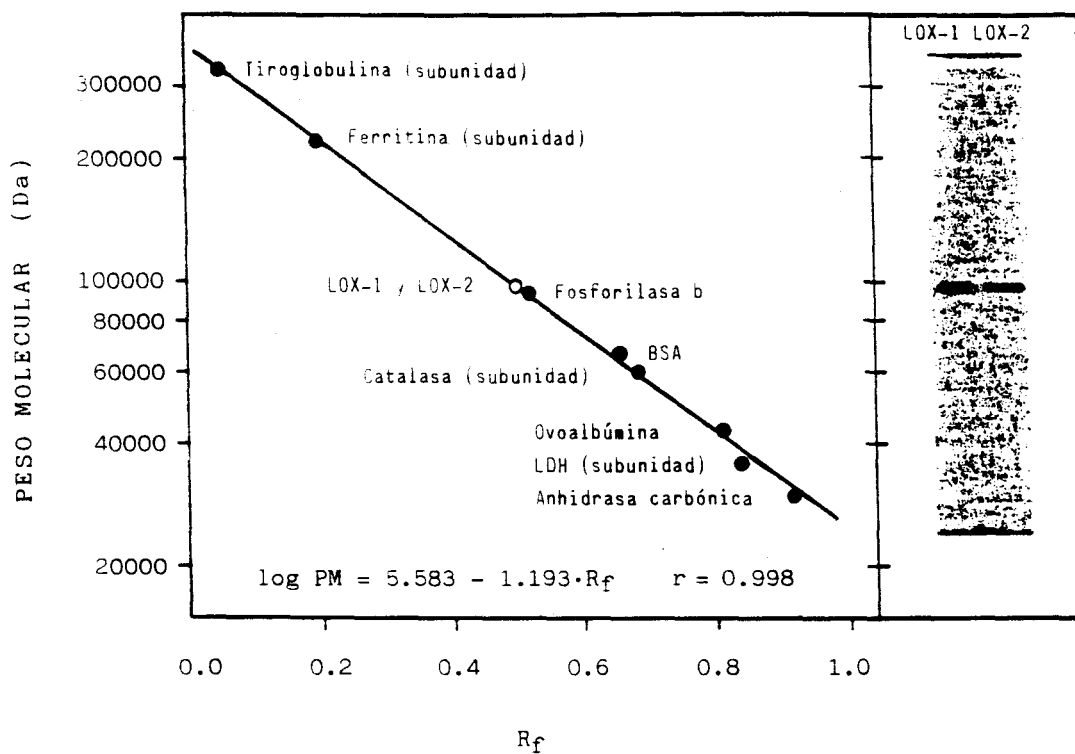


Figura 24.- Determinación del peso molecular de los isoenzimas de lipoxigenasa por electroforesis en gradiente de poliacrilamida 7-20% y SDS.

III.3. Determinación del punto isoelectrico

El cálculo de los puntos isoelectricos para los isoenzimas de LOX de garbanzo se llevó a cabo mediante cromatoenfoco, haciendo uso de un sistema de FPLC con columna Mono P HR 5/20, tal como se describe en Materiales y Métodos. Dentro del intervalo de pH 3.90-6.35, se calculan unos valores de punto isoelectrico para LOX-1 y LOX-2 de 4.92 y 4.74 respectivamente (Fig. 25).

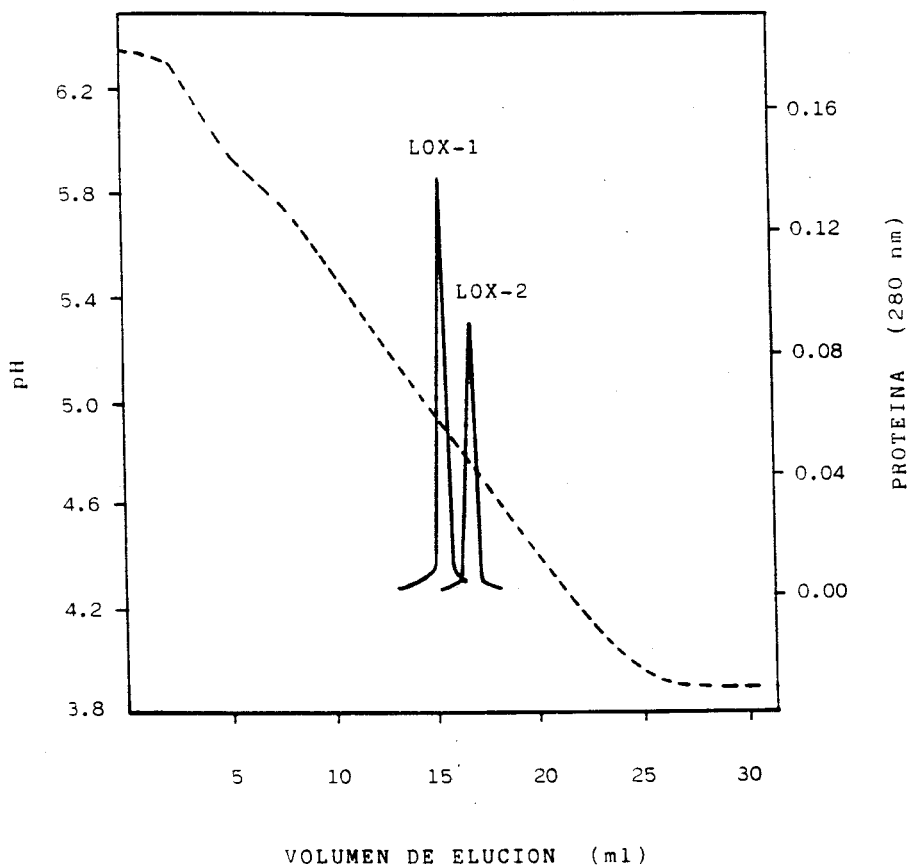


Figura 25.- Determinación del punto isoelectrico de los isoenzimas LOX-1 y LOX-2 por cromatoenfoco en un sistema FPLC con columna Mono P HR 5/20.

IV. PROPIEDADES ESTRUCTURALES

IV.1. Composición en aminoácidos

La composición en aminoácidos de LOX-1 y LOX-2 es mostrada en la Tabla VII. LOX-1 contiene un total de 760 residuos de aminoácidos por molécula mientras que para LOX-2 se han calculado 753 residuos. Se observa un alto contenido de residuos hidrofóbicos para ambos isoenzimas, alrededor del 50%. Existe una gran similitud en cuanto al número de cada uno de los aminoácidos que entran a formar parte de ambas proteínas, excepto para la prolina, que presenta un elevado valor en el caso de LOX-2, con 27 residuos más que LOX-1.

La determinación de los residuos de L-cisteína totales (Cavallini *et al.*, 1966) y libres (Ellman, 1959) da lugar a los siguientes resultados para ambos isoenzimas:

<u>Isoenzima</u>	<u>L-cys totales</u>	<u>L-cys libres</u>	<u>Puentes disulfuro</u>
LOX-1	8	2	3
LOX-2	7	3	2

A partir de su composición en aminoácidos se calcula un peso molecular mínimo para LOX-1 de 85725 Da y de 84313 Da para LOX-2.

IV.2. Determinación de hierro

Haciendo uso de la técnica de absorción atómica se ha comprobado la presencia de un átomo de hierro por molécula de proteína tanto para LOX-1 como LOX-2. Los valores resultantes son media de los obtenidos por dos métodos diferentes, la obtención de una recta de calibrado previa de FeCl_3 y por adición estándar de disoluciones conocidas de esta sal a las muestras proteicas. Los valores experimentales obtenidos fueron 1.170 Fe/molécula LOX-1 y 0.835 Fe/molécula LOX-2.

Tabla VII.- Composición en aminoácidos de los isoenzimas de lipoxigenasa de garbanzo.

Aminoácido	LOX-1	LOX-2
Asp	70	62
Glu	69	64
Ser	48	43
Gly	51	44
His	32	35
Arg	27	24
Thr	33	29
Ala	29	23
Pro	90	117
Tyr	25	26
Val	46	48
Met	14	19
Cys	8	7
Ile	34	33
Leu	89	96
Phe	27	23
Lys	51	46
Trp	17	14
Total	760	753

IV.3. Estado de oxidación del átomo de hierro

Según describió Vliegenthart *et al.* (1982), el estado de oxidación del hierro en las moléculas de LOX alterna entre Fe(II) y Fe(III) durante la reacción enzimática, predominando el estado divalente en la forma nativa.

Se realizaron incubaciones de alícuotas de 200 μ l de ambos isoenzimas a 0-4°C con diferentes reactivos complejantes de hierro a fin de determinar su estado de oxidación. La incubación de LOX-1 y LOX-2 con NaSCN, potente y específico agente complejante de Fe³⁺, durante 24 h a concentraciones tan altas como 175mM, no dio lugar a inactivación de las proteínas. En cambio, incubaciones de ambos isoenzimas con ditizona, compuesto quelante específico para Fe²⁺, provocaron la inactivación enzimática a lo largo del tiempo de incubación como vemos en la Figura 26. Esta inactivación fue mayor en el caso de LOX-2, perdiendo un 80% de la actividad enzimática a las 24 h de incubación con ditizona 1mM, mientras que LOX-1 perdía un 50% en las mismas condiciones. Otro reactivo quelante de Fe²⁺ es la *o*-fenantrolina. Las incubaciones de LOX-1 y LOX-2 con distintas concentraciones de *o*-fenantrolina dio como resultado que LOX-2 perdiera alrededor del 80% de su actividad enzimática a las 24 h de incubación a una concentración de este compuesto de 25mM (Fig. 27). LOX-1, en cambio, no vio afectada su capacidad catalítica en las mismas condiciones. La diferencia entre los efectos de la ditizona y *o*-fenantrolina podría estribar en una menor accesibilidad de este último compuesto en ambas proteínas.

De los resultados obtenidos se deduce que el átomo de hierro, tanto en LOX-1 como en LOX-2, presenta un estado de oxidación divalente en la forma nativa de las proteínas.



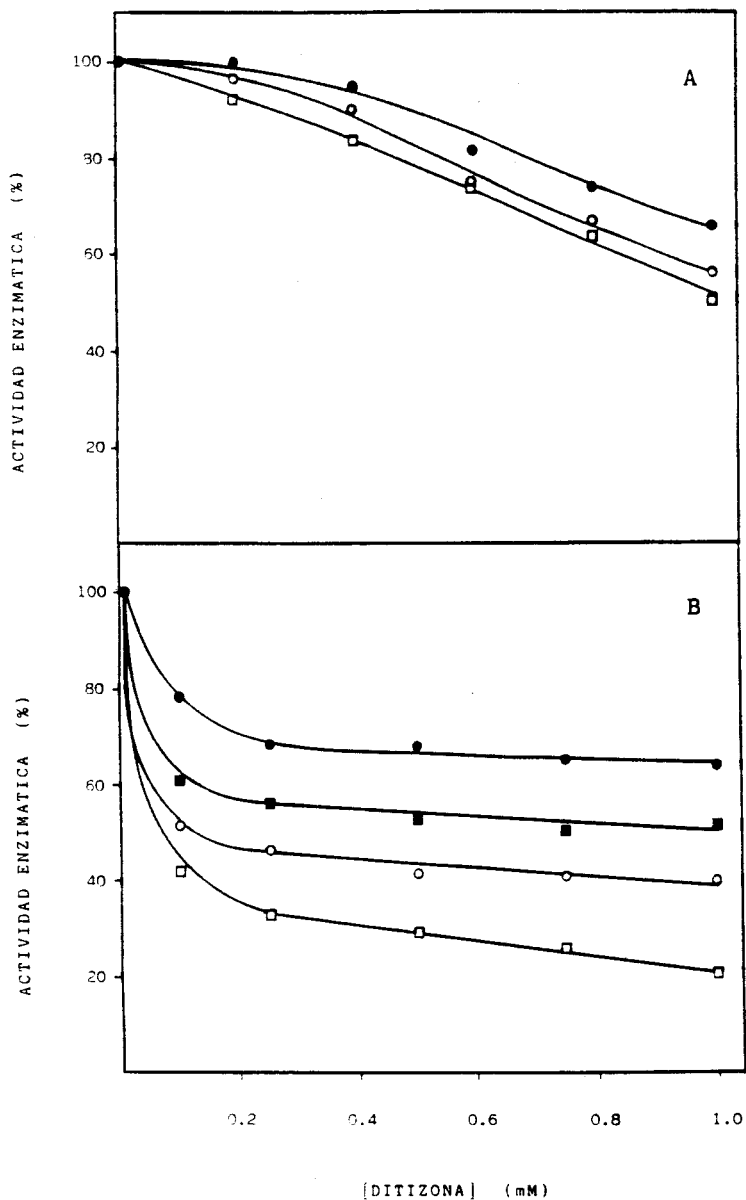


Figura 26.- Efecto de la ditizona sobre la actividad lipoxigenasa de LOX-1 (A) y LOX-2 (B). Alícuotas de 200 μ l de ambas isoenzimas fueron incubadas 0-4°C con distintas concentraciones de ditizona, midiéndose la actividad enzimática a diferentes tiempos:

(●) 30 min; (■) 2 h; (○) 6 h; (□) 24 h.

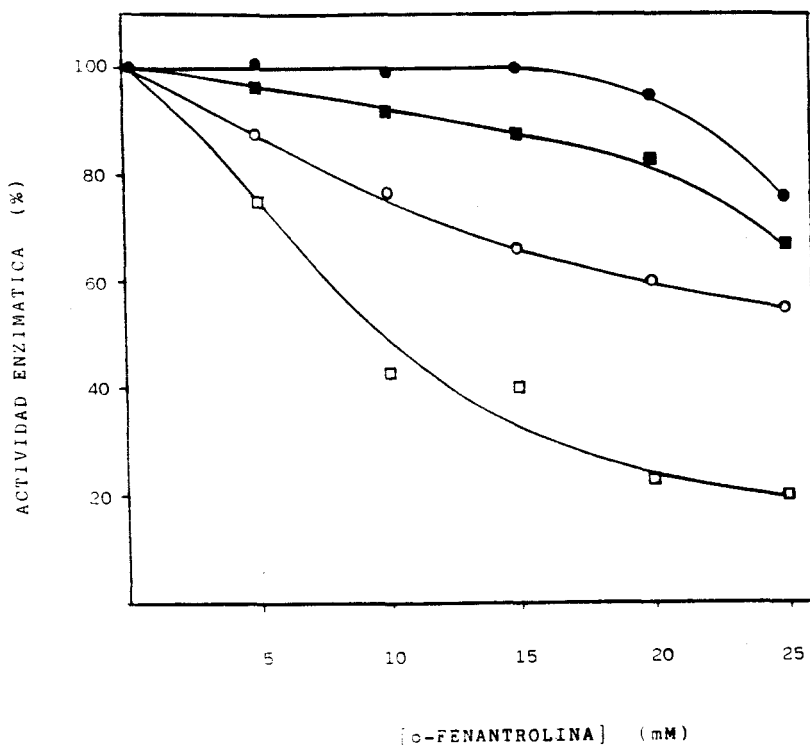


Figura 27.- Efecto de la o-fenantrolina sobre la actividad lipoxigenasa de LOX-2. Alícuotas de 200 μ l de LOX-2 fueron incubadas a 0-4°C con distintas concentraciones de o-fenantrolina, midiéndose la actividad enzimática a diferentes tiempos: (●) 30 min; (■) 2 h; (○) 6 h; (□) 24 h.

IV.4. Estudio de grupos esenciales para la actividad lipoxigenasa

IV.4.1. Puentes disulfuro

La implicación que tienen los puentes disulfuro de un enzima en mantener la conformación enzimática activa se puede conocer haciendo uso de reductores que provoquen la reducción y por tanto rotura de dichos puentes. En este sentido se realizaron incubaciones de LOX-1 y LOX-2 (alícuotas de 200 μ l) con diferentes concentraciones de DTT y

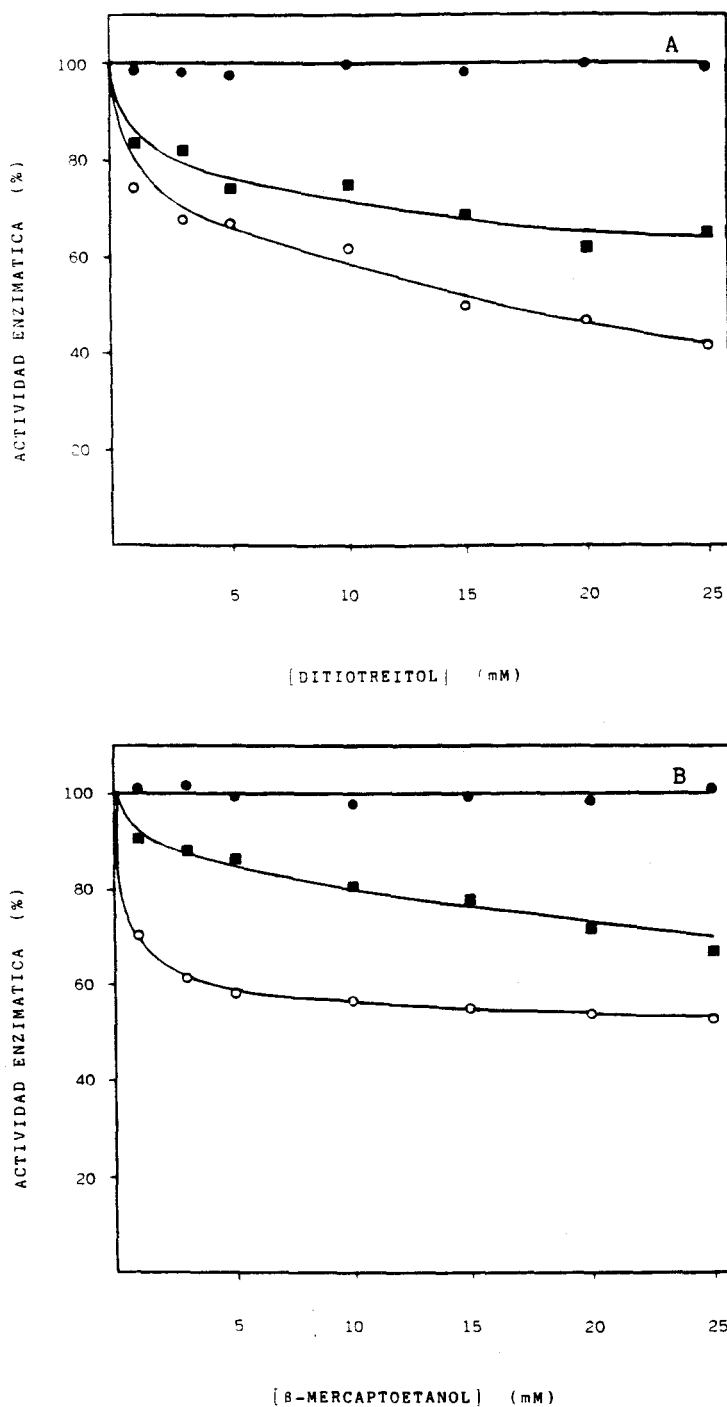


Figura 28.- Efecto del DTT (A) y β -mercaptoetanol (B) sobre la actividad lipoxigenasa de LOX-1. Alícuotas de 200 μ l fueron incubadas a 0-4°C con distintas concentraciones de ambos reactivos, midiéndose la actividad enzimática a diferentes tiempos: (●) 2 h; (■) 13 h; (○) 24 h.

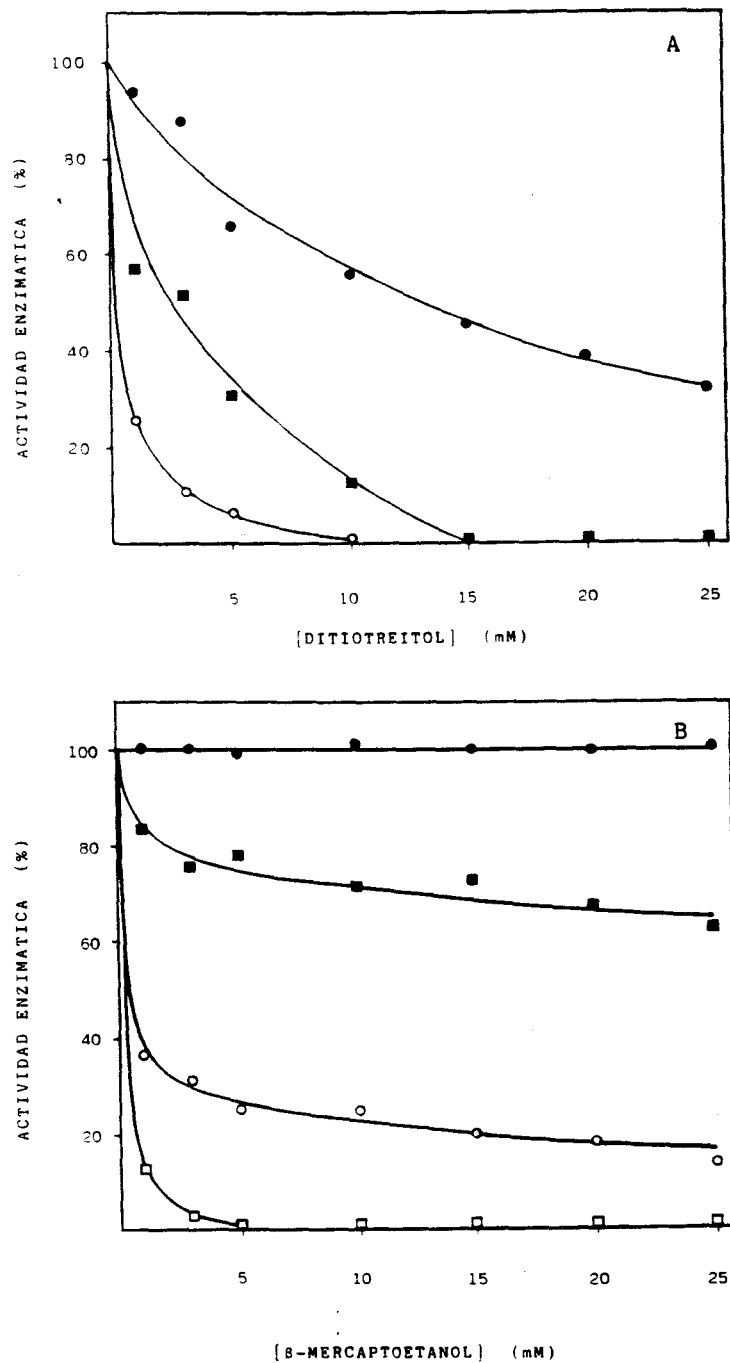


Figura 29.- Efecto del DTT (A) y β -mercaptoetanol (B) sobre la actividad lipoxigenasa de LOX-2. Alícuotas de 200 μ l fueron incubadas a 0-4°C con distintas concentraciones de ambos reactivos, midiéndose la actividad enzimática a diferentes tiempos:

(●) 30 min; (■) 2 h; (○) 13 h; (□) 24 h.

β -mercaptoetanol, conocidos compuestos capaces de romper estos enlaces disulfuro.

Las incubaciones con DTT y β -mercaptoetanol de ambos isoenzimas provocaron una desactivación enzimática, siempre mayor en el caso de LOX-2. Estos reductores tienen prácticamente el mismo efecto sobre LOX-1, mostrándose algo más potente el DTT, de forma que a las 24 h de incubación en una concentración de 25mM, LOX-1 era desactivada enzimáticamente en aproximadamente un 60%, mientras que con el uso de β -mercaptoetanol, la pérdida de actividad es del orden de del 50% en las mismas condiciones (Fig. 28). LOX-2 es bastante inestable en presencia de DTT, siendo anulada su capacidad catalítica para concentraciones de 10mM a las 13 h de incubación, mientras que con β -mercaptoetanol, en las mismas condiciones, aún conserva un 25% de la actividad enzimática (Fig. 29).

IV.4.2. Grupos sulfhidrilo

Se estudió el efecto que tienen reactivos específicos de grupos sulfhidrilo sobre la actividad enzimática de LOX-1 y LOX-2. Estos compuestos reaccionan covalentemente con dichos grupos, modificando la estructura proteica, siendo mayor el efecto cuanto más participa el grupo tiólico en el sitio activo del enzima.

Incubaciones de LOX-1 y LOX-2 (200 μ l) a 0-4°C durante 24 h con MMTS y NEM en concentración de 25mM no provocaron inactivación enzimática en ninguno de los dos isoenzimas. Por el contrario, la utilización de IAA en las incubaciones provocaba una pérdida de aproximadamente un 75% de la actividad enzimática de LOX-2 para concentraciones de 25mM (Fig. 30), no afectando este compuesto la actividad enzimática de LOX-1 cuando se utiliza la misma concentración.

El *p*-HMB es un compuesto que presenta una alta reactividad con los grupos sulfhidrilo. Incubaciones con este reactivo provocan la inactivación parcial de la actividad enzimática de LOX-1 y LOX-2. Como en

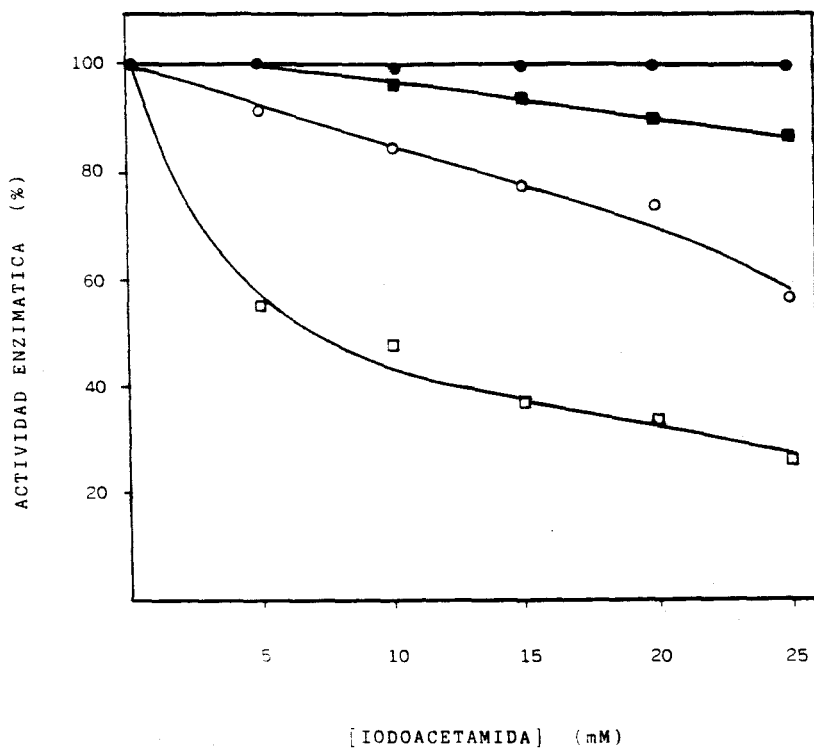


Figura 30.- Efecto del IAA sobre la actividad lipoxigenasa de LOX-2. Alícuotas de 200 μ l fueron incubadas a 0-4°C con distintas concentraciones de IAA, midiéndose la actividad enzimática a diferentes tiempos:
(●) 30 min; (■) 2 h; (○) 6 h; (□) 24 h.

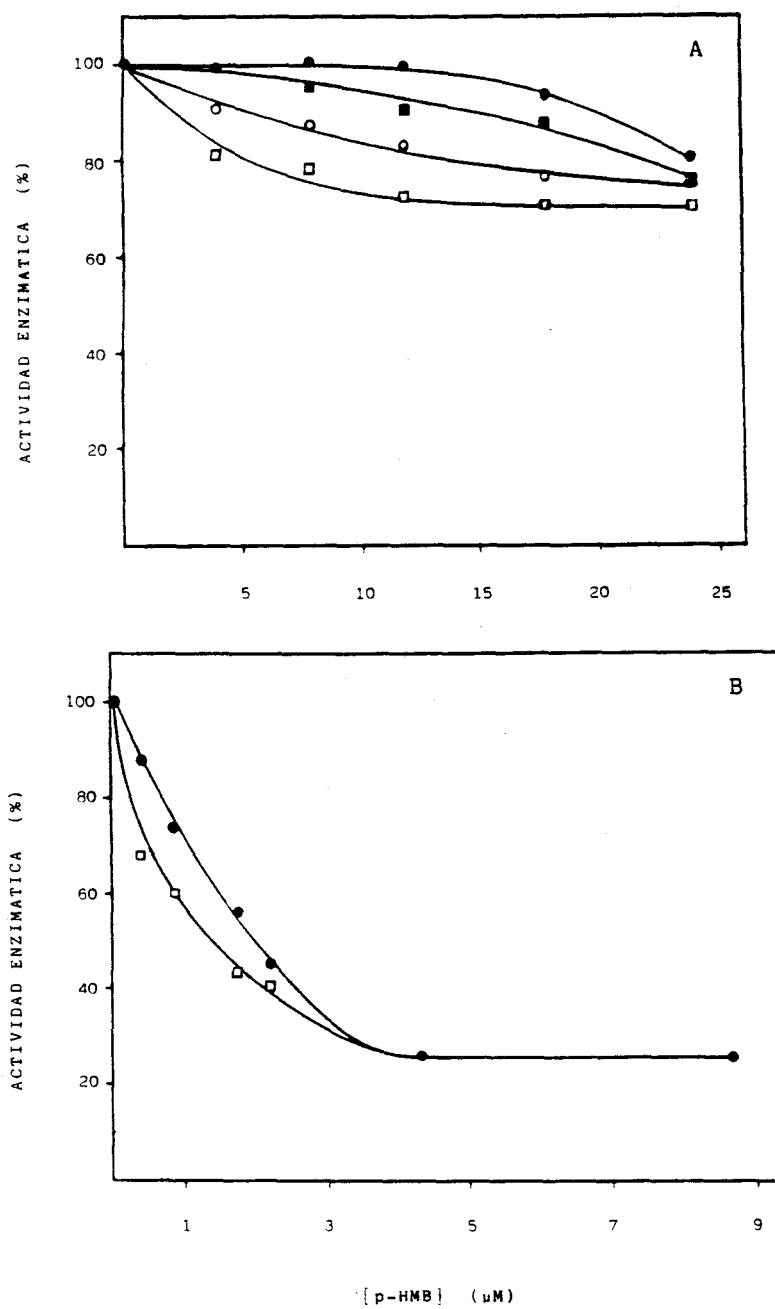


Figura 31.- Efecto del p-HMB sobre la actividad lipoxigenasa de LOX-1 (A) y LOX-2 (B). Alícuotas de 200 μ l de ambos isoenzimas fueron incubadas a 0-4°C con distintas concentraciones de p-HMB, midiéndose la actividad enzimática a diferentes tiempos: (●) 30 min; (■) 2 h; (○) 6 h; (□) 24 h.

el caso de la incubación con IAA, es el enzima LOX-2 el que se ve más afectado por el *p*-HMB. Así, a concentraciones de 4 μ M, la actividad enzimática queda rápidamente reducida a un 25%, manteniendo este valor independientemente del uso de concentraciones mayores de este compuesto y del tiempo de incubación empleado. LOX-1 muestra una mayor resistencia al *p*-HMB, de forma que en concentraciones de 15 μ M y superiores pierde un 30% de la actividad enzimática, siendo este valor constante, al igual que antes, independientemente de la concentración de *p*-HMB y del tiempo de incubación empleado como se muestra en la Figura 31.

IV.4.3. Grupos amino

La Figura 32 muestra el efecto del TNBS sobre la actividad enzimática de LOX-1 y LOX-2. Este compuesto reacciona con los grupos amino de los aminoácidos básicos.

El TNBS provoca la pérdida prácticamente total de la actividad enzimática de LOX-2 a las 24 h de incubación en una concentración de 5mM. LOX-1 pierde tan solo un 30% de su actividad cuando es incubado en una concentración de TNBS 20mM durante 24 h.

IV.4.4. Grupos carboxilo

El EDC es un compuesto que reacciona con los grupos carboxílicos de los aminoácidos ácidos de las proteínas. Para ello, necesita la presencia de GEE que actúa como agente condensante.

Las incubaciones de ambos isoenzimas de LOX de garbanzo con EDC (GEE 0.5M) es mostrado en la Figura 33. Como ocurría en el caso de los grupos amino, la actividad enzimática de LOX-2 es la más afectada en estas incubaciones. En 24 h y una concentración 5mM, la actividad enzimática de LOX-2 es prácticamente perdida, mientras que LOX-1 conserva aproximadamente un 80% de su actividad en las mismas condiciones.

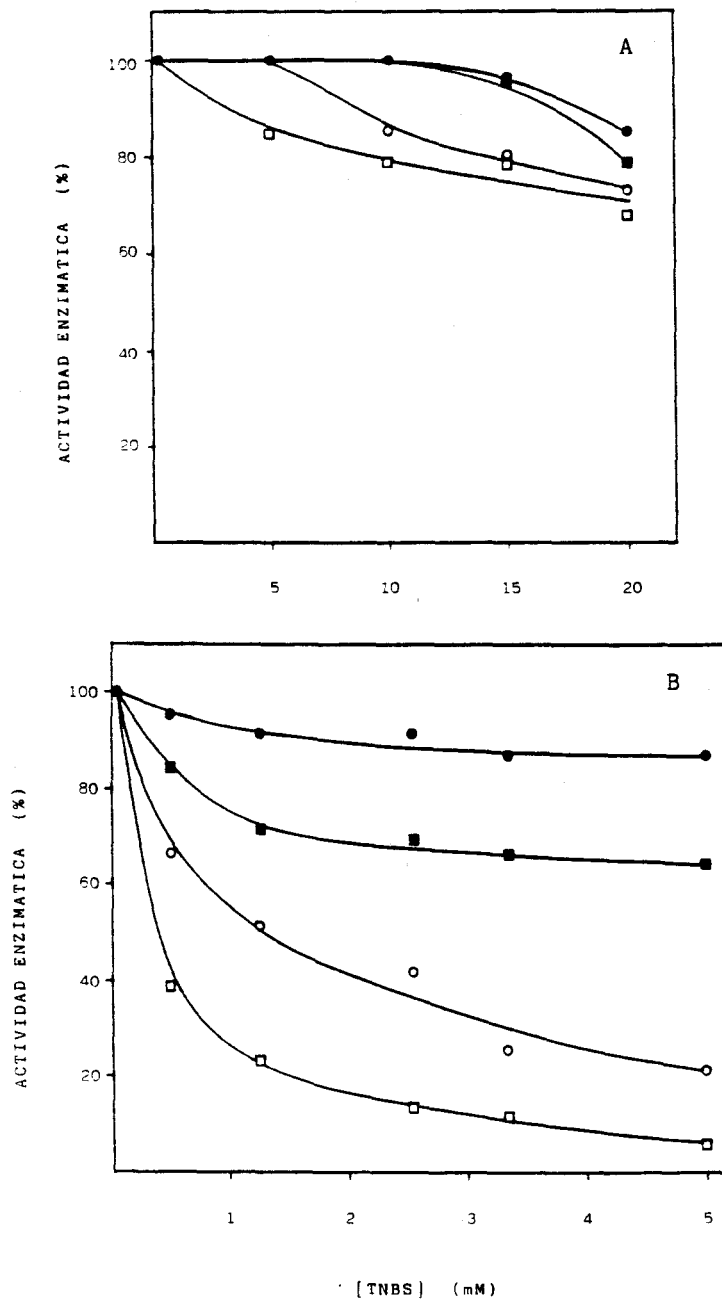


Figura 32.- Efecto del TNBS sobre la actividad lipoxigenasa de LOX-1 (A) y LOX-2 (B). Alícuotas de 200 μ l de ambos isoenzimas fueron incubadas a 0-4°C con distintas concentraciones de TNBS, midiéndose la actividad enzimática a diferentes tiempos: (●) 30 min; (■) 2 h; (○) 6 h; (□) 24 h.

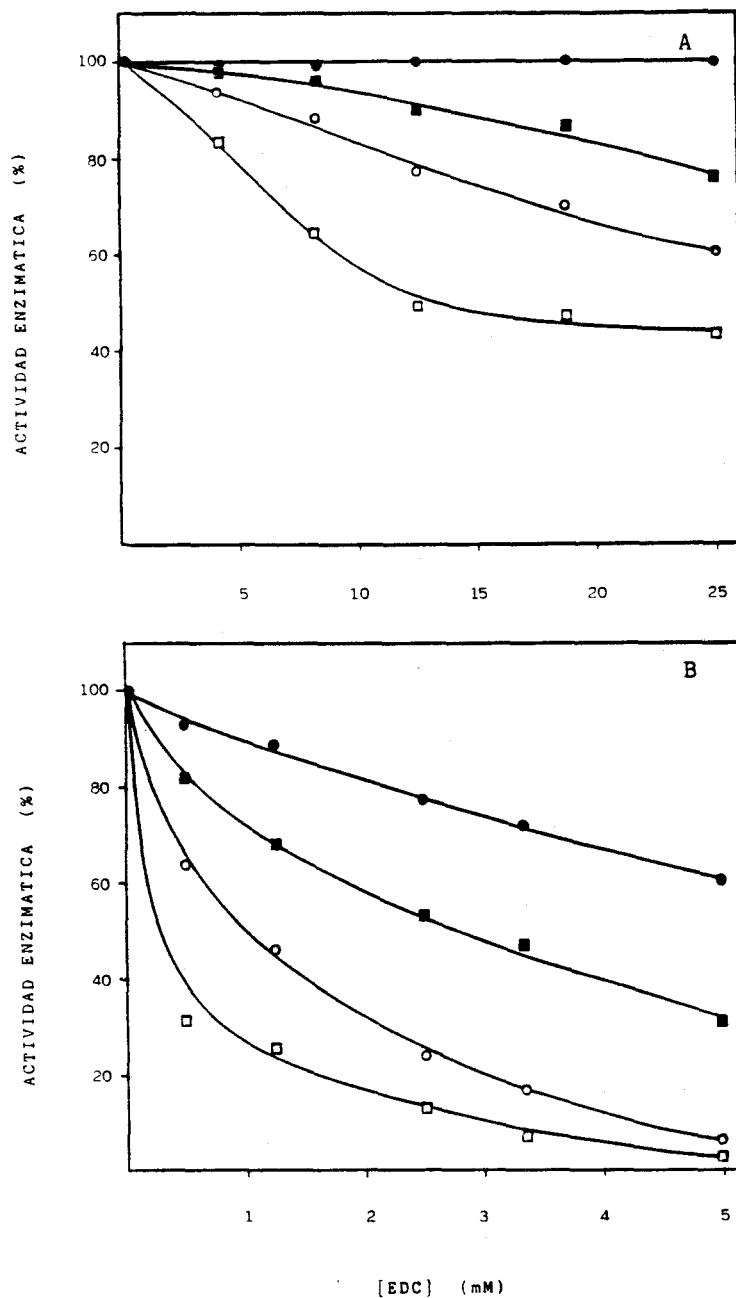


Figura 33.- Efecto del EDC sobre la actividad lipoxigenasa de LOX-1 (A) y LOX-2 (B). Alícuotas de 200 μ l de ambos isoenzimas fueron incubadas a 0-4°C con GEE 0.5M y distintas concentraciones de EDC, midiéndose la actividad enzimática a diferentes tiempos: (●) 30 min; (■) 2 h; (○) 6 h; (□) 24 h.

V. COOXIDACION DE PIGMENTOS

El blanqueamiento de pigmentos a través de una reacción de cooxidación fue el primer hecho conocido de LOX, y fue registrado como patente para la decoloración de harinas por Haas y Bohn (1934). Posteriormente se comprobó que los distintos isoenzimas de LOX diferían en sus potenciales de cooxidación, sirviendo ésto como parámetro distintivo entre ellos (Galliard y Chan, 1980).

La clorofila y el β -caroteno son los pigmentos más ampliamente utilizados para el estudio de la cooxidación por LOX. Los isoenzimas de LOX de garbanzo cooxidan, en distinto grado, tanto β -caroteno como retinol, no teniendo efecto alguno sobre las clorofilas. Esto podría ser explicado en base a la diferencia existente entre los mecanismos de cooxidación de los distintos pigmentos como ya describieron Hildebrand y Hymowitz (1982).

V.1. Cooxidación de β -caroteno

En las Figuras 34 y 35 se muestra el efecto que tienen diferentes concentraciones de los isoenzimas de LOX de garbanzo sobre la cooxidación de β -caroteno, midiendo el descenso de absorbancia a 460 nm. Esta longitud de onda es el máximo de absorción de este compuesto, presentando en las condiciones de la experiencia un coeficiente de extinción molar de $102150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se observa que el β -caroteno no sufre reacciones de autooxidación durante el tiempo de la reacción enzimática (10 min) como lo demuestra la estabilidad de la absorbancia a 460 nm de la mezcla de reacción en ausencia de cualquiera de los isoenzimas. LOX-1 presenta un mayor poder cooxidador de β -caroteno que LOX-2, entre 7 y 8 veces superior. Las cinéticas de formación de hidroperóxidos (234 nm) muestran un periodo de inducción que no es observado en las reacciones enzimáticas de hidroperoxidación del ácido linoleico en ausencia de β -caroteno. Esto podría ser debido al desvío de forma inmediata de los radicales o poder

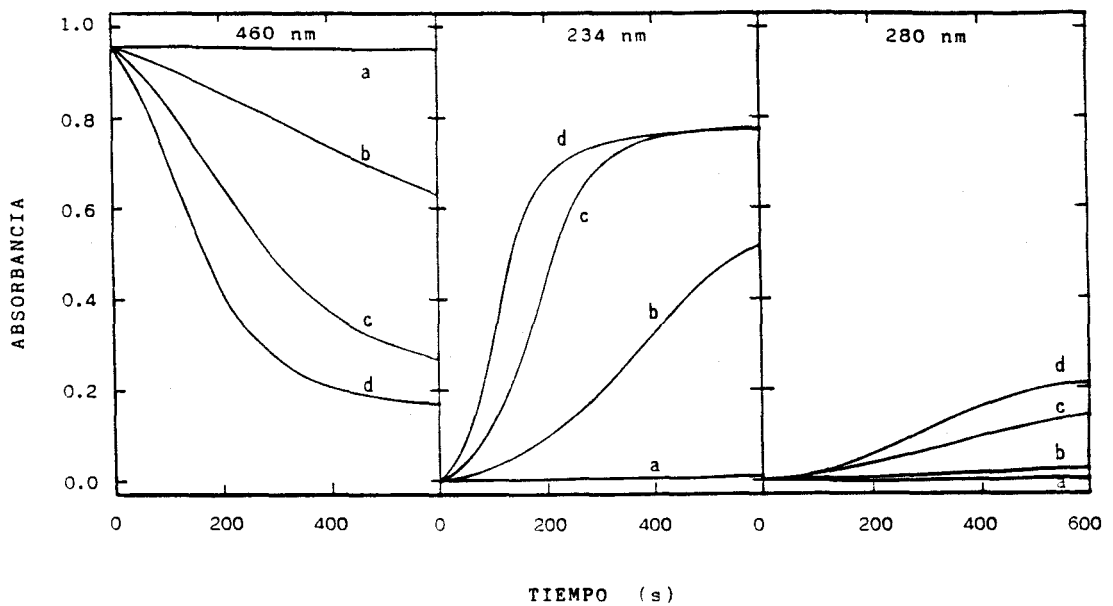


Figura 34.- Cinéticas de cooxidación de β -caroteno (460 nm), formación de hidroperóxidos (234 nm) y cetodienos (280 nm) con distintas cantidades de LOX-1: (a) -; (b) 0.338 μ g; (c) 1.014 μ g; (d) 1.690 μ g.

oxidante formados en la reacción hacia la cooxidación del pigmento. La formación de cetodienos también presenta un periodo de inducción como ocurre en ausencia del pigmento, pero en presencia de β -caroteno este periodo de inducción se hace más largo.

Ramadoss *et al.* (1978) demostraron un efecto sinergista en la cooxidación de pigmentos por parte de dos isoenzimas de LOX de soja. El seguimiento del descenso de absorbancia a 460 nm después de añadir al sustrato conjuntamente 1.014 μ g de LOX-1 y 0.750 μ g de LOX-2 no dio lugar a un aumento significativo de la cooxidación de β -caroteno. Esto implicaría la no existencia de una acción sinergista entre los isoenzimas de lipoxigenasa de garbanzo.

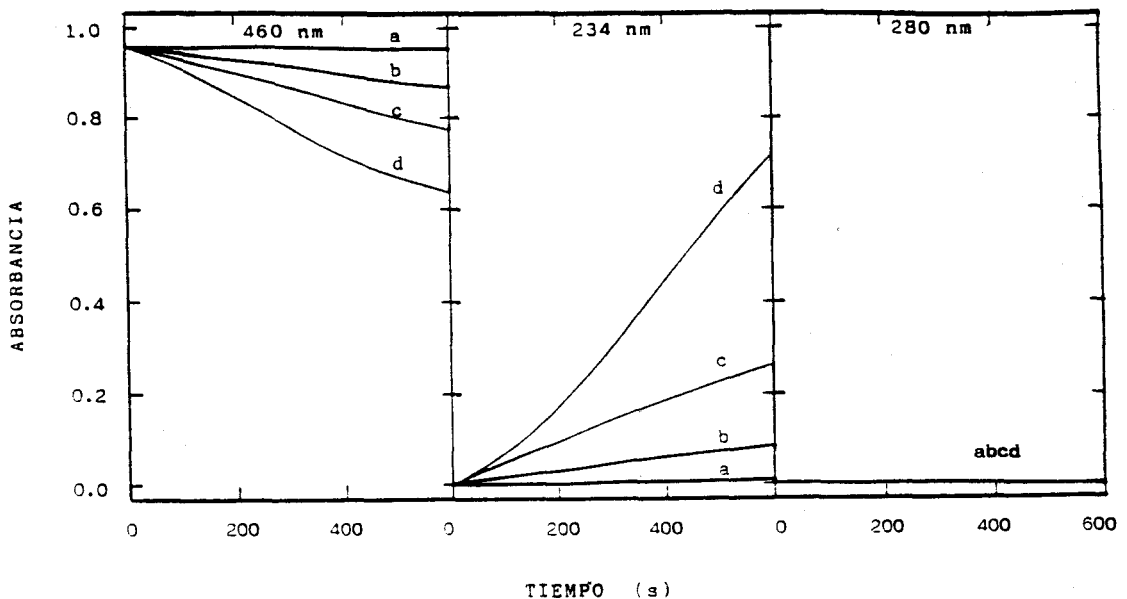


Figura 35.- Cinéticas de cooxidación de β -caroteno (460 nm), formación de hidroperóxidos (234 nm) y cetodienes (280 nm) con distintas cantidades de LOX-2: (a) -; (b) 0.75 μ g; (c) 1.25 μ g; (d) 3.75 μ g.

La acción de LOX sobre β -caroteno necesita la presencia de ácido linoleico para que se produzca la reacción de cooxidación como queda demostrado en la Figura 36. En ésta se puede comprobar que, independientemente del incremento en la decoloración de β -caroteno que se produce al aumentar la concentración de ácido linoleico, a concentraciones de ácido superiores a 1.25mM se constata una inhibición por sustrato de la formación de hidroperóxidos (234 nm) que afecta también, aunque en menor medida, a la producción de cetodienes (280 nm). Se demuestra también que el β -caroteno inhibe la producción de hidroperóxidos, tanto por LOX-1 como por LOX-2 (Fig. 37), sugiriendo que la molécula de β -caroteno bloquea el sitio catalítico principal de los isoenzimas impidiendo que tenga lugar la reacción de hidroperoxidación del ácido linoleico y la de cooxidación.

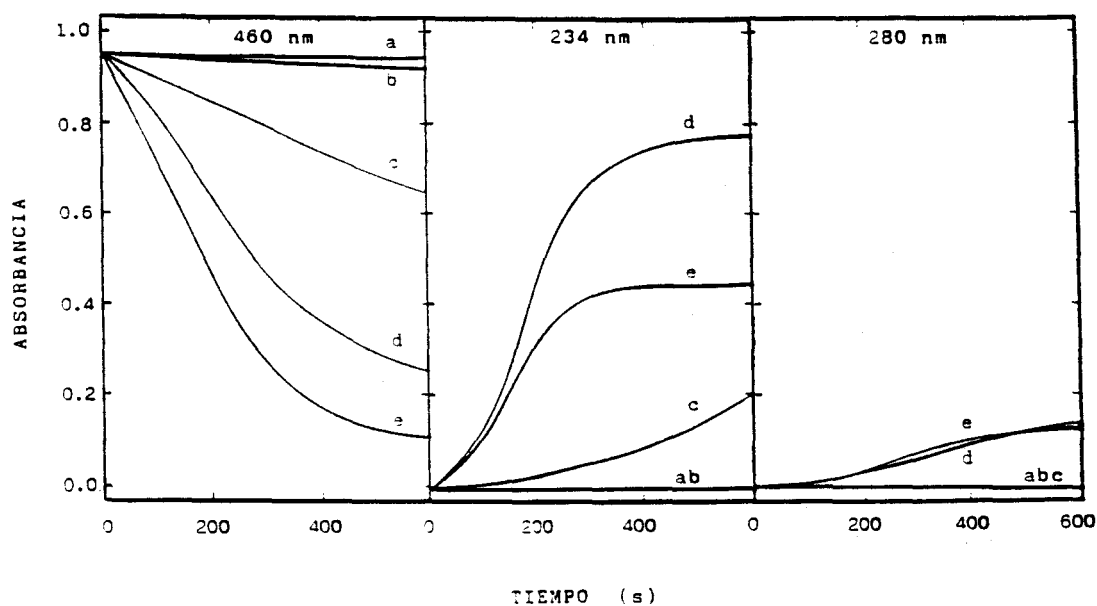


Figura 36.- Efecto del ácido linoleico sobre las cinéticas de cooxidación de β -caroteno (460 nm), formación de hidroperóxidos (234 nm) y cetodienos (280 nm) por LOX-1. La mezcla de reacción contenía 1.014 μ g de LOX-1, β -caroteno 9.3 μ M y diferentes concentraciones de ácido linoleico:
(a) -; (b) 0.25mM; (c) 0.75mM; (d) 1.25mM; (e) 1.75mM.

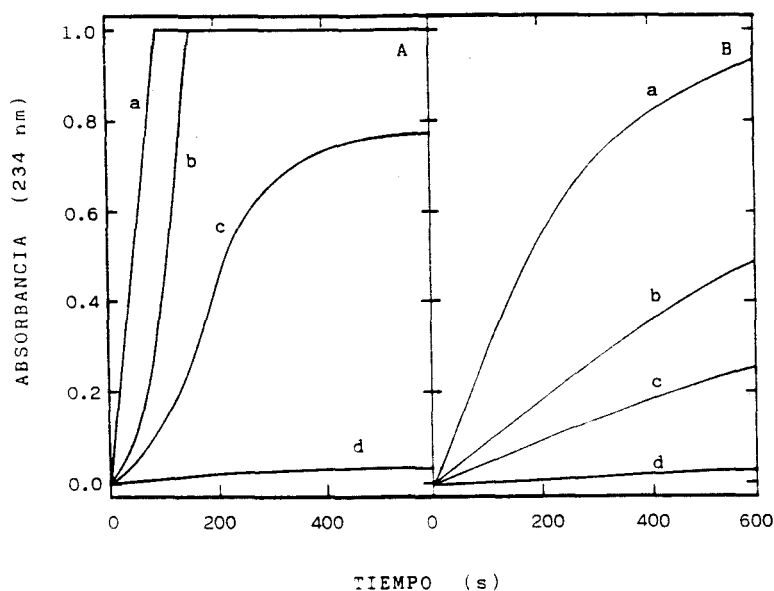


Figura 37.- Efecto del β -caroteno sobre las cinéticas de formación de hidroperóxidos por LOX-1 (A) y LOX-2 (B). La mezcla de reacción contenía 1.014 μg de LOX-1 ó 1.25 μg de LOX-2, ácido linoleico 1.25mM y diferentes concentraciones de β -caroteno:
(a) -; (b) 4.65 μM ; (c) 9.30 μM ; (d) 13.95 μM .

V.2. Cooxidación de acetato de retinol

La vitamina A o retinol sirve también como sustrato para la reacción de cooxidación de los isoenzimas de LOX de garbanzo (Fig. 38 y 39). El sustrato para la reacción de cooxidación contenía acetato de retinol 23.2 μM y ácido linoleico 1.25mM tal como se describe en Materiales y Métodos, presentando la mezcla un coeficiente de extinción molar a 330 nm de 34483 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Las cinéticas de cooxidación del acetato de retinol fueron

llevadas a cabo por seguimiento del descenso de absorbancia a 330 nm. Estas cinéticas guardan una gran similitud con las que se obtienen al utilizar β -caroteno como sustrato, pero con la diferencia de una mayor producción de hidroperóxidos. Esto podría ser debido a una menor inhibición de la producción de hidroperóxidos por parte del acetato retinol que por parte del β -caroteno, o a una menor necesidad de radicales por molécula de retinol para producir la cooxidación de éste, teniendo en cuenta que el retinol representa la mitad de la molécula de β -caroteno, con lo que la producción de hidroperóxidos neta sería mayor.

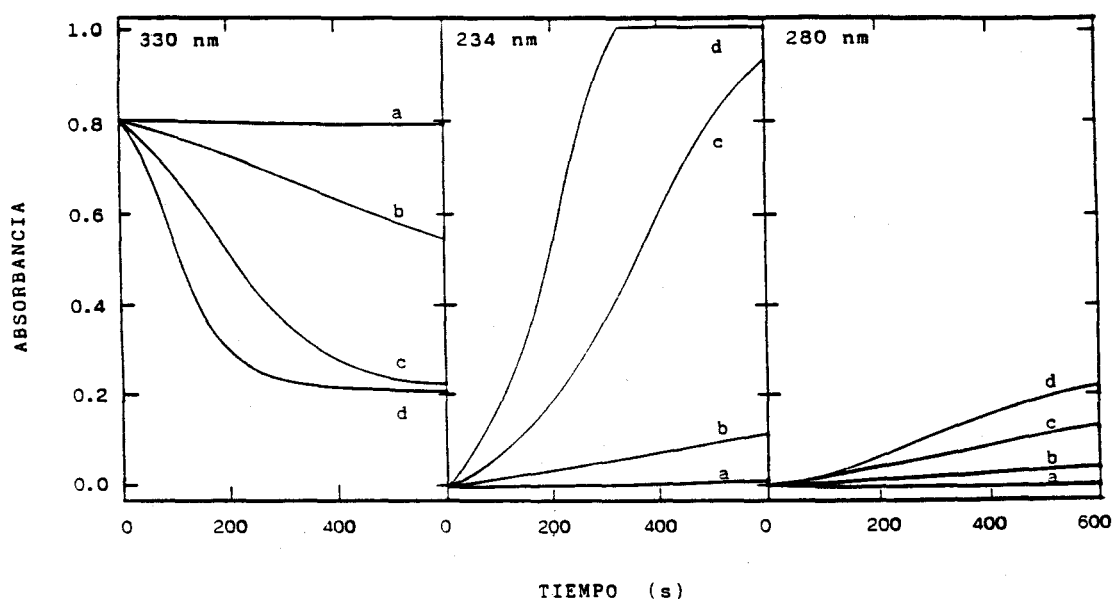


Figura 38.- Cinéticas de cooxidación de acetato de retinol (330 nm), formación de hidroperóxidos (234 nm) y cetodienes (280 nm) con distintas cantidades de LOX-1: (a) -; (b) 0.338 μ g; (c) 1.014 μ g; (d) 3.75 μ g.

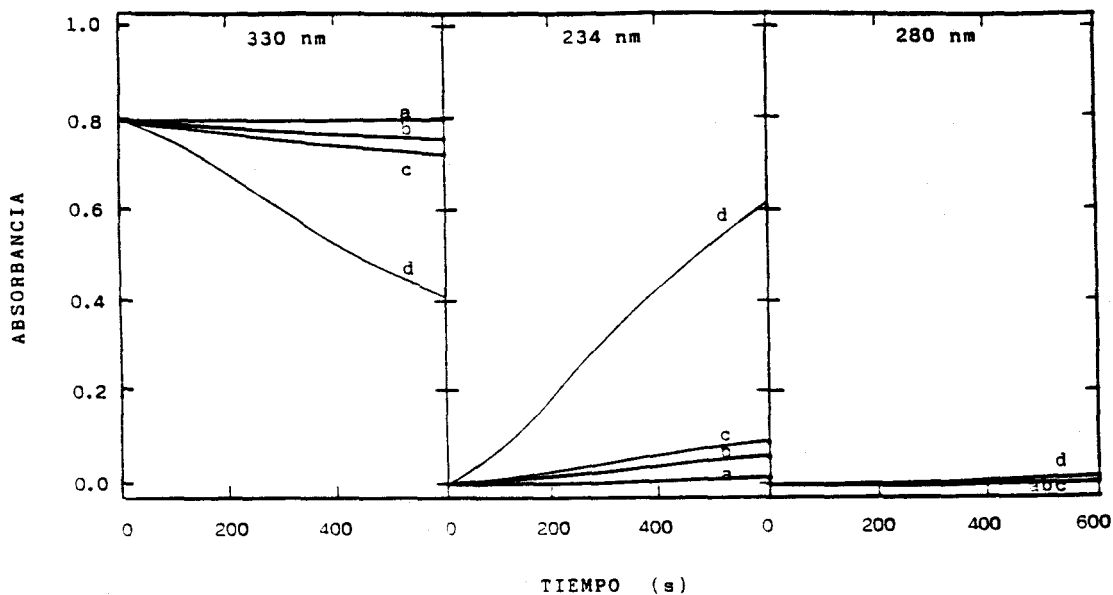


Figura 39.- Cinéticas de cooxidación del acetato de retinol (330 nm), formación de hidroperóxidos (234 nm) y cetodienos (280 nm) con distintas cantidades de LOX-2:
(a) -; (b) 0.75 μg ; (c) 1.25 μg ; (d) 3.75 μg .

VI. REGIOESPECIFICIDAD Y ESTEREOESPECIFICIDAD

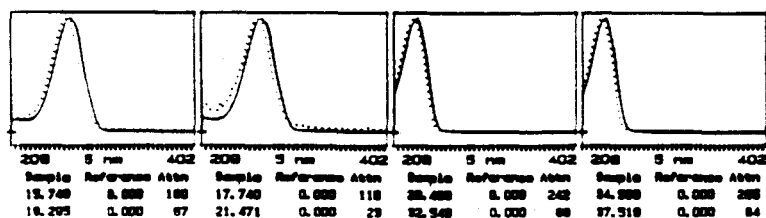
La mayoría de los isoenzimas de LOX son regioespecíficos y estereoespecíficos en el lugar de posicionamiento del oxígeno, aunque se encuentran también otros isoenzimas, como L-2 de soja, caracterizados por una menor regioespecificidad y estereoespecificidad dando lugar a mezclas racémicas de hidroperóxidos (Van Os *et al.*, 1979). Ambos tipos de enzimas se encuentran representados entre los isoenzimas de LOX de garbanzo.

VI.1. Productos de la reacción enzimática

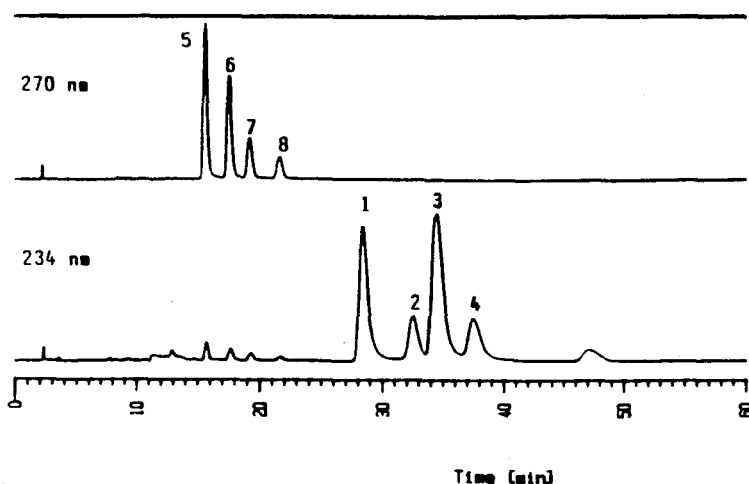
VI.1.1. Incubación con ácido linoleico

Como se ha visto en el apartado II.2. de esta sección, el ácido linoleico es el ácido poliinsaturado más activamente oxidado, tanto por LOX-1 como por LOX-2, utilizándose como sustrato para el estudio de los metabolitos producidos enzimáticamente por ambos isoenzimas.

Los metabolitos de la reacción enzimática de LOX-1 y LOX-2 se obtuvieron tras incubación de 50 μ moles de ácido linoleico con 0.6 ml de ambos isoenzimas, tal como se describe en Materiales y Métodos. Los productos de reacción después de ser metilados con diazometano, fueron analizados por HPLC. En la Figura 40 se recogen los cromatogramas de los productos de reacción, detectados simultáneamente a 234 nm y 270 nm. Cada uno de los isómeros estructurales de los hidroperóxidos fueron identificados con patrones de 13-LA00H y 9-LA00H preparados a partir de incubaciones de ácido linoleico con LOX de soja y patata respectivamente. Posteriormente se llevó a cabo su análisis por espectrometría de masas y espectrofotometría IR como veremos en apartados posteriores. LOX-2 se muestra como una LOX de alta regioespecificidad y estereoespecificidad, no formando prácticamente cetodienos. Por el contrario, LOX-1 es un enzima que presenta baja regioespecificidad y estereoespecificidad, teniendo una alta capacidad de formación de cetodienos, compuestos que podrían provenir



(A)

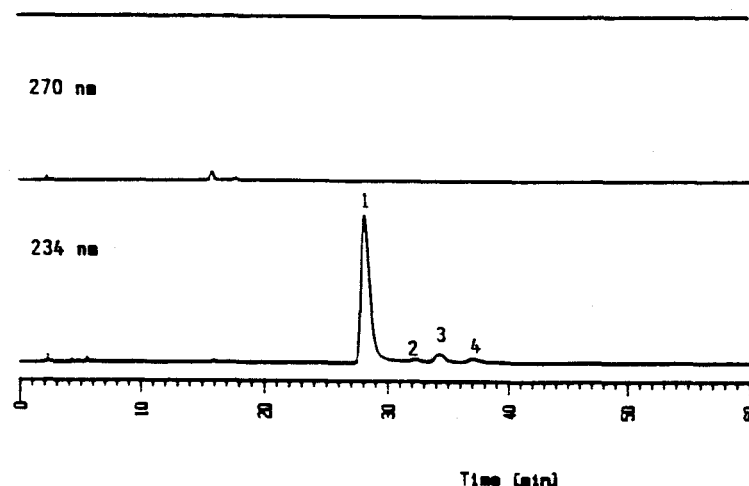


analisis **METABOLITOS-LINOLEICO**
 inj. vol. 5ul
 mobile ph. A: **HEXANO-92.0**
 .. B: **ETER ETILICO-8.0**
 .. **FLUJO 1.25ml/min**

stat. ph. **SI-60 5um**
 column **250x4mm**

remarks **PRODUCTOS DE REACCION**
 .. **AC. LINOLEICO CON OXI-**
 .. **GENO EN PRESENCIA DE**
 .. **LIPOXIGENASA LOX-1**

(B)



analisis **METABOLITOS-LINOLEICO**
 inj. vol. 5ul
 mobile ph. A: **HEXANO-92.0**
 .. B: **ETER ETILICO-8.0**
 .. **FLUJO 1.25ml/min**

stat. ph. **SI-60 5um**
 column **250x4mm**

remarks **PRODUCTOS DE REACCION**
 .. **AC. LINOLEICO CON OXI-**
 .. **GENO EN PRESENCIA DE**
 .. **LIPOXIGENASA LOX-2**

Figura 40.- Analisis HPLC en columna Si-60 5 μm (250 x 4 mm) de los productos de reacción de LOX-1 (A) y LOX-2 (B), utilizando ácido linoleico como sustrato. Los picos cromatográficos corresponden a los compuestos recogidos en la Tabla IX.

de una reacción de cooxidación del ácido linoleico o a partir de los hidroperóxidos por una actividad hidroperoxidasa de LOX. Esta última vía es bastante improbable en el caso del isoenzima LOX-1 dado que, como se muestra en la Tabla VIII, se obtienen proporciones distintas entre los isómeros estructurales de los hidroperóxidos y cetodienos.

Tabla VIII.- Regioespecificidad de los isoenzimas de lipoxigenasa de garbanzo en la formación de hidroperóxidos y cetodienos, utilizando ácido linoleico como sustrato.

Isoenzima	pH	13-LA00H:9-LA00H	13-LAO:9-LAO
LOX-1	5.5	42.7:57.3	58.2:41.8
LOX-2	6.0	90.6: 9.4	-

El espectro UV-Vis en hexano:éter etílico (92:8, v/v) de cada uno de los isómeros, tanto de hidroperóxidos como de cetodienos, indican un desplazamiento de aproximadamente 3 nm a menor longitud de onda de los isómeros *-E,E* respecto de los *-Z,E*. Así, se encuentran los valores de λ_{max} para los distintos tipos de estereoisómeros siguientes: *-Z,E*-LA00H, 234 nm; *-E,E*-LA00H, 231 nm; *-Z,E*-LAO, 270 nm, y *-E,E*-LAO, 266 nm.

En la Tabla IX se muestran las proporciones de los distintos estereoisómeros que se obtienen por acción de ambos isoenzimas de LOX. LOX-2 produce cerca del 89% del diastereoisómero 13-*Z*-9,*E*-11-LA00H y 6% del 9-*E*-10,*Z*-12-LA00H, que son teóricamente los estereoisómeros enzimáticos provenientes de la reacción del ácido linoleico con LOX. La oxidación de este ácido por LOX-1 da lugar a una mayor proporción de los diastereoisómeros cuyos dobles enlaces poseen una disposición *E* (24.5%). Algunos autores afirman que estos tipos de isómeros no tendrían una

Tabla IX.- Estereoespecificidad en la formación de hidroperóxidos y cetodienos por LOX-1 y LOX-2, utilizando ácido linoleico como sustrato.

Productos	N° Pico	LOX-1 (%)	LOX-2 (%)
Hidroperóxidos			
13-Z-9, E-11-LA00H	1	31.5	88.9
13-E-9, E-11-LA00H	2	11.2	1.7
9-E-10, Z-12-LA00H	3	44.0	5.9
9-E-10, E-12-LA00H	4	13.3	3.5
Cetodienos			
13-Z-9, E-11-LAO	5	44.0	-
13-E-9, E-11-LAO	7	14.3	-
9-E-10, Z-12-LAO	6	32.9	-
9-E-10, E-12-LAO	8	8.8	-

procedencia enzimática sino química, por una reacción espontánea de isomerización. En nuestro caso, esto quedaría cuestionado ya que tanto los metabolitos provenientes de la reacción con LOX-1 como los procedentes de la reacción con LOX-2 sufren exactamente la misma manipulación hasta su análisis por HPLC, existiendo una menor presencia de isómeros tipo -E,E- en los productos de reacción de LOX-2 (5.2%). La isomerización de los Z,E-hidroperóxidos a los E,E-hidroperóxidos, termodinámicamente más estables, ocurre en presencia de luz a altas temperaturas. Cuando una alícuota de los productos de reacción de LOX-1 se mantenía a 20°C y luz durante 12 h, se comprueba una transformación del hidroperóxido 13-Z,E- en 13-E,E- de tan solo el 5.1%, y la del 9-E,Z- en el isómero 9-E,E- del 2.4%. Estos valores no justifican la presencia de la alta proporción de

los isómeros tipo *-E,E-* entre los productos de reacción de LOX-1 por isomerización química, teniendo en cuenta además que estos productos de reacción, una vez obtenidos, se llevaban inmediatamente a -25°C y oscuridad.

La isomerización química, en cambio, es bastante más probable en el caso de los cetodienos. En la misma experiencia descrita anteriormente para estudiar la isomerización de los hidroperóxidos en incubaciones a 20°C y presencia de luz, los cetodienos sufrían un alto grado de isomerización, de forma que un 48.4% del 13-*Z,E-* cetodieno se convertía en el tiempo de incubación en 13-*E,E-*, y un 50.5% del 9-*E,Z-* pasaba a 9-*E,E-*.

VI.1.2. Incubación con ácidos linoleico y 13-hidroperoxi-octadecadienoico

Verhagen *et al.* (1977) comprobaron que el isoenzima L-1 de soja, en ausencia de oxígeno y ácido linoleico, catalizaba la descomposición de 13-LAOOH para dar principalmente 13-LAO. En presencia del ácido y anaerobiosis se produce también esta conversión aunque en menor grado.

A fin de determinar un posible origen de los cetodienos en los hidroperóxidos, se realizaron incubaciones de LOX-1, utilizando 20 ml de tampón fosfato sódico 50mM pH 5.5, 1 ml de LOX-1 (0.378 mg) y 1 ml de disolución de sustrato que contenía [$1-^{14}\text{C}$]-13-LAOOH y ácido linoleico, obtenido según se describe en el apartado II.11.2. de Materiales y Métodos. Los productos de reacción, una vez metilados, se sometieron a un doble desarrollo por TLC en sílice con hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1, v/v/v), y las bandas radioactivas detectadas con un analizador lineal de radioactividad y por autorradiografía. La Figura 41 muestra el resultado de esta incubación. Se observa que la mayor parte de los productos radioactivos se encuentran en el origen del desarrollo, no apareciendo banda de producto radioactivo con $R_f = 0.4$, correspondiente a 13-cetodieno. Esto significa que los cetodienos que se obtienen provienen exclusivamente del ácido linoleico por acción enzimática, descartándose la

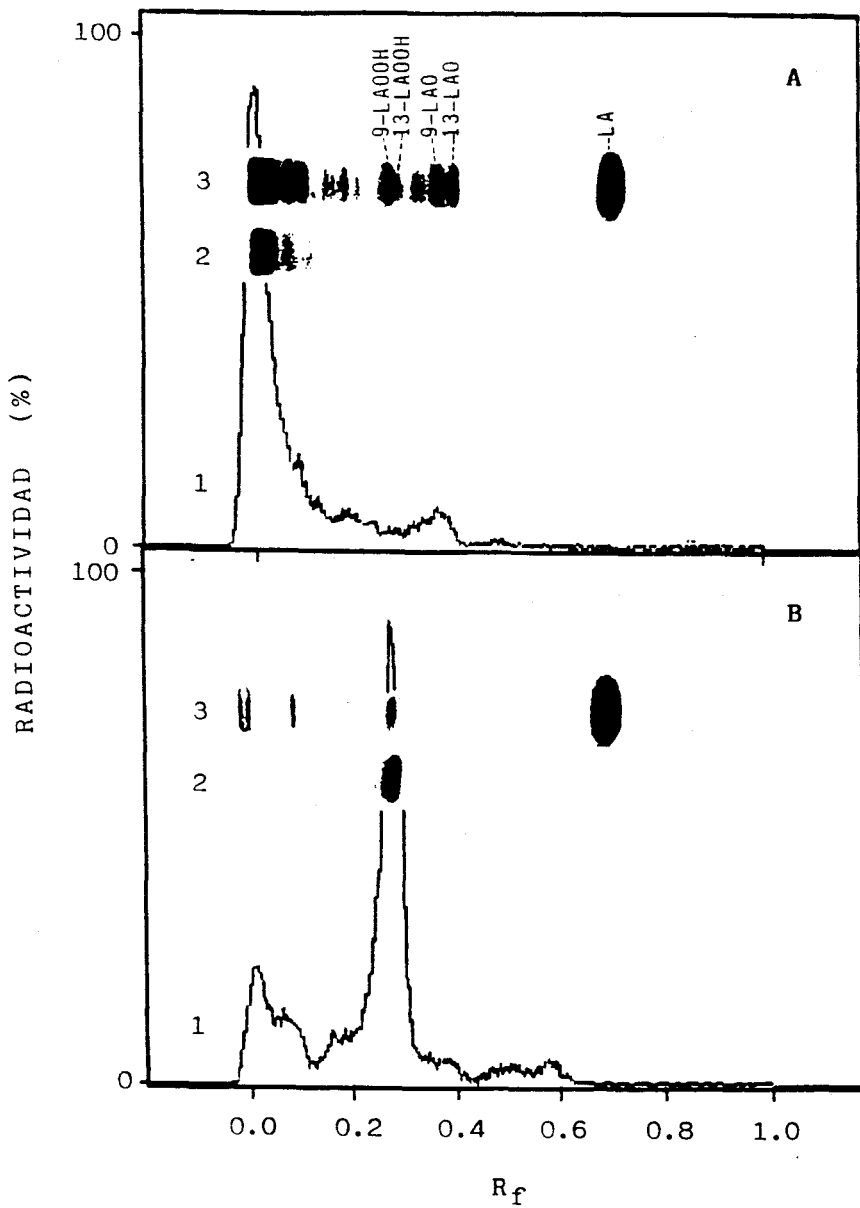


Figura 41.- Distribución de los productos radioactivos procedentes de la incubación de $[1-^{14}\text{C}]-13\text{-LA00H}$ y ácido linoleico en presencia (A) y ausencia (B) de LOX-1. Los productos de reacción se sometieron a un doble desarrollo con hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1, v/v/v) por TLC en sílice. Después del análisis lineal de radioactividad (1) y autorradiografía (2), los productos fueron visualizados (3) con H_2SO_4 50% y calentamiento a 300°C .

vía enzimática de conversión del 13-LA00H en 13-LA0. Por otra parte, es notable la disminución que se produce en la banda correspondiente a 13-LA00H (Fig. 41). Si no hubiera existido destrucción de 13-LA00H, debía aparecer teóricamente una banda de este compuesto que sería suma del $[1-^{14}\text{C}]$ -13-LA00H utilizado como sustrato y el formado en la reacción enzimática a partir de ácido linoleico, aproximadamente la misma cantidad que de 9-LA00H como se ha visto en el apartado anterior. El análisis HPLC de los metabolitos (Fig. 42) permite demostrar que, teniendo en cuenta las consideraciones anteriores sobre el contenido teórico de 13-LA00H que debía existir, se observa una destrucción de aproximadamente el 80% del 13-LA00H durante la reacción enzimática. Este hidroperóxido destruido ha dado lugar a compuestos de mayor polaridad como se ve en el análisis de radioactividad de la placa (Fig. 41), quedando en el origen. Estos productos podrían corresponder al resultado de la reacción del 13-LA00H con LOX-1, confirmando los trabajos en este sentido que demuestran una reacción entre el 13-hidroperóxido y algunas LOXs, principalmente en animales. Esta reacción, calificada de autoinactivación, podría explicar la tendencia asintótica a un orden de reacción cero en la producción de hidroperóxidos que se observa en las cinéticas de reacción de ambos isoenzimas de LOX de garbanzo con ácido linoleico, cuando aún no se ha consumido todo el ácido ni el oxígeno presente en la mezcla de reacción (Fig. 16).

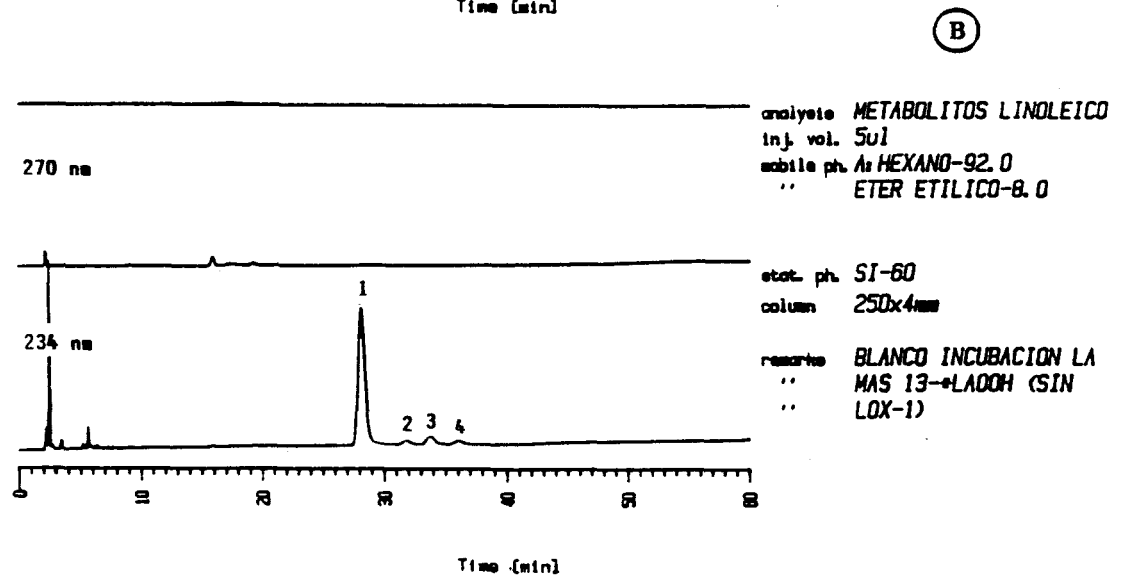
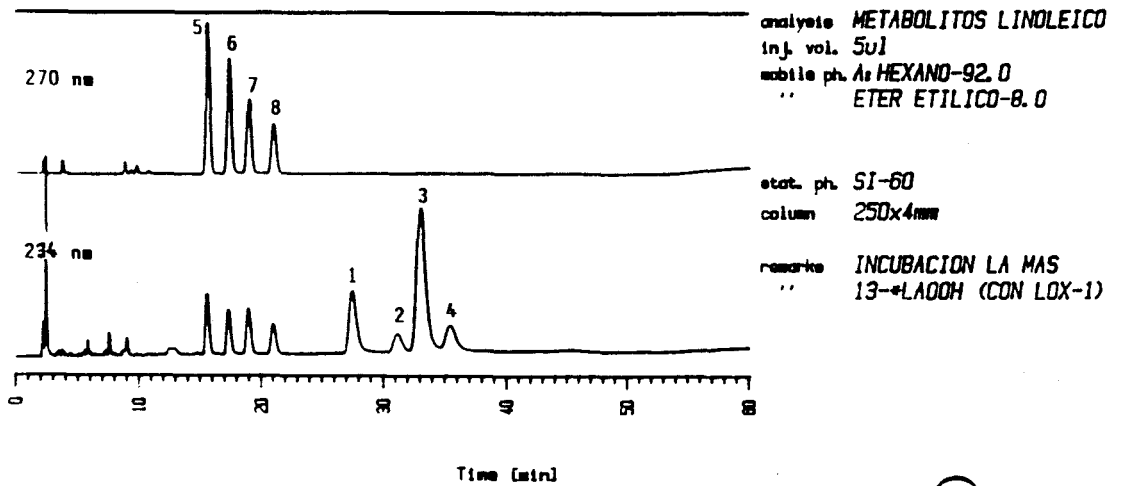
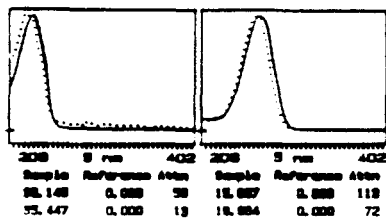


Figura 42.- Análisis HPLC en columna Si-60 5 μ m (250 x 4 mm) de los productos de la incubación de [1-¹⁴C]-13-LAOOH y ácido linoleico en presencia (A) y ausencia (B) de LOX-1. Los picos cromatográficos corresponden a los compuestos recogidos en la Tabla IX.

VI.2. Análisis estructural de los metabolitos

VI.2.1. Obtención de los estereoisómeros

La identificación de cada uno de los distintos estereoisómeros se llevó a cabo haciendo uso de la espectrometría de masas y espectrofotometría IR, necesitando el aislamiento previo de cada uno de estos isómeros. El primer paso en este sentido fue la obtención de todos los cetodienos e hidroperóxidos de forma separada por HPLC con columna preparativa de sílice. El segundo paso consistió en la separación individual de los isómeros también por HPLC, llevado a cabo, al igual que el primer paso, como se describe en Materiales y Métodos. Para ello, los hidroperóxidos fueron reducidos previamente con NaBH_4 para formar los hidroxidienos correspondientes.

La Figura 43 muestra la elución en HPLC de los hidroxidienos procedentes de la reducción de los hidroperóxidos formados por LOX-1 en incubaciones con ácido linoleico. Cada uno de los productos fue recogido de forma separada para su posterior identificación. Los estereoisómeros de los cetodienos también se purificaron por HPLC en las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos. La Figura 43 muestra la separación entre los distintos estereoisómeros de cetodienos, y al igual que los hidroxidienos, permite obtenerlos sin contaminación de otros isómeros.

VI.2.2. Cromatografía de gases-espectrometría de masas

El análisis estructural por espectrometría de masas de cada uno de los isómeros purificados por HPLC permite la localización del carbono del ácido linoleico que ha sufrido la oxidación enzimática.

A) Hidroxidienos

Puesto que los hidroperóxidos se mostraron como unos compuestos

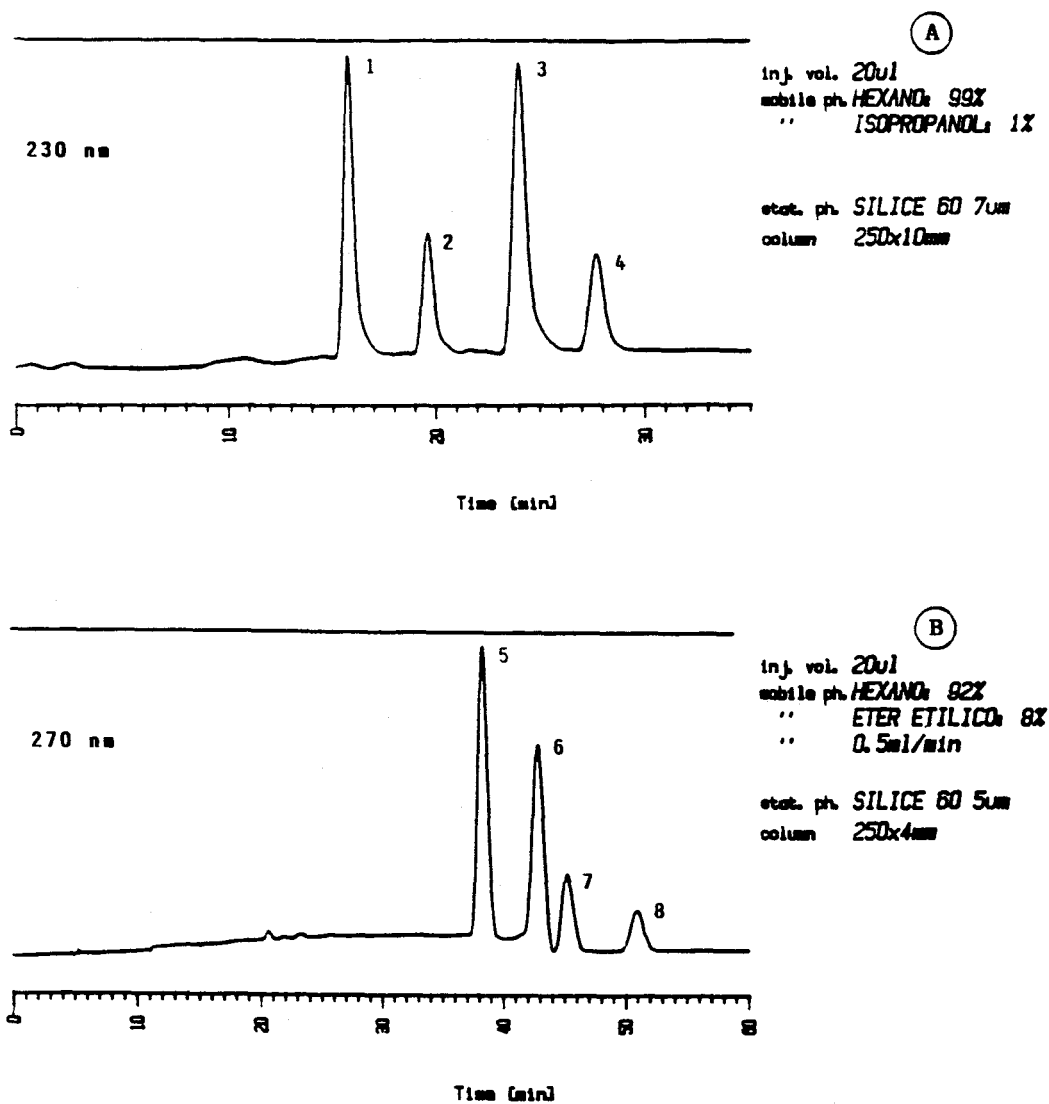
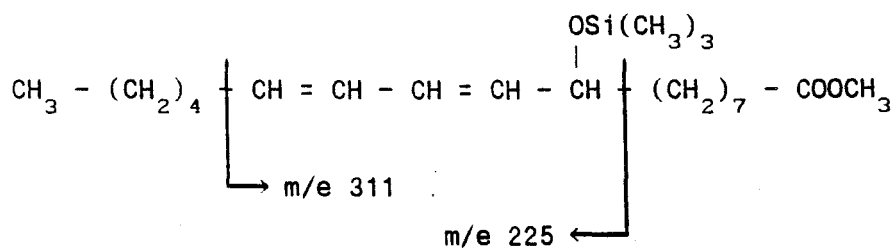


Figura 43.- Aislamiento por HPLC en columna de Si-60 de los hidroxidienos (A), procedentes de la reducción de los hidroperóxidos, y cetodienos (B) producidos en la reacción de LOX-1, utilizando ácido linoleico como sustrato. Los picos cromatográficos corresponden a los compuestos recogidos en la Tabla IX.

altamente inestables a altas temperaturas, descomponiéndose en el inyector del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas, éstos fueron separados como hidroxidienos después de su reducción como se ha comentado en el apartado anterior. Esto permite, además, la posibilidad de formar los derivados trimetilsililados por reacción con BSTFA, que presenta la ventaja de una fragmentación preferencial en α respecto al carbono que porta el grupo trimetilsililo. El análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas se llevó a cabo con una columna capilar SP 2380 en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Las Figuras 44 y 45 representan los análisis por cromatografía gaseosa y espectros de masas correspondientes a los productos mayoritarios. Todos los isómeros presentan un ión molecular de m/e 382 que corresponde a un compuesto de fórmula $C_{19}H_{34}O_3$ (310) del hidroxidieno metilado derivado del ácido linoleico más la incorporación del grupo trimetilsililo (72). Los fragmentos de m/e 311 y 225 permiten diferenciar entre isómeros con el grupo OTMSi (grupo resultante de la trimetilsililación del grupo hidroxilo) en posición 13 ó 9. Esto se debe a que el grupo OTMSi favorece la rotura en α del carbono al cual está unido. Así, los isómeros de hidroxidieno con el grupo OTMSi en el C_9 presenta un fragmento característico de m/e 225 por rotura del enlace C_8-C_9 :



La fragmentación del enlace C_9-C_{10} es más improbable dada su parcial participación en el sistema conjugado del compuesto, lo que le confiere una gran estabilidad frente a la fragmentación. Cuando el grupo OTMSi

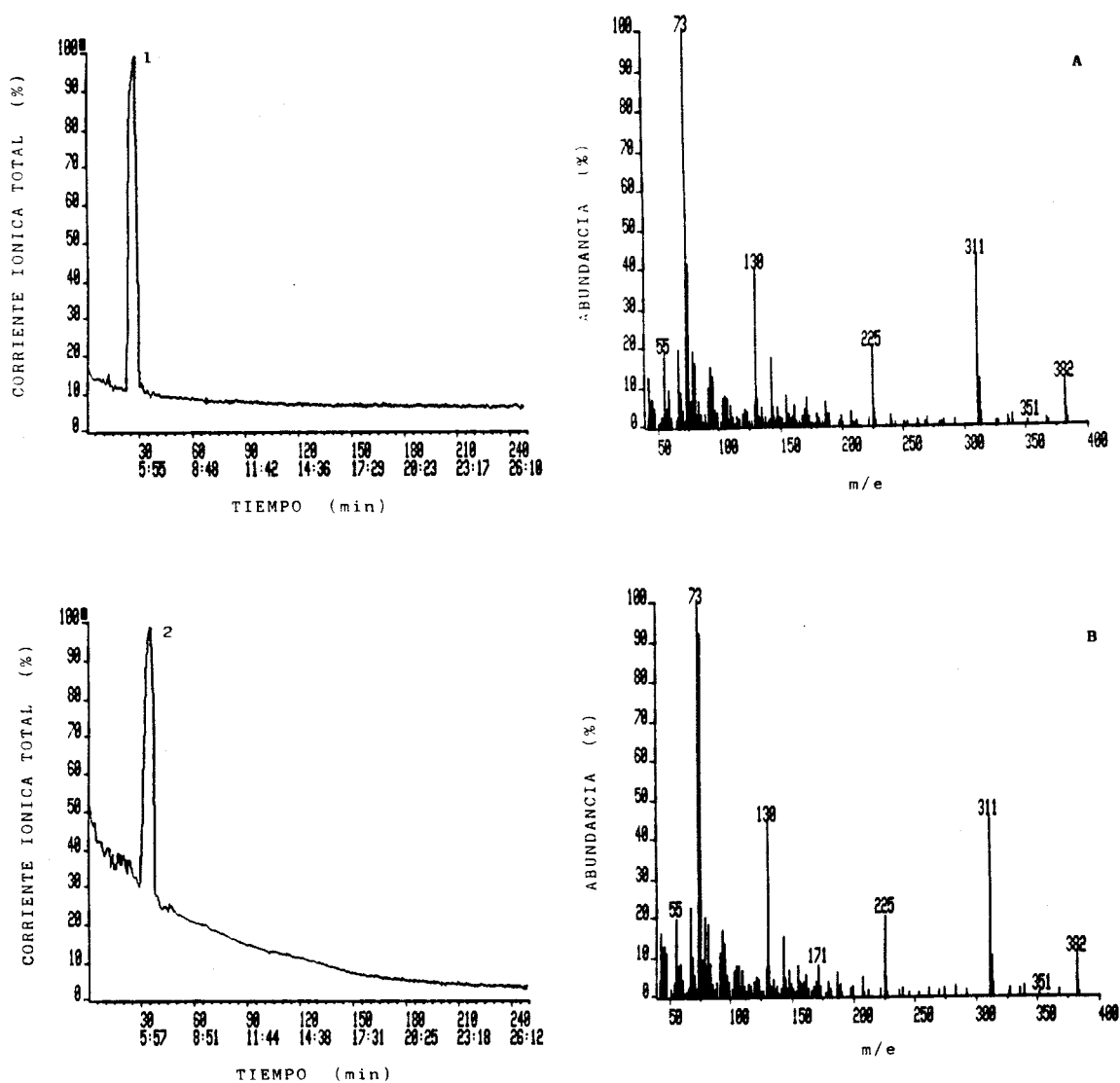


Figura 44.- Espectros de masas de los derivados trimetilsililados de los estereoisómeros de 13-LAOH procedentes de la reducción con NaBH_4 de los hidroperóxidos producidos en la reacción de LOX-1 con ácido linoleico:
(A) 13-Z-9,E-11-LAOH; (B) 13-E-9,E-11-LAOH.

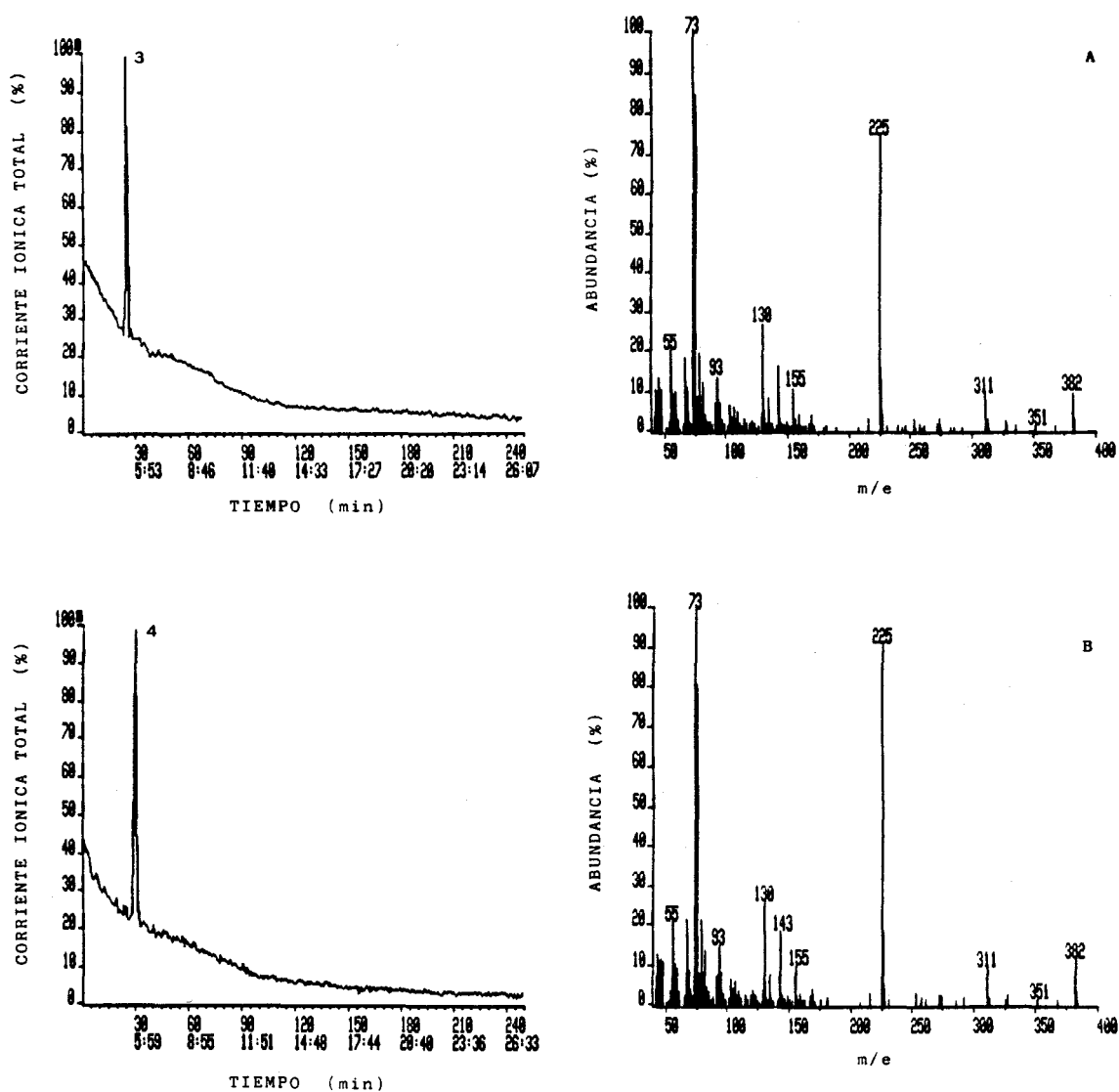
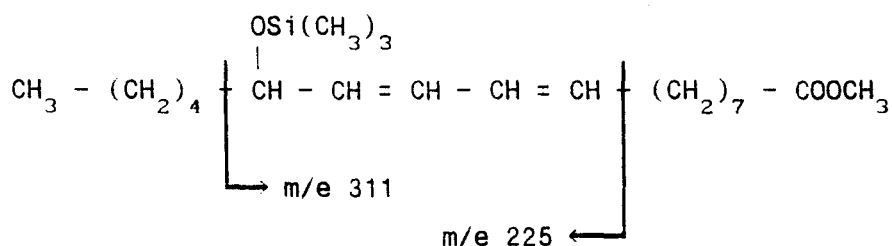


Figura 45.- Espectros de masas de los derivados trimetilsililados de los estereoisómeros de 9-LAOH procedentes de la reducción con NaBH_4 de los hidroperóxidos producidos en la reacción de LOX-1 con ácido linoleico:

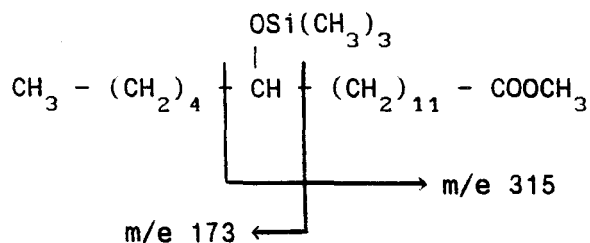
(A) 9-E-10,Z-12-LAOH; (B) 9-E-10,E-12-LAOH.

está situado sobre el C_{13} , la formación del fragmento de m/e 311 se encuentra más favorecida que la de m/e 225 por rotura del enlace $C_{13}-C_{14}$:

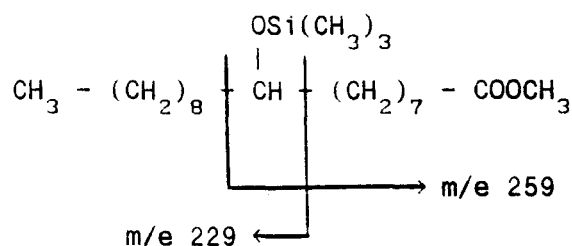


Existe por tanto una inversión de la abundancia relativa de los fragmentos de m/e 311 y 225 entre los isómeros 13 y 9 que permite identificar la posición del grupo hidropoxilo en los hidroperóxidos derivados del ácido linoleico.

Para confirmar estos resultados se realizó la hidrogenación de cada uno de los estereoisómeros de hidroxidienos con H_2/PtO_2 a fin de evitar la estabilidad debida a la conjugación y poder obtener fragmentaciones tanto en α como en α' . La Figura 46 muestra el espectro de masas de los productos de esta hidrogenación tras su sililación. La pérdida de la conjugación da lugar a fragmentos procedentes de roturas en α y α' respecto al carbono que porta el grupo OTMSi. Así, se obtienen fragmentos característicos de m/e 315 y 173 para el derivado del 13-LAOH:



Para el derivado de 9-LAOH se obtienen unos fragmentos característicos y mayoritarios con m/e 229 y 259:



Esto permite confirmar los resultados obtenidos con los isómeros de los hidroxidienos, y por tanto se puede afirmar que LOX-1 y LOX-2 dan lugar a los cuatro hidroperóxidos que están recogidos en la Tabla IX.

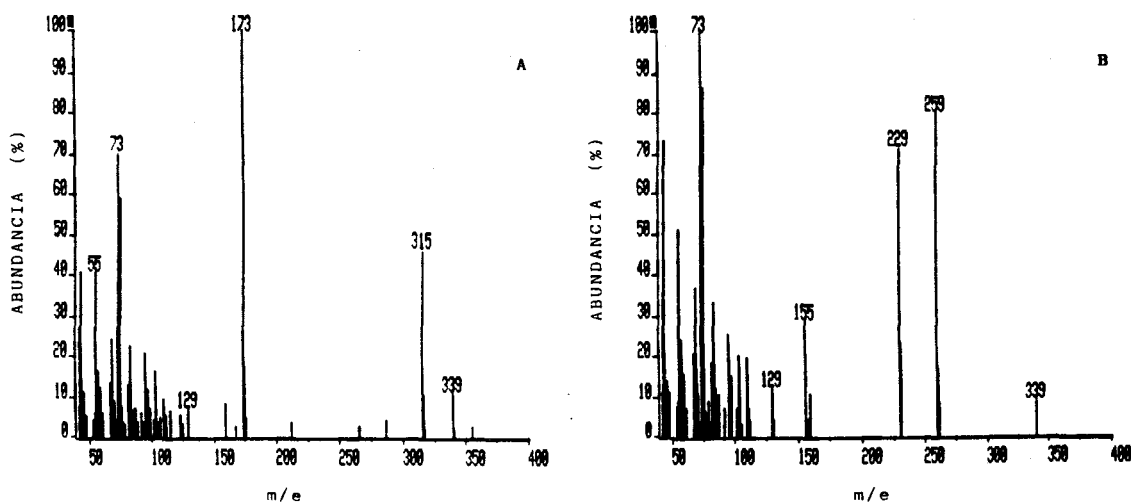
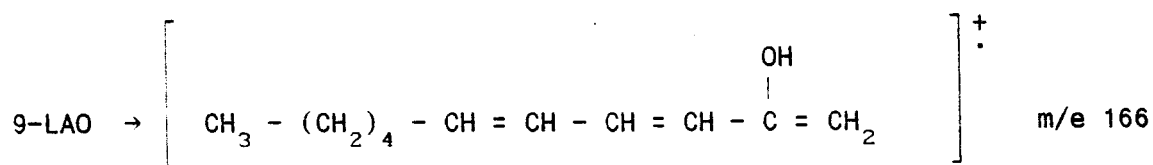
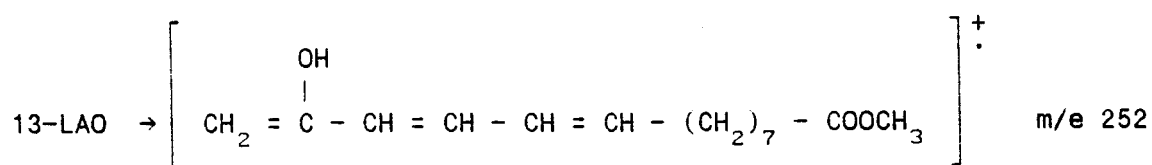


Figura 46.- Espectros de masas de los isómeros de 13- y 9-LAOH después de la hidrogenación con H_2/PtO_2 y derivatización con BSTFA: (A) 13-hidroxidecanoato de metilo; (B) 9-hidroxidecanoato de metilo.

B) Cetodienos

Las Figuras 47 y 48 representan los análisis cromatográficos de gases y espectros de masas de los estereoisómeros de los cetodienos. En este caso no es necesaria una manipulación posterior a la purificación por HPLC para obtener sus espectros de masas. Su elución en una columna capilar SP 2380 se llevó a cabo en unas condiciones distintas a la de los hidroxidienos trimetilsililados como se recoge en Materiales y Métodos. Se comprueba que los estereoisómeros con configuración *-Z,E-* se isomerizan parcialmente en el inyector a los correspondientes *-E,E-*. La identificación de las posiciones 9 y 13 para el grupo oxo se realiza gracias a unos fragmentos característicos procedentes de reordenamientos de Mc Lafferty. Estos fragmentos tienen una relación m/e de 252 para el 13-LAO y m/e 311 para el 9-LAO que los hace fácilmente identificables y son los siguientes:



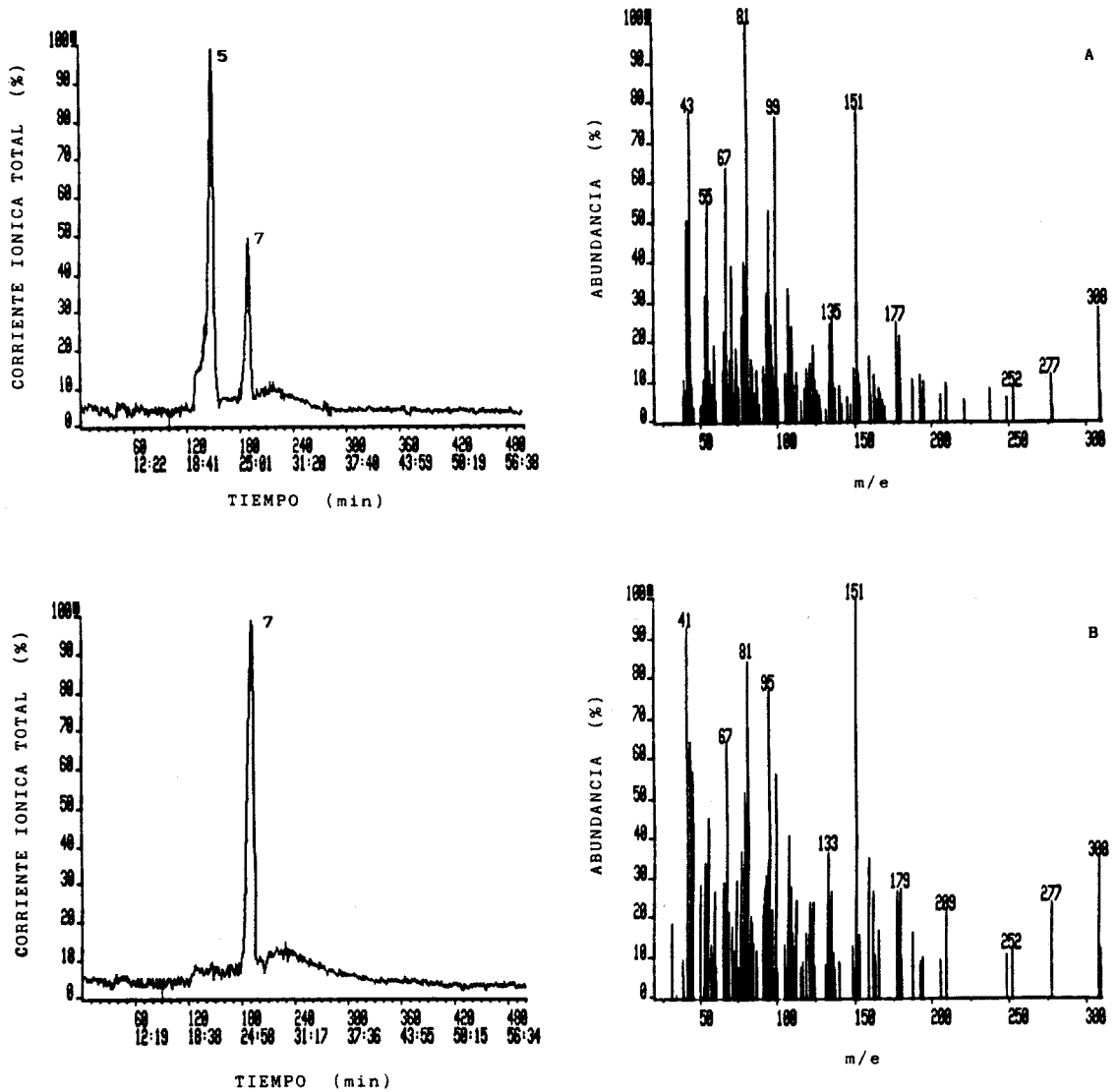


Figura 47.- Espectros de masas de los 13-LAO producidos en la reacción de LOX-1, utilizando ácido linoleico como sustrato:
 (A) 13-Z-9,E-11-LAO; (B) 13-E-9,E-11-LAO.

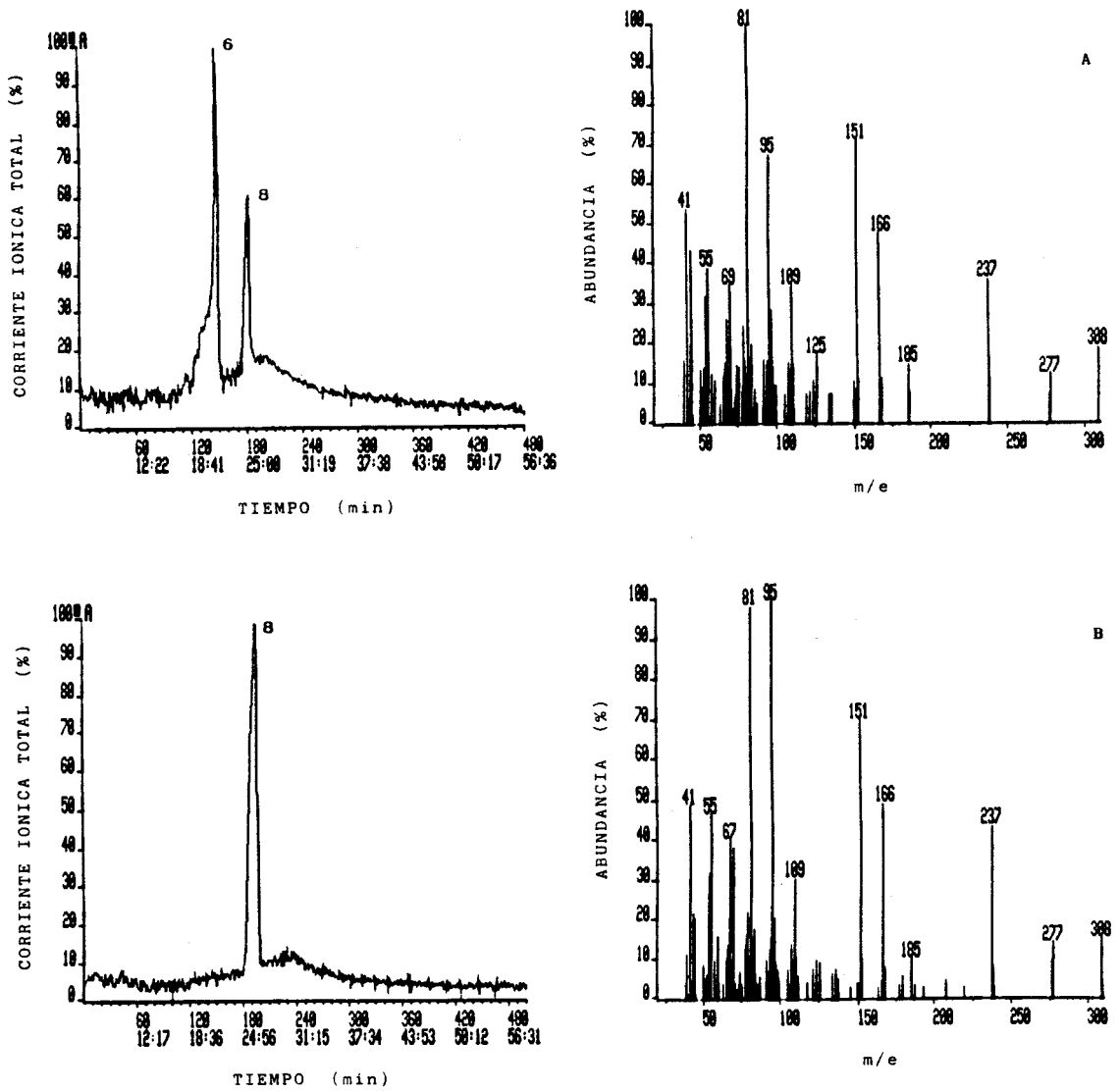


Figura 48.- Espectros de masas de los 9-LAO producidos en la reacción de LOX-1, utilizando ácido linoleico como sustrato:
 (A) 9-E-10,Z-12-LAO; (B) 9-E-10,E-12-LAO.

VII.2.3. Espectrofotometría IR

La determinación del tipo de diastereoisómero se llevó a cabo mediante la técnica de espectrofotometría IR en película sobre KBr.

A) Hidroxidienos

Las Figuras 49 y 50 muestran los espectros IR correspondientes a los hidroxidienos purificados por HPLC y que provenían de la reducción de los hidroperóxidos producidos por LOX-1. Los cuatro estereoisómeros presentan bandas de absorción comunes correspondientes a su grupo hidroxilo (3460 y 3250 cm^{-1}) y éster (1744 , 1200 y 1174 cm^{-1}). En la región de 1000 cm^{-1} se sitúa la banda de absorción correspondiente a $\delta(\text{C-H})_{\text{trans}}$. Los isómeros 13-Z-9,E-11-LAOH y 9-E-10,Z-12-LAOH muestran una banda desdoblada en esta región a 986 y 951 cm^{-1} no muy intensas (aproximadamente un 50% de transmisión). La banda a mayor frecuencia se intensifica en los isómeros 13-E-9,E-11-LAOH y 9-E-10,E-12-LAOH, alcanzando un porcentaje de transmisión bastante bajo y con un desplazamiento de la banda a 990 cm^{-1} , desplazamiento que se ha demostrado que ocurre en los sistemas diénicos conjugados -E,E- respecto a los -Z,E-.

B) Cetodienos

En las Figuras 51 y 52 quedan recogidos los espectros IR pertenecientes a los isómeros de cetodienos producidos en la incubación de ácido linoleico con LOX-1. Como ocurría en el caso de los hidroxidienos, en los cuatro estereoisómeros aparecen bandas comunes correspondientes en este caso al grupo oxo (1691 y 1667 cm^{-1}) y éster (1742 , 1200 y 1174 cm^{-1}). La diferencia entre los isómeros -Z,E- y los -E,E-, como en el caso anterior de los hidroxidienos, radica en la región de 1000 cm^{-1} . Los isómeros 13-Z-9,E-11-LAO y 9-E-10,Z-12-LAO presentan dos bandas de absorción de poca intensidad a 997 y 964 cm^{-1} . Estas se transforman en una única banda de alta intensidad desplazada a 1002 cm^{-1} en el caso de los isómeros 13-E-9,E-11-LAO y 9-E-10,E-12-LAO.

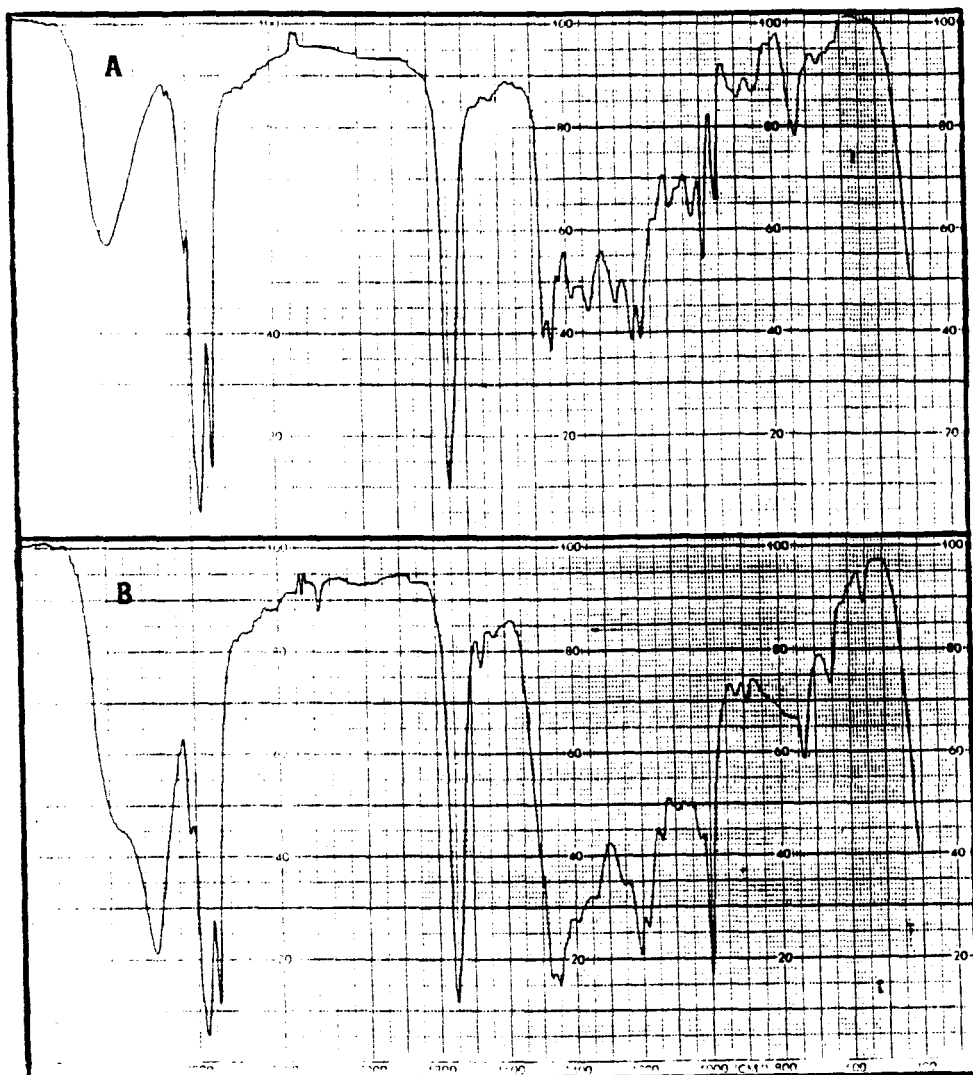


Figura 49.- Espectros IR de los diastereoisómeros de 13-LAOH procedentes de la reducción con NaBH_4 de los hidroperóxidos producidos en la reacción de LOX-1, utilizando ácido linoleico como sustrato:

(A) 13-Z-9,E-11-LAOH; (B) 13-E-9,E-11-LAOH.

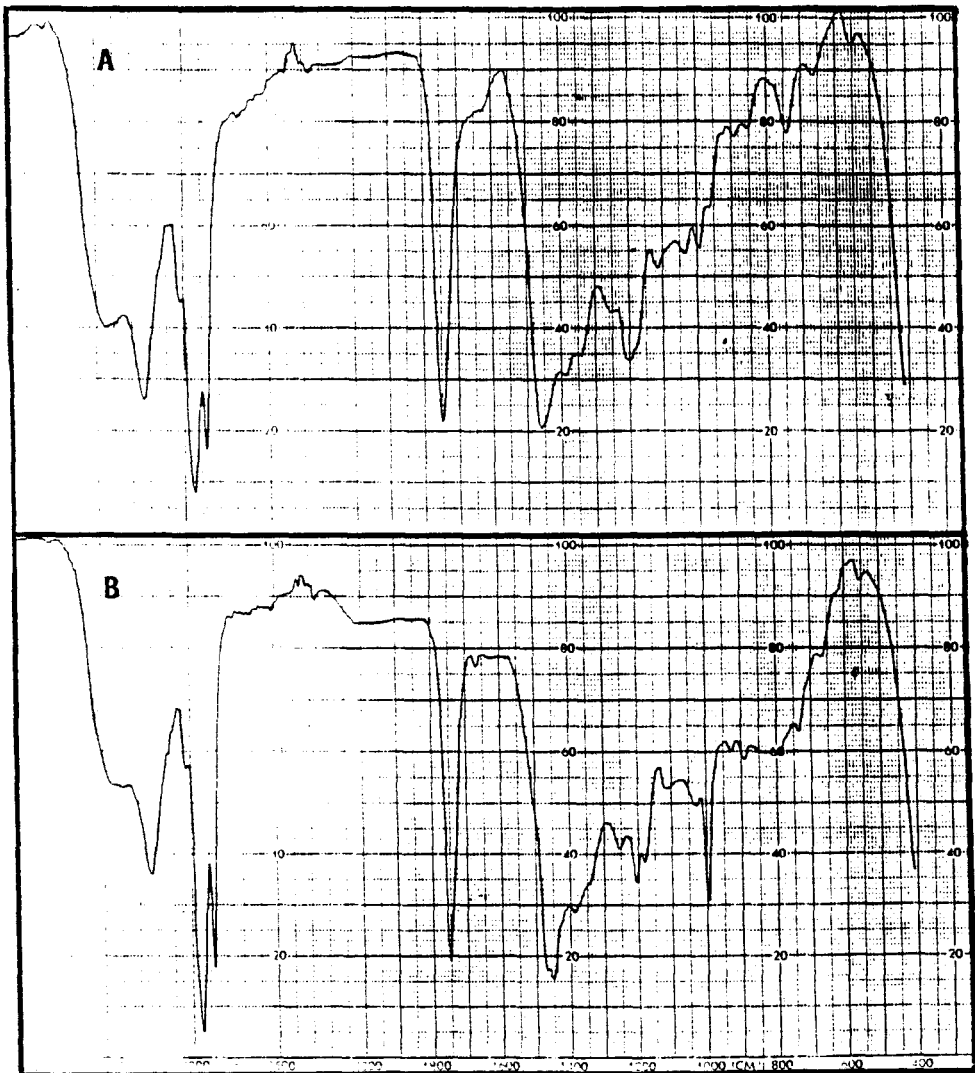


Figura 50.- Espectros IR de los diastereoisómeros de 9-LAOH procedentes de la reducción con NABH_4 de los hidroperóxidos producidos en la reacción de LOX-1, utilizando ácido linoleico como sustrato:
(A) 9-E-10,Z-12-LAOH; (B) 9-E-10,E-12-LAOH.

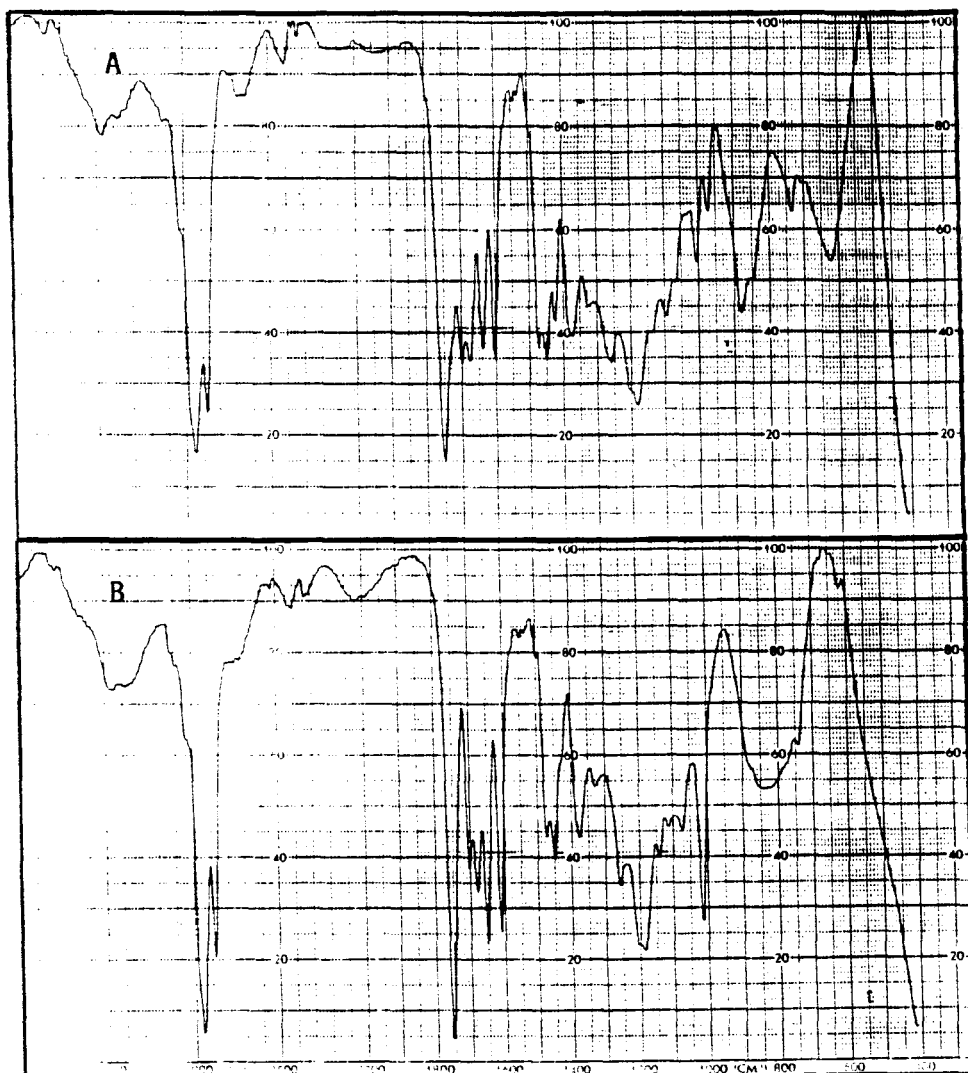


Figura 51.- Espectros IR de los diastereoisómeros de 13-LAO producidos en la reacción de LOX-1, utilizando ácido linoleico como sustrato: (A) 13-Z-9,E-11-LAO; (B) 13-E-9,E-11-LAO.

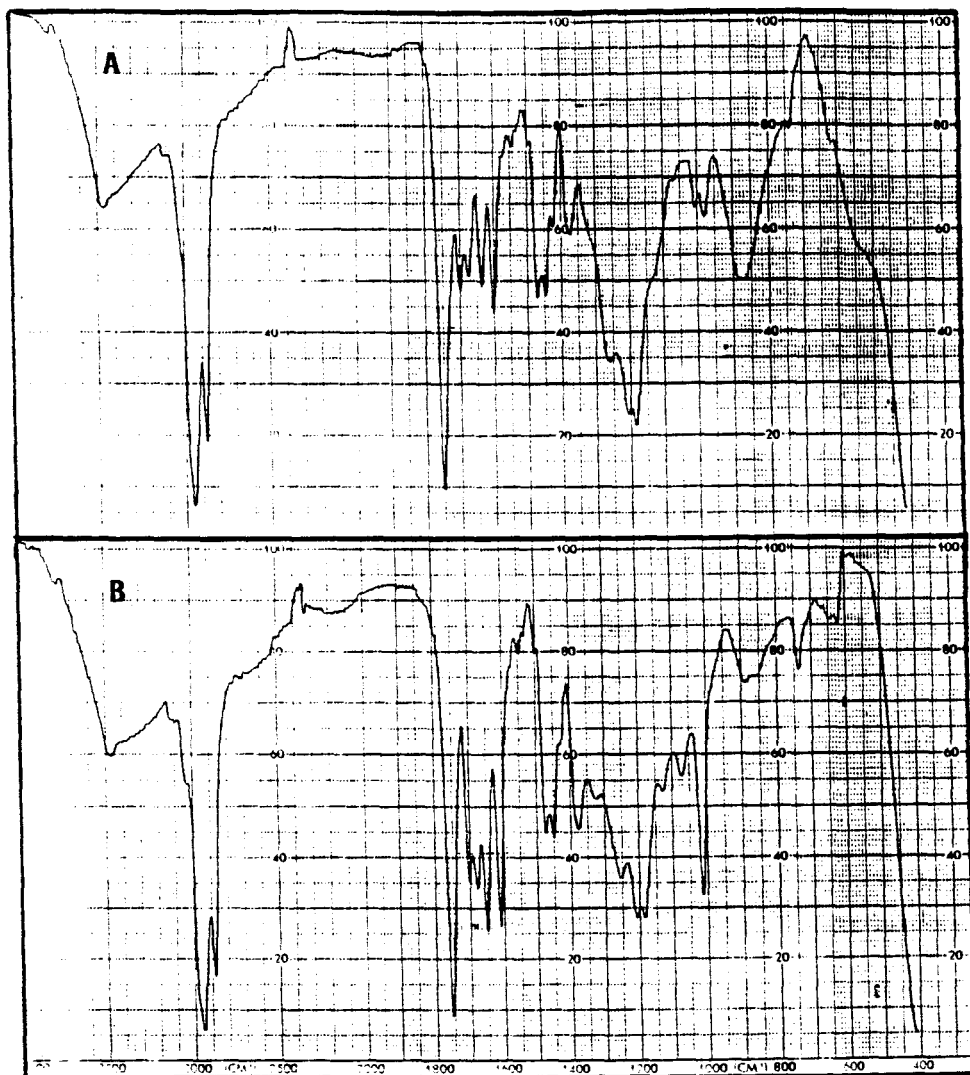


Figura 52.- Espectros IR de los diastereoisómeros de 9-LAO producidos en la reacción de LOX-1, utilizando ácido linoleico como sustrato: (A) 9-E-10,Z-12-LAOH; (B) 9-E-10,E-12-LAOH.

DISCUSSION

El principal objetivo de este trabajo, como su título indica, era la obtención de los isoenzimas de LOX presentes en garbanzo (*Cicer arietinum*), variedad Pedroxillano, en forma pura para proceder a su caracterización individual. En este sentido y como primer paso, ha sido estudiada la actividad LOX a pH 6.0 en extractos crudos de garbanzo a lo largo de la germinación. Se encuentra que dicha actividad sufre un descenso a lo largo de este proceso, demostrándose un alto contenido de proteína con actividad LOX en la semilla seca. Este hecho ha sido también establecido que ocurre en la mayoría de las semillas de leguminosas, pero otras semillas como el girasol, presentan máxima actividad a los 4-5 días de germinación (Belver y Donaire, 1983; Leoni *et al.*, 1985), sin que se detecte esta actividad en las semillas no germinadas. El contenido de LOX en la semilla de garbanzo sin germinar podría tener una función activadora de la germinación una vez hidratada, suministrando los metabolitos necesarios para que este proceso tenga lugar. En la bibliografía se encuentran evidencias que relacionan una alta tasa de actividad LOX con tejidos jóvenes que están creciendo activamente (Pauls y Thompson, 1984).

La LOX ha sido tradicionalmente considerada como un enzima soluble, del cual existen un número variable de isoenzimas, y aunque algunos trabajos demuestran una actividad LOX asociada a membranas (Fobel *et al.*, 1987; Funk *et al.*, 1985; Lynch *et al.*, 1985; Lynch y Thompson, 1984; Raddanna *et al.*, 1988; Olías y Valle, 1988), estas formas asociadas no han sido bien caracterizadas. La extracción de la actividad LOX a partir de harina de garbanzo haciendo uso de tampones conteniendo Triton X-100 o Tween-20, no dio lugar a un aumento significativo de esta actividad respecto a las extracciones sin dichos detergentes. El criterio de solubilidad enzimática de Razin (1972) considera que un enzima es soluble cuando queda en el sobrenadante de una centrifugación a 100000 g durante 1 h. Extractos crudos de harina de garbanzo sometidos a ultracentrifugación durante 1 h a 150000 g, dieron lugar a un sobrenadante que contenía la totalidad de la actividad LOX. Estos resultados sugieren la no existencia de la actividad LOX de garbanzo asociada a membranas.

La determinación de las características enzimáticas de las proteínas

con actividad LOX contenidas en las semillas de garbanzo exigía su purificación hasta homogeneidad. Esta se ha llevado a cabo a partir del extracto crudo en cuatro etapas que incluían el fraccionamiento por precipitación con sulfato amónico, la exclusión molecular, la cromatografía de intercambio aniónico y una cromatografía hidrofóbica. El fraccionamiento con sulfato amónico se realiza recogiendo las proteínas que precipitan con una concentración entre el 40 y 65% de saturación de esta sal, lo que supone la precipitación del 30% de las proteínas del extracto crudo, en la que se incluye el 85% de la actividad LOX. La etapa de exclusión molecular permite la obtención de las proteínas procedentes de la anterior etapa con un peso molecular comprendido aproximadamente entre 50 y 200 KDa. De esta forma, se recupera la totalidad de la actividad LOX con un 12.8% de las proteínas originales del extracto crudo. A partir de aquí, y a través de una etapa de intercambio aniónico en dietilaminoetil celulosa, se consigue la separación de dos proteínas con actividad LOX, que se recogen con distintas concentraciones del tampón de elución, 70 y 95mM respectivamente, y que en función del orden de elución en esta cromatografía denominamos LOX-1 y LOX-2. Ambos extractos proteicos con actividad LOX fueron finalmente purificados por una cromatografía de interacción hidrofóbica. Esta última etapa parece provocar una desnaturalización parcial de ambas proteínas, en especial del isoenzima denominado LOX-1 como se deduce de los valores de actividad específica (Tabla II).

El único estudio de LOX en *Cicer arietinum* recogido en la bibliografía hace referencia a una variedad hindú denominada Annegeri-I (Borthakur *et al.*, 1986 y 1988). Esta variedad contiene también dos isoenzimas de LOX que se purificaron hasta homogeneidad, utilizando una primera etapa de fraccionamiento con sulfato amónico, para continuar con una etapa de intercambio aniónico y finalizar con una cromatografía en hidroxapatito. Con esta última conseguían separar dos actividades LOX que eran recromatografiadas en hidroxapatito una, y por exclusión molecular la otra. Los resultados finales muestran unos valores de purificación muy similares a los obtenidos en este trabajo con la variedad Pedroxillano, pero con un rendimiento global menor.

El proceso de purificación seguido en este trabajo para la obtención de los isoenzimas de LOX de garbanzo ha dado lugar a dos preparaciones enzimáticas aparentemente homogéneas como se demuestra por electroforesis en gradiente de poliacrilamida 7-20% y SDS (Fig. 24), encontrándose una única banda de proteínas para cada isoenzima. De la observación detenida de los geles se podría deducir la existencia de una pequeña impurificación dado que parece existir una débil banda de proteínas muy solapada a la mayoritaria. Esto podría ser debido al mismo isoenzima que haya sufrido una desnaturalización, quizás a causa de la pérdida del átomo de hierro. Una rápida desaparición del cofactor metálico del enzima durante el almacenamiento ya ha sido demostrada por Pistorius y Axelrod (1974) en el isoenzima L-2 de soja. La pérdida de hierro de LOX-2 podría explicar el valor de 0.835 Fe/molécula encontrado para este isoenzima en el análisis de hierro por absorción atómica. En cualquier caso, queda descartada en ambas proteínas la posibilidad de contaminación por el otro isoenzima gracias al estudio por FPLC. La elución de ambos isoenzimas en un sistema FPLC tanto con una columna Mono Q HR 5/5 para intercambio aniónico (Fig. 12), como en una columna Mono P HR 5/20 de separación por puntos isoeléctricos en el rango de pH 3.95-6.35 (Fig. 25), dio lugar a unos picos de proteína simétricos y únicos para cada isoenzima que es también utilizado como criterio de pureza de los isoenzimas.

Aunque el primero y más estudiado isoenzima de LOX fue el L-1 de soja, que presenta un pH óptimo de actividad de 9.0, actualmente y de acuerdo con los estudios que se han realizado en gran número de materiales vegetales (Pinski *et al.*, 1971; Axelrod, 1974), éste es considerado como un isoenzima anómalo en cuanto al pH óptimo. Los distintos isoenzimas de LOX presentan un pH óptimo de actividad en el rango de pH 5.5-7.0, salvo excepciones como el ya mencionado de soja, LOX de uva con pH 8.0 (Cayrel *et al.*, 1983) y maíz con un pH óptimo de 7.4 (Hamberg, 1971). Ambos isoenzimas de LOX de garbanzo se encuentran dentro de este rango habitual de pH, con valores de 5.5 y 6.0 para LOX-1 y LOX-2 respectivamente, presentando asimismo una actividad prácticamente nula a pH 7.0. Esta pequeña diferencia en el pH óptimo de los isoenzimas de garbanzo permite diferenciar uno del otro cuando se mide la actividad LOX a ambos valores

de pH, ya que se registra una disminución en la actividad enzimática de entre el 15 y 30% cuando la medida de ésta se lleva a cabo al pH óptimo del otro isoenzima.

Tanto LOX-1 como LOX-2 muestran una gran afinidad por la peroxidación del ácido linoleico, principal ácido poliinsaturado en el reino vegetal. También actúan sobre los ácidos α y γ -linolénico aunque siempre en menor grado, mostrando una actividad muy baja cuando se utiliza ácido araquidónico como sustrato. Estos resultados son bastante concordantes con los obtenidos por Borthakur *et al.* (1988) en la variedad Annegeri-I de *Cicer arietinum*, con la excepción de que estos autores encuentran una gran afinidad del isoenzima BGL-1 hacia el ácido araquidónico, superando incluso la que tiene por el ácido linoleico.

Algunos autores, como Petterson *et al.* (1987) y Ludwig *et al.* (1987), consideran la existencia de una actividad hidropoxidasa (destructora de hidropéroxidos) de algunos isoenzimas de LOX en respuesta a una baja concentración de oxígeno. De esta forma, en la reacción enzimática no sería liberada una molécula de hidropéroxido, sino que habría una destrucción neta de éste por una predominancia del ciclo anaerobio sobre el aerobio (Fig. 2), de forma que el radical pentadienilo formado en el ciclo aerobio sería liberado en el anaerobio como un radical alcoxi (Verhagen *et al.*, 1977) y un ión hidroxilo. Este radical se reordenaría entonces para dar lugar a cetodienos entre otros productos. En este trabajo se demuestra que el isoenzima LOX-1 da lugar no solo al clásico producto de las LOX, el hidropéroxido, sino también a cetodienos que son detectados espectrofotométricamente a 280 nm. Esto ocurre incluso en reacciones con aporte continuo de oxígeno. Esto significaría la no validez de la hipótesis anterior para la formación de los cetodienos por LOX-1 a partir de los hidropéroxidos. La producción de cetodienos es una reacción con todas las características para calificarla de enzimática, que presenta un periodo de inducción inicial y que apenas muestra variación de la actividad específica con la concentración de LOX-1. En cambio, la medida de la actividad enzimática de LOX-1 llevada a cabo por seguimiento de la formación de hidropéroxidos no cumple este último requisito, de modo

que se encuentran variaciones bastante notables en la actividad específica de LOX-1 al utilizar diferentes concentraciones del isoenzima (Fig. 15). Christopher *et al.* (1972) encontraron este mismo fenómeno en estudios del isoenzima L-3 de soja. La razón de esta no linealidad de la actividad específica con la concentración del isoenzima es desconocida para estos autores, pero aseguraban que no era debida a una reducción de la concentración del sustrato ni a una inactivación enzimática, puesto que el consumo de oxígeno sí era lineal. En los estudios realizados con LOX-1 de garbanzo se comprueba que esta anomalía no es debida efectivamente a una reducción de la concentración de sustrato ni a una inactivación enzimática, como se puede demostrar por las cinéticas de formación de cetodienos que desarrollan una relación prácticamente lineal entre la actividad específica y la concentración del enzima. Este fenómeno podría ser debido, según Vick y Zimmerman (1987), a una mayor facilidad para la liberación de los radicales formados durante la catálisis enzimática, no sufriendo la hidroperoxidación enzimática sino una oxidación inespecífica. Esta podría ser la razón, por una parte de encontrar altas proporciones de cetodienos en la reacción enzimática de LOX-1 en condiciones aeróbicas, y por otra de que estos cetodienos tengan una proporción prácticamente idéntica de los isómeros posicionales 13 y 9.

Una actividad hidroperoxidasa, en un sentido algo distinto al antes considerado, fue demostrada por Verhagen *et al.* (1977) para el isoenzima L-1 de soja en condiciones anaeróbicas. En este caso, demostraban la destrucción de hidroperóxidos en la reacción enzimática para dar lugar a cetodienos. Esta podría ser a priori otra posibilidad a considerar para explicar la pérdida de la actividad específica de LOX-1 de garbanzo al aumentar su concentración, pues podría ocurrir un consumo de hidroperóxidos que rendiría cetodienos. Experiencias llevadas a cabo con hidroperóxido marcado radioactivamente en el carbono 1 y ácido linoleico en presencia de LOX-1 no muestra formación de cetodienos marcados radioactivamente a partir del hidroperóxido (Fig. 41), con lo que también se descarta esta posibilidad para LOX-1.

Del conjunto de experiencias referentes a cinéticas y productos de

reacción parece desprenderse que LOX-1 es un enzima con actividad LOX que podríamos calificar de secundaria, pudiendo atribuírsele la síntesis de cetodienos y/o la oxidación de pigmentos, como β -caroteno y retinol, como verdadera acción enzimática. De ser así, podría existir algún sitio de unión para cetodienos, punto de regulación que activaría la formación de éstos e inhibiría la de hidroperóxidos. Una vez que este sitio de regulación es ocupado por un cetodieno podría, quizás, evitar la entrada de oxígeno al sitio catalítico de formación de hidroperóxidos, y por tanto que tuviera lugar la peroxidación clásica de LOX. Esta implica, según Gardner (1989), la activación electrónica de la molécula de oxígeno por un aminoácido que forma parte de la cadena de transporte electrónico de dicho sitio catalítico. Este transporte electrónico podría ser entonces desviado hacia otro sitio catalítico de cooxidación, cercano al de peroxidación, donde se produciría la formación de un cetodieno del ácido poliinsaturado, si en el sitio hubiera un ácido poliinsaturado, o la cooxidación y por tanto decoloración de un pigmento, si en este sitio hubiera entrado previamente dicho pigmento. De esta forma los cetodienos jugarían un papel más importante que el hasta ahora considerado para ellos, siendo esencial en todo el proceso de la reacción catalítica. Asimismo explicaría el periodo de inducción inicial observado en la producción enzimática de cetodienos con LOX-1 y la pérdida de actividad enzimática (entendida como producción de hidroperóxidos) a lo largo de la reacción, pues a medida que aumenta la concentración de LOX-1 en la mezcla de reacción antes se conseguiría una concentración mínima de cetodienos que activara su formación, terminando el periodo de inducción por una parte, y por otra comenzando la pérdida de la actividad LOX o formadora de hidroperóxidos.

La formación de cetodienos es prácticamente nula en el caso del isoenzima LOX-2, con una baja tasa de cooxidación de pigmentos, lo que confirmaría la relación existente entre la formación de cetodienos y la oxidación de pigmentos. En el caso de este isoenzima, su acción enzimática principal sería la producción de hidroperóxidos, alimentando la cascada degradativa del ácido poliinsaturado (ruta de la LOX) que aportaría los metabolitos descritos en la Introducción, cuyos papeles

fisiológicos permanencen desconocidos. Posiblemente, existan también en este isoenzima los distintos sitios reguladores y catalíticos hipotetizados para LOX-1, aunque la regulación sea algo distinta a la de este último isoenzima como discutiremos más adelante.

Por otra parte, en las cinéticas de formación de hidroperóxidos, tanto por LOX-1 como por LOX-2, se constata una pérdida de actividad enzimática a lo largo del tiempo de reacción, como lo demuestra la baja respuesta en cuanto a la producción de hidroperóxidos al añadir nuevo sustrato a la mezcla de reacción (Fig. 16). Esto podría ser debido a una autoinactivación enzimática como ya ha sido descrito por algunos autores para algunas LOXs, tanto animales como vegetales (Redgel *et al.*, 1985; Cook y Lands, 1975; Smith y Lands, 1972), debido a la reacción del hidroperóxido con el enzima. LOX-2 es el isoenzima más sensible al 13-hidroperóxido, ya que en incubaciones con éste durante 24 h en concentración de 0.12mM, se obtiene una inactivación enzimática del 40%, mientras que LOX-1 no ve afectada su actividad enzimática en las mismas condiciones. Este isómero posicional de hidroperóxido es el considerado por Rapoport *et al.* (1984) como el más reactivo con la proteína. Estos autores sugieren que el 13-hidroperóxido se sitúa en principio en el sitio catalítico, de modo que habría una competencia entre este compuesto y el ácido poliinsaturado por este sitio, implicando una disminución de la actividad enzimática. Este efecto es claramente visible en ambos isoenzimas, aunque en mayor grado para LOX-2. Cuando el 13-hidroperóxido es añadido a la mezcla de reacción, provoca una disminución de la producción total de hidroperóxidos (Fig.19) y cetodienos. Los análisis llevados a cabo en incubaciones de ácido linoleico con 13-hidroperóxido marcado radioactivamente y LOX-1 demuestran la pérdida neta de un 80% del contenido teórico de 13-hidroperóxido (Fig. 42) en la mezcla de reacción. Esta desaparición de hidroperóxido podría estar relacionada con el proceso de autoinactivación mediante la reacción química del 13-hidroperóxido con algún o algunos restos de aminoácidos, metionina según la bibliografía (Rapoport *et al.*, 1984), para provocar su inactivación enzimática a lo largo del tiempo de reacción y dar lugar a un producto de mayor polaridad que queda en el origen del desarrollo TLC utilizado.

Los estudios cinéticos de la reacción enzimática de LOX han estado siempre dificultados por la limitada solubilidad de los sustratos, la formación de emulsiones y otros factores físicos que afectan la forma del sustrato en el medio acuoso. El ácido linoleico, como antes vimos, es el ácido poliinsaturado más activamente oxidado por los isoenzimas de LOX de garbanzo, siendo preparado, para servir como sustrato, disuelto en forma de sales sódicas con ayuda de Tween-20. Este es el procedimiento más utilizado en la actualidad. Los siguientes valores de K_M fueron determinados con concentraciones variables de este ácido: LOX-1, 192 μ M; LOX-2, 51 μ M. El valor de K_M para LOX-1 debe ser considerado como constante aparente, dado que se evidencia una importante inhibición por sustrato, además de la producción colateral de cetodienos a la de hidroperóxidos. En la siguiente tabla se comparan los valores de K_M obtenidos en este trabajo con algunos recogidos de la bibliografía:

Material	K_M (μ M)	Referencia
Soja L-1	12	Axelrod <i>et al.</i> , 1981
L-2	16	"
L-3	340	"
Guisante L-1	200	Reynolds y Klein, 1982a
L-2	2660	" , 1982b
L-3	2220	"
Judia china L-1	800	Truong y Mendoza, 1982
L-2	500	"
Lupino	240	Olfas y Valle, 1988
Colza	200	Khalyfa <i>et al.</i> , 1990
Garbanzo var. Annegeri-I		
BGL-1	7	Borthakur y Ramadoss, 1986
BGL-2	80	"
Garbanzo LOX-1	192	Este trabajo
LOX-2	51	"

Ambos isoenzimas de LOX de garbanzo son igualmente efectivos en la peroxidación del ácido linoleico como lo demuestran unos valores de actividad molecular de 7549 min^{-1} para LOX-1 y 7852 min^{-1} para LOX-2. La actividad molecular para el isoenzima L-2 de soja, de características muy similares a LOX-2 de garbanzo es de 6500 min^{-1} , mientras que el anómalo isoenzima L-1 de la misma semilla presenta una actividad molecular de 15800 min^{-1} (Christopher *et al.*, 1970). Por tanto, estos valores encontrados para LOX-1 y LOX-2 son consistentes con los encontrados en la bibliografía para otros materiales vegetales.

Entre las características que diferencian claramente a los isoenzimas de LOX de garbazo está su diferente estabilidad térmica. La pérdida de solubilidad, y por consiguiente la inactivación enzimática, que experimentan LOX-1 y LOX-2 cuando son incubados a diferentes temperaturas demuestran una mucho más alta estabilidad de LOX-1 frente a la desnaturalización térmica que LOX-2 (Fig. 18). LOX-1, de acuerdo con las cinéticas de inactivación, posee un intervalo de estabilidad térmica superior en aproximadamente 10°C al que tiene LOX-2. Así, LOX-1 conserva íntegra su actividad enzimática cuando se incuba durante 1 h a 50°C , mientras que LOX-2 se inactiva totalmente en 45 min a la misma temperatura.

Las diferencias anteriores quedan también reflejadas en la estabilidad que presentan estos isoenzimas durante su almacenamiento. La presencia de agentes protectores en las disoluciones enzimáticas, así como el uso de bajas temperaturas, se hace necesaria para preservar la actividad LOX. Ambos isoenzimas en tampón fosfato sufren inactivación por desnaturalización a lo largo del tiempo, insolubilizándose incluso a temperaturas de 4°C con pérdida total de la actividad enzimática antes de los 15 días de almacenamiento a dicha temperatura. En estos estudios de estabilidad LOX-1 se muestra como el isoenzima más estable, y así, en determinadas condiciones (etilenglicol 45% y conservación a -25°C), este isoenzima llega a presentar un tiempo de actividad media de 340 días, mientras que las mejores condiciones de conservación para LOX-2 (etilenglicol 25% y 4°C) lugar a un tiempo de actividad media de 95 días.

Los iones metálicos tienen diferentes efectos sobre los isoenzimas de LOX de garbanzo (Tabla V), observándose en general una mayor inactivación enzimática en el caso de LOX-2. Este isoenzima es totalmente inactivado por Hg^{2+} 1mM en 24 h de incubación, sufriendo asimismo un alto grado de inactivación enzimática con Cu^{2+} (90%), Fe^{3+} (63%) y Mn^{2+} (72%). LOX-1, aún siendo mucho más estable que LOX-2, es también parcialmente inactivado (aproximadamente un 15%) por los tres primeros iones metálicos anteriormente citados. Al contrario que LOX-2, LOX-1 es débilmente activado por algunos iones metálicos como los alcalino-térreos, pero destacando sobre ellos la activación producida por el Mn^{2+} (7%). La inactivación debida al Hg^{2+} da idea del grado de implicación que tienen los grupos tiólicos de los isoenzimas en mantener una conformación proteica activa o su participación en el sitio activo del isoenzima. Los resultados sugieren que en LOX-2 los grupos -SH están más implicados en la catálisis enzimática que en LOX-1. Unos resultados muy similares, que corroboran los anteriormente descritos, se obtienen cuando los isoenzimas son tratados con compuestos que reaccionan específicamente con estos grupos tiólicos como el, IAA y *p*-HMB. Con el último se comprueba que, aún pudiendo no ser un aminoácido esencial en la catálisis, la cisteína está más implicada en mantener una conformación activa del sitio catalítico de LOX-2 que de LOX-1. Yamamoto *et al.* (1970) observaron que los cationes divalentes ejercen efectos inhibitorios sobre la reacción catalizada por el isoenzima "a" de soja, mientras que el isoenzima "b" mostraba una estimulación por dichos cationes. Truong y Mendoza (1982) demostraron también unos efectos diferentes sobre los isoenzimas de LOX de judía china, con una menor inhibición de la actividad enzimática del isoenzima L-2 frente al L-1. Efectos similares de inhibidores y activadores se han comprobado con LOX de otros materiales vegetales (Shastry y Rao, 1975; Truong *et al.*, 1982).

Los isoenzimas de LOX de garbanzo, en agua desionizada, presentan en sus espectros UV-Vis sendos máximos de absorción localizados a 279 nm (Fig. 20) correspondientes a la absorción de los residuos de triptófano y en menor medida a los de tirosina. El análisis de aminoácidos de ambas proteínas revelan un mayor número de residuos de triptófano para LOX-1

(Tabla VII), lo que justifica el mayor coeficiente de extinción molar de éste último. En cambio, la relación existente entre coeficiente de extinción molar y número de residuos de triptófano no es igual en ambas proteínas, siendo mayor para LOX-2. Esto sugiere una estructura más abierta de este último isoenzima que da lugar a un menor apantallamiento de los residuos de triptófano. Este efecto está justificado por el más alto número de residuos de prolina, aminoácido que se caracteriza por desestabilizar la estructura secundaria en α -hélice y por tanto contribuir a la formación de una estructura terciaria menos compacta (Balaji *et al.*, 1986).

Por otra parte, los espectros UV-Vis de ambos isoenzimas no presentan prácticamente absorción en la región entre 300 y 800 nm. Esto indica que el átomo de hierro presente en los isoenzimas de LOX de garbanzo no es hemínico, ya que no aparecen las características bandas de absorción de Soret, de gran intensidad en las proteínas que contienen un sistema hemo como grupo prostético y cuyos máximos se sitúan sobre 400 nm (γ), 550 nm (β) y 600 nm (α). Asimismo, esta inexistencia de absorción en la región 300-800 nm también sugiere la ausencia de agrupaciones sulfoféricas del tipo de la que se encuentra en la ferredoxina, que presenta unos máximos de absorción característicos a 325, 420 y 463 nm. La zona de unión del hierro en los isoenzimas de LOX es posible que se componga de una agrupación de 4 histidinas en disposición planar alrededor del átomo de hierro, mientras que las dos posiciones axiales serían las encargadas del transporte electrónico entre sustrato y oxígeno/radical peroxilo como se ha postulado en los isoenzimas de LOX de soja (Shibata *et al.*, 1988; Navaratnam *et al.*, 1988).

El efecto que presentan los reactivos específicos para grupos tiólicos sobre LOX-1 y LOX-2, especialmente la acción desactivadora del *p*-HMB, apoyaría la participación de residuos de cisteína en el sitio activo del enzima. Esta inactivación nunca es total en ninguno de los dos isoenzimas, 30% para LOX-1 y 75% para LOX-2 (Fig. 31). Así pues, la participación de la cisteína sería más bien a nivel estructural, contribuyendo a mantener una disposición activa de la agrupación His-Fe en

la proteína, y no a nivel de la cadena de transporte electrónico hipotetizado por algunos autores (Spaapen *et al.*, 1980).

En base a la filtración en gel, tanto LOX-1 como LOX-2 exhiben un peso molecular aparente de 96336 Da, calculándose un radio hidrodinámico de 38.12 Å para ambos. La movilidad relativa de LOX-1 y LOX-2 en geles de gradiente de poliacrilamida 7-20% y SDS corresponde a las características de proteínas con peso molecular de 97000 Da. Unos resultados idénticos se obtuvieron después del tratamiento de las proteínas con β -mercaptoetanol 5% (v/v) y SDS 2% (p/v), por lo que es bastante probable que ambas proteínas de garbanzo no consistan en subunidades conectadas por puentes disulfuro. La similitud de los valores obtenidos por los dos métodos sugieren que LOX-1 y LOX-2 están formados por una única cadena polipeptídica de alrededor de 97000 Da de peso. Por el contrario, en base a su composición en aminoácidos (Tabla VII) se ha calculado un peso molecular mínimo para LOX-1 de 85725 Da y 84313 Da para LOX-2, que son significativamente diferentes al obtenido por la combinación de los métodos hidrodinámicos y electroforéticos. Esta diferencia entre los pesos moleculares calculados es bastante común encontrarla en el estudio de LOX. Así, los isoenzimas de L-1, L-2 y L-3 de soja presentan unos pesos moleculares en base a su composición en aminoácidos de 94038, 97035 y 96541 Da respectivamente (Shibata *et al.*, 1987 y 1988) frente a los 100000-108000 Da encontrados por otros métodos (Stevens *et al.*, 1970; Christopher *et al.*, 1972). De la misma forma, LOX de aguacate presenta un peso molecular de 74000 Da por filtración en gel y 61200 Da en función de su composición en aminoácidos (Marcus *et al.*, 1988). En cualquier caso, el valor calculado para el peso molecular de ambos isoenzimas de LOX de garbanzo son totalmente coherentes en general con los recogidos en la bibliografía para LOX de diferentes materiales vegetales, y en particular con el valor de 95000 Da para los dos isoenzimas de LOX de garbanzo variedad Annegeri-I en base a métodos hidrodinámicos (Borthakur *et al.*, 1988). También lo es su composición monomérica, cuestionada en principio por Stevens *et al.* (1970) que proponían dos subunidades de 50000 Da para el isoenzima L-1 de soja. Los trabajos de Shibata *et al.* (1987 y 1988) demuestran que en el caso de L-1 de soja, esta proteína se compone de una

única cadena polipeptídica, lo cual indicaría la existencia de un error experimental en los resultados de Stevens *et al.* (1970).

Igualmente coherentes son los valores de puntos isoeléctricos encontrados para ambas isoenzimas de LOX de garbanzo por cromatoenfoque en FPLC /Mono P en el rango de pH 3.95-6.35. LOX-1 presenta un pI de 4.92, mientras que el valor para LOX-2 es de 4.74. En la siguiente tabla se muestran algunos valores publicados para diferentes materiales vegetales:

Material	pI	Referencia
Soja L-1	5.68	Christopher <i>et al.</i> , 1972
L-2	5.25	"
L-3	5.15	"
Guisante L-1	4.05	Reynolds y Klein, 1982a
L-2	5.82	" , 1982b
L-3	6.25	"
Aguacate	5.90	Marcus <i>et al.</i> , 1988
Garbanzo LOX-1	4.92	Este trabajo
LOX-2	4.74	"

Una comparación de la composición de aminoácidos de LOX-1 y LOX-2 de garbanzo (Tabla VII) con las publicadas para otras LOXs como garbanzo variedad Annegeri-I (Bothakur *et al.*, 1988), soja (Stevens *et al.*, 1970), haba (Nicolas y Dracon, 1977), guisante (Eriksson y Svensson, 1970), arroz (Ohta *et al.*, 1986) y aguacate (Marcus *et al.*, 1988) muestran de forma global una moderada similitud entre ellas. En las isoenzimas de LOX de garbanzo, el porcentaje molar de aminoácidos básicos y ácidos, 14% y 18% para LOX-1 y 14% y 17% para LOX-2 respectivamente, es en general algo menor que el encontrado en las LOXs vegetales citadas anteriormente, aunque coincide en el porcentaje de aminoácidos básicos con las isoenzimas de la variedad Annegeri-I de garbanzo. Una segunda diferencia con otras

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal compuesto por los señores firmantes
en el día de la fecha, para otorgar el Título Doctoral de
D. Luis Carlos Saura Martínez
Título: Porfirinas y Carbonización de Isoenzimas
de lipoxigenasa en barbanos (Cuer Sicilianum)
Var. Petronillana
se acordó otorgarle la correspondiente Apto "cum laude"
por unanimidad

Sevilla, 8 de Octubre de 1992

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente

El Secretario.

El Decano,