

+ / 217

**RUTA DE LA LIPOXIGENASA EN  
ACEITUNA: CONTRIBUCIÓN A LA  
BIOGÉNESIS DEL AROMA DEL ACEITE  
DE OLIVA**



Joaquín J. Salas Liñán

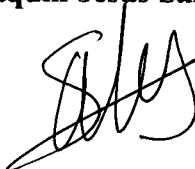
Sevilla, 1998

11 68354

+717

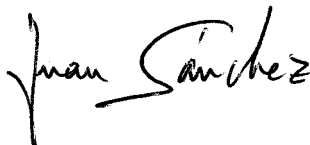
# RUTA DE LA LIPOXIGENASA EN ACEITUNA: CONTRIBUCIÓN A LA BIOGÉNESIS DEL AROMA DEL ACEITE DE OLIVA.

Trabajo presentado para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Químicas por el Licenciado  
**Joaquín Jesús Salas Liñán**



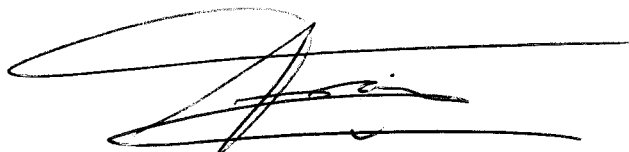
Sevilla, Octubre de 1998

El director:



**Dr. Juan Sánchez García**  
Colaborador Científico del CSIC

El Tutor:



**Dr. Francisco Galván Cejudo**  
Profesor titular de Bioquímica y Biología Molecular

87 25

Sevilla, **18 NOV 1998**

El Jefe del Departamento de Teoría



A mis padres y a mi hermano.

A Inma.

## Agradecimientos.

Esta tesis ha sido realizada en el departamento de fisiología vegetal del Instituto de la Grasa de Sevilla (CSIC). Al director del centro, Dr. José Manuel Olías y al del departamento, Dr. Francisco Millán, les agradezco los medios puestos a mi disposición además de su cordial acogida e interés por mi trabajo. Así mismo, quiero dar las gracias al Dr. Juan Sánchez García, director de esta tesis, por toda su ayuda, enseñanzas y consejos en el ámbito científico, así como por la amistad que me ha brindado a nivel personal.

También me gustaría agradecer de forma especial :

La colaboración prestada por los doctores Luis Carlos Sanz, Manuel Alaiz, Ramón Aparicio y María Teresa Morales durante todos estos años de trabajo.

El apoyo y camaradería de todos los becarios y personal del Instituto de la Grasa, especialmente los de la segunda planta, con los que he compartido inolvidables desayunos y sobremesas.

Por otra parte, quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a los miembros de mi familia, especialmente a mi hermano Emilio, por contagiarme su estimulante alegría, a mis padres Rafael y M<sup>a</sup> Jesús, por su constante ayuda y comprensión, y sobre todo a Inma. Inma, gracias a tu amor estos años han sido sin duda los más felices de mi vida.

El presente trabajo ha sido financiado por la Unión Europea, como parte del proyecto AIR3-CT94-1967.

# ÍNDICES

**I. ÍNDICE GENERAL**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. EL AROMA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN .....	1
1.2. RUTA DE LA LIPOXIGENASA EN PLANTAS. GENERALIDADES .....	2
1.3. RUTA DE LA LIPOXIGENASA Y BIOSÍNTESIS DE VOLÁTILES .....	4
1.4. ACIL-HIDROLASAS .....	5
1.5. LIPOXIGENASA .....	7
1.5.1. Otros productos y reacciones .....	8
1.5.2. Fuentes de lipoxigenasa, distribución en el reino vegetal y clasificación .....	9
1.5.3. Distribución de la Lipoxigenasa entre los órganos de la planta .....	10
1.5.4. Distribución subcelular .....	11
1.5.5. Especificidad de sustrato .....	12
1.5.6. Regioespecificidad .....	13
1.5.7. Parámetros cinéticos .....	13
1.6. HIDROPERÓXIDO LIASA .....	14
1.6.1. Distribución dentro del reino vegetal .....	15
1.6.2. Distribución subcelular .....	16
1.6.3. Especificidad de sustrato .....	16
1.6.4. Parámetros cinéticos .....	17
1.7. ISOMERIZACIÓN DE ENALES .....	18
1.8. ALCOHOL DESHIDROGENASA .....	19
1.9. ALCOHOL ACILTRANSFERASA .....	20
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	25
2.2. APARATOS .....	25
2.2.1. Centrífugas .....	25
2.2.2. Espectrofotómetros .....	25
2.2.3. Medidas de radiactividad .....	25
2.2.4. Cromatografía .....	26
2.2.4.1. Cromatografía gas-líquido (CGL) .....	26
2.2.4.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) .....	27
2.2.4.3. Purificación de enzimas .....	27
2.3. PRODUCTOS .....	27
2.3.1. Cromatografía en capa fina .....	27
2.3.2. Columnas de extracción y desalado .....	27

2.3.3. Precursores radiactivos .....	27
2.3.4. Enzimas .....	28
2.3.5. Otros .....	28
<b>2.4. FRACCIONAMIENTO Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO .....</b>	<b>28</b>
2.4.1. Cromatografía en capa fina de gel de sílice. Procedimiento general .....	28
2.4.1.1. Cromatografía en capa fina analítica .....	28
2.4.1.2. Cromatografía en capa fina preparativa .....	29
2.4.2. Análisis de volátiles por cromatografía de gases .....	29
2.4.2.1. Inyección del espacio de cabeza .....	29
2.4.3. Análisis y separación preparativa de hidroperóxidos por HPLC .....	30
2.4.3.1. Análisis de ésteres metílicos de hidroperóxidos .....	30
2.4.3.2. Separación preparativa de hidroperóxidos libres .....	30
<b>2.5. PREPARACIÓN DE SUBSTRATOS Y SUBSTANCIAS PATRONES .....</b>	<b>31</b>
2.5.1. Reacciones de derivatización .....	31
2.5.1.1. Metilación .....	31
2.5.1.2. Reducción de hidroperóxidos .....	31
2.5.1.3. Preparación de 2,4-dinitrofenilhidrazonas (DNPHZ) de aldehídos .....	31
2.5.2. Hidroperóxidos .....	32
2.5.2.1. Reacción de oxidación .....	32
2.5.2.2. Extracción en fase sólida .....	33
2.5.2.3. Purificación de los hidroperóxidos .....	33
2.5.3. Oxoácidos .....	33
2.5.3.1. Ácido 12-oxododec-9(Z)-enoico .....	33
2.5.3.2. Ácido 9-oxononanoico .....	35
2.5.4. Preparación de las sales potásicas de ácidos grasos e hidroperóxidos .....	36
2.5.4.1. Preparación de las sales potásicas de ácidos grasos .....	36
2.5.4.2. Preparación de las sales potásicas de hidroperóxidos .....	36
2.5.5. Acetato de isoamilo marcado .....	37
<b>2.6. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMATICOS .....</b>	<b>37</b>
2.6.1. Preparación de extractos de frutos frescos .....	37
2.6.2. Distribución histológica .....	38
2.6.3. Preparación de polvo acetónico de pulpa de aceitunas .....	39
2.6.4. Preparación de extractos de polvo acetónico .....	40
2.6.5. Fraccionamiento de la proteína soluble con sulfato amónico .....	40
2.6.6. Preparación de lipoxigenasa de patata .....	41
2.6.7. Cambio de solvente de fracciones enzimáticas .....	41
<b>2.7. INCUBACIONES CON SUBSTRATOS RADIATIVOS .....</b>	<b>41</b>
2.7.1. Experimentos de marcaje con [1- <sup>14</sup> C]-linoleato .....	41
2.7.1.1. Extracción de lípidos .....	42
2.7.1.2. Fraccionamiento de lípidos .....	42
2.7.1.3. Estudios de especificidad .....	43
2.7.2. Experimentos de marcaje con [U- <sup>14</sup> C]-linoleato .....	43
<b>2.8. ENSAYOS ENZIMÁTICOS .....</b>	<b>44</b>
2.8.1. Lipoxigenasa .....	44

2.8.1.1. Método espectrofotométrico de Axelrod <i>et al.</i> (1981)	44
2.8.1.2. Método espectrofotométrico de Jiang <i>et al.</i> (1991)	45
2.8.2. Hidroperóxido liasa	46
2.8.2.1. Medida de la destrucción del dieno conjugado	46
2.8.2.2. Medida de la formación de hexanal	47
2.8.3. Alcohol deshidrogenasa	47
2.8.4. Alcohol aciltransferasa	48
<b>2.9. PURIFICACIÓN DE ENZIMAS</b>	<b>48</b>
2.9.1. Purificación de la hidroperóxido liasa	49
2.9.1.1. Preparación y solubilización de la enzima	49
2.9.1.2. Cromatografía de intercambio iónico	49
2.9.1.3. Cromatografía en hidroxilapatito	49
2.9.2. Purificación de la alcohol deshidrogenasa	50
2.9.2.1. Preparación del extracto y concentración de la actividad	50
2.9.2.2. Purificación por cromatografía de intercambio iónico	50
2.9.2.3. Purificación por cromatografía de afinidad	51
<b>2.10. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA Y CLOROFILA</b>	<b>51</b>
2.10.1. Determinación de proteína	51
2.10.1.1. Método de Bradford (1976)	52
2.10.1.2. Método de Dulley y Grieve (1975)	52
2.10.2. Determinación de clorofila	52
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
<b>3.1. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD GLOBAL DE LA RUTA DE LA LIPOXIGENASA: EXPERIMENTOS CON PRECURSORES RADIACTIVOS</b>	<b>55</b>
3.1.1. Experimentos de marcaje con [1- <sup>14</sup> C]-linoleato	55
3.1.1.1. Influencia del tiempo de incubación	56
3.1.1.2. Efecto del pH del medio	57
3.1.1.3. Estudios de especificidad de sustrato y posición	58
3.1.1.4. Influencia de la temperatura	61
3.1.2. Experimentos de marcaje con [U- <sup>14</sup> C]-18:2	63
3.1.2.1. Experimentos de control	67
3.1.2.2. Curva de sustrato	68
3.1.2.3. Curva de temperatura	68
<b>3.2. LIPOXIGENASA DE PULPA DE ACEITUNA</b>	<b>71</b>
3.2.1. Actividad lipoxigenasa en extractos crudos	71
3.2.2. Distribución subcelular de la lipoxigenasa	72
3.2.3. Distribución histológica de la lipoxigenasa	73
3.2.4. Curvas de pH	75
3.2.5. Especificidad de sustrato de la lipoxigenasa	76
3.2.6. Oxidación de ácidos grasos esterificados	78
3.2.7. Regioespecificidad de la lipoxigenasa	80
3.2.8. Curva de temperatura de la lipoxigenasa	82
3.2.9. Cambios en la actividad lipoxigenasa durante el desarrollo de los frutos	84



3.3. HIDROPERÓXIDO LIASA.....	86
3.3.1. Actividad hidropéroxido liasa en extractos crudos .....	87
3.3.2. Localización subcelular de la hidropéroxido liasa .....	88
3.3.3. Distribución histológica de la hidropéroxido liasa .....	90
3.3.4. Purificación de la hidropéroxido liasa .....	91
3.3.4.1. Purificación por cromatografía de intercambio iónico .....	92
3.3.4.2. Purificación por cromatografía en hidroxilapatito.....	94
3.3.5. Especificidad de sustrato de las hidropéroxido liasas de pulpa de aceituna.....	95
3.3.6. Parámetros cinéticos de la hidropéroxido liasa .....	97
3.3.7. Curvas de pH de las hidropéroxido liasas de pulpa de aceituna .....	99
3.3.8. Curva de temperatura de la hidropéroxido liasa.....	100
3.3.8. Cambios en la actividad hidropéroxido liasa a lo largo del desarrollo de los frutos .....	102
3.4. ALCOHOL DESHIDROGENASA.....	104
3.4.1. Purificación de las alcohol deshidrogenasas .....	105
3.4.1.1. Purificación por cromatografía de intercambio iónico .....	105
3.4.1.2. Purificación por cromatografía de afinidad.....	105
3.4.2. Parámetros cinéticos de las alcohol deshidrogenasas de aceituna.....	108
3.4.3. Especificidad de sustrato de las alcohol deshidrogenasas de aceituna .....	111
3.4.4. Curva de pH de la NADP-alcohol deshidrogenasa II.....	113
3.4.5. Evolución de la actividad NADP-alcohol deshidrogenasa II a lo largo del desarrollo de los frutos.....	113
3.6. ALCOHOL ACILTRANSFERASA .....	115
3.6.1. Optimización del ensayo de actividad de la alcohol aciltransferasa .....	117
3.6.1.1. Influencia de la cantidad de extracto enzimático.....	117
3.6.1.2. Influencia del tiempo de incubación.....	117
3.6.2. Parámetros cinéticos .....	118
3.6.3. Curva de pH de la alcohol aciltransferasa.....	120
3.6.4. Especificidad de sustrato de la alcohol aciltransferasa.....	121
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>125</b>
<b>VI. REFERENCIAS.....</b>	<b>131</b>

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Cromatograma de los compuestos volátiles del aceite de oliva virgen.....	2
<b>Figura 1.2.</b> Esquema general de la ruta de la lipoxigenasa .....	3
<b>Figura 1.3.</b> Oxidación de ácidos grasos catalizada por la lipoxigenasa.....	7
<b>Figura 1.4.</b> β-Escisión de hidroperóxidos catalizada por la lipoxigenasa.....	9
<b>Figura 1.5.</b> Lisis de hidroperóxidos catalizada por la hidroperóxido liasa.....	15
<b>Figura 1.6.</b> Reducción de hexanal catalizada por la alcohol deshidrogenasa.....	20
<b>Figura 1.7.</b> Síntesis de acetato de hexilo catalizada por la alcohol aciltransferasa.....	21
<b>Figura 2.1.</b> Esquema del equipo de CGL para análisis de muestras radiactivas .....	26
<b>Figura 2.2.</b> Producción del ácido 12-oxo-9(Z)-dodecenoico.....	34
<b>Figura 2.3.</b> Protocolo de fraccionamiento del extracto crudo de aceituna .....	39
<b>Figura 3.1.</b> Influencia del tiempo de incubación sobre la metabolización de [1- <sup>14</sup> C]-linoleato por parte de polvo acetónico de aceitunas .....	56
<b>Figura 3.2.</b> Influencia del pH sobre la metabolización de [1- <sup>14</sup> C]-linoleato por parte de polvo acetónico de aceitunas .....	58
<b>Figura 3.3.</b> Cromatografía en capa fina de los productos de incubación de polvo acetónico con [1- <sup>14</sup> C]-linoleato .....	60
<b>Figura 3.4.</b> Efecto de la temperatura sobre la metabolización de [1- <sup>14</sup> C]-linoleato por parte de polvo acetónico de aceitunas.....	62
<b>Figura 3.5.</b> Reparto de compuestos volátiles entre las fases gaseosa y acuosa.....	65
<b>Figura 3.6.</b> Efecto de la concentración de sustrato sobre la incorporación de [U- <sup>14</sup> C]-linoleato en hexanal.....	69
<b>Figura 3.7.</b> Efecto de la temperatura sobre la incorporación de [U- <sup>14</sup> C]-linoleato en hexanal .....	70
<b>Figura 3.8.</b> Curvas de pH de la lipoxigenasa de aceituna.....	76
<b>Figura 3.9.</b> Oxidación de dilinoleoil fosfatidilcolina catalizada por la lipoxigenasa de aceituna.....	79
<b>Figura 3.10.</b> Curva de temperatura de la lipoxigenasa de aceituna .....	83

<b>Figura 3.11.</b> Cambios en la actividad lipoxigenasa durante el desarrollo del de la aceituna .....	85
<b>Figura 3.12.</b> Comparación de los métodos de ensayo de la hidropéroxido liasa.....	88
<b>Figura 3.13.</b> Purificación de la hidropéroxido liasa por cromatografía de intercambio iónico.....	92
<b>Figura 3.14.</b> Purificación de la hidropéroxido liasa por cromatografía en hidroxilapatito .....	93
<b>Figura 3.15.</b> Curvas de substrato de las hidropéroxido liasas de aceituna .....	98
<b>Figura 3.16.</b> Curvas de pH de las hidropéroxido liasas de aceituna .....	100
<b>Figura 3.17.</b> Curva de temperatura de la hidropéroxido liasa de aceituna .....	101
<b>Figura 3.18.</b> Cambios en la actividad hidropéroxido liasa durante el desarrollo de la aceituna.....	103
<b>Figura 3.19.</b> Purificación de la alcohol deshidrogenasas de aceituna por cromatografía de intercambio iónico.....	106
<b>Figura 3.20.</b> Purificación de las alcohol deshidrogenasas de aceituna por cromatografía de afinidad .....	107
<b>Figura 3.21.</b> Curvas de concentración de hexanal de las alcohol deshidrogenasas de aceituna.....	110
<b>Figura 3.22.</b> Curva de pH de la NADP-alcohol deshidrogenasa II.....	114
<b>Figura 3.23.</b> Cambios en la actividad NADP-alcohol deshidrogenasa II durante el desarrollo de la aceituna.....	114
<b>Figura 3.24.</b> Influencia de la concentración de extracto enzimático sobre la actividad alcohol aciltransferasa de aceituna .....	116
<b>Figura 3.25.</b> Influencia del tiempo de incubación sobre la reacción catalizada por la alcohol aciltransferasa de aceituna.....	116
<b>Figura 3.26.</b> Curva de concentración de hexanol de la alcohol aciltransferasa de ceituna .....	119
<b>Figura 3.27.</b> Curva de pH de la alcohol aciltransferasa de aceituna .....	120

### III. ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 3.1.</b> Composición de las fracciones de hidroperóxidos y oxoácidos producidas a partir de [1- <sup>14</sup> C]-linoleato por polvo acetónico de aceitunas.....	59
<b>Tabla 3.2.</b> Relación entre las concentraciones en la fase vapor y la fase acuosa para varios compuestos volátiles.....	66
<b>Tabla 3.3.</b> Producción de compuestos volátiles a partir de [U- <sup>14</sup> C]-linoleato, experimento de control .....	67
<b>Tabla 3.4.</b> Distribución subcelular de la lipoxigenasa de aceituna .....	73
<b>Tabla 3.5.</b> Distribución histológica de la lipoxigenasa de aceituna.....	74
<b>Tabla 3.6.</b> Especificidad de sustrato de la lipoxigenasa de aceituna.....	77
<b>Tabla 3.7.</b> Comparación de las velocidades de oxidación de ácidos grasos libres y esterificados por parte de lipoxigenasa de aceituna.....	80
<b>Tabla 3.8.</b> Regioespecificidad de la lipoxigenasa de aceituna.....	82
<b>Tabla 3.9.</b> Distribución subcelular de la hidroperóxido liasa de aceituna.....	89
<b>Tabla 3.10.</b> Distribución histológica de la hidroperóxido liasa de aceituna.....	91
<b>Tabla 3.11.</b> Tabla de purificación de la hidroperóxido liasa de aceituna .....	94
<b>Tabla 3.12.</b> Especificidad de sustrato de las hidroperóxido liasas de pulpa de aceituna .....	96
<b>Tabla 3.13.</b> Parámetros cinéticos de las hidroperóxido liasas de pulpa de aceituna .....	99
<b>Tabla 3.14.</b> Purificación de las alcohol deshidrogenasas de aceituna.....	108
<b>Tabla 3.15.</b> Parámetros cinéticos para el hexanal de las alcohol deshidrogenasas de aceituna.....	109
<b>Tabla 3.16.</b> Parámetros cinéticos de la NADP-alcohol deshidrogenasa II para varios sustratos.....	109
<b>Tabla 3.17.</b> Especificidad de sustrato de las alcohol deshidrogenasas de aceituna .....	112
<b>Tabla 3.18.</b> Parámetros cinéticos de la alcohol aciltransferasa de aceituna .....	118
<b>Tabla 3.19.</b> Especificidad de sustrato de la alcohol aciltransferasa de aceituna...	121

#### **IV. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.**

[1- <sup>14</sup> C]-18:2	Ácido linoleico marcado en el carbono uno.
[U- <sup>14</sup> C]-18:2	Ácido linoleico uniformemente marcado.
13-ZE-HPL	Ácido 13-ZEZ-hidroperoxilinoico.
13-ZEZ-HPLN	Ácido 13-ZEZ-hidroperoxilinoico.
AAT	Alcohol aciltransferasa.
ADH	Alcohol deshidrogenasa.
BHT	2,6-Bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol.
C6	De seis átomos de carbono.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CGL	Cromatografía gas-líquido.
CHES	Ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico.
DNPZH	2,4-Dinitrofenilhidrazona.
DTE	2,3-Dihidroxi-butano-1,4-ditiol.
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis-nitrobenzoico.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
FID	Detector de ionización de llama.
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico).
HPL	Hidroperóxido liasa.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
LOX	Lipoxigenasa.
MES	Ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico.
PEG-400	Polietilenglicol-400.
PF	Peso fresco.
PIPES	Ácido Piperazina-N,N'-bis-(2-etanosulfónico).
PVPP	Polivinilpolipirrolidona.
SDF	Semanas después de la floración.
TRICINA	N-Tris(hidroximetil)metilglicina.
TRIS	(TRIZMA BASE) Tris(hidroximetil)aminometano.

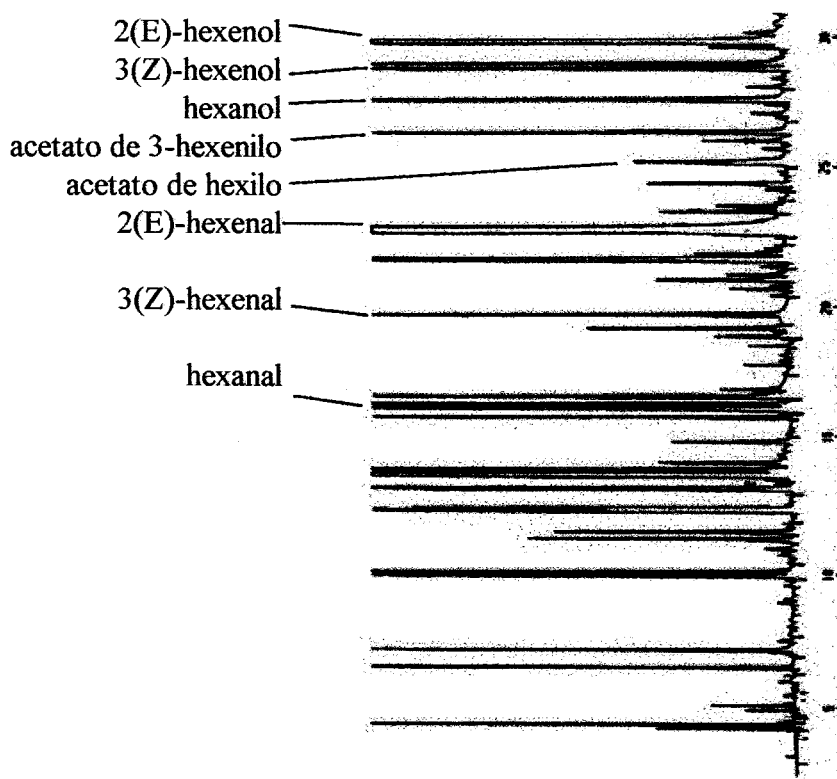
# **I. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. EL AROMA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.

A diferencia de otros aceites vegetales, el aceite de oliva virgen se extrae por métodos exclusivamente físicos de frutos frescos (Alba, 1997), constituyendo un zumo natural de notables características nutricionales y organolépticas. Por no sufrir refinación, este aceite conserva su aroma natural, uno de los parámetros más apreciados por sus consumidores. Dicho aroma está formado por una compleja mezcla de compuestos volátiles, entre los que se encuentran aldehídos, ésteres, alcoholes, hidrocarburos y cetonas, que han sido separados y caracterizados por GC-MS (Morales *et al.*, 1994, Figura 1.1). De todos estos compuestos los más importantes cuantitativamente son aldehídos, alcoholes y ésteres de alcoholes de seis átomos de carbono, los cuales dan cuenta de entre el 80 y el 90% del total de la fracción de volátiles del aceite (Olías *et al.*, 1980; Morales *et al.*, 1995; Ranalli y De Mattia, 1997). Estos compuestos son comunes a otras especies y productos vegetales, y son responsables de lo que se ha denominado "olor verde", por su presencia en alta proporción en homogenados de hojas frescas (Hatanaka, 1993).

Está bien establecido por experimentos de marcaje que esta serie de sustancias volátiles se producen a partir de ácidos grasos poliinsaturados a través de la cascada de reacciones conocida como *ruta de la lipoxigenasa* (Hatanaka *et al.*, 1987). Esta ruta se induce con la rotura de los tejidos, implicando la acción de una serie de enzimas que degradan los ácidos grasos poliinsaturados (lipoxigenasa, hidroperóxido liasa), y otras que modifican los productos de dicha degradación (alcohol deshidrogenasa, alcohol aciltransferasa).

En el caso del aceite de oliva virgen esta ruta se activa durante la molienda de los frutos y el batido de la pasta. Los volátiles así producidos se incorporan posteriormente al aceite confiriéndole su característico aroma. De esta forma, el aroma de un determinado aceite depende en gran medida de los niveles de actividad de las enzimas que componen la ruta mencionada, los cuales cambian en función de parámetros como la variedad o el estado de maduración de los frutos empleados en su elaboración (Olías *et al.*, 1980; Ranalli y De Mattia, 1997) y las condiciones utilizadas en la extracción del aceite (Angerosa *et al.*, 1998)



**Figura 1.1.** Cromatograma de los volátiles del espacio de cabeza de un aceite de oliva virgen extra cv. Arbequina (Morales *et al*, 1994).

## 1.2. RUTA DE LA LIPOXIGENASA EN PLANTAS. GENERALIDADES.

La ruta de la lipoxigenasa constituye, junto a la  $\alpha$ -oxidación,  $\beta$ -oxidación y  $\omega$ -oxidación una de las cuatro posibles vías de degradación de los ácidos grasos que desarrollan los seres vivos (Vick y Zimmerman, 1987). Esta ruta comienza con la introducción de una molécula de oxígeno en un ácido graso poliinsaturado por acción de la enzima lipoxigenasa para generar el correspondiente hidroperóxido (Galliard y Chan, 1980). En plantas, los substratos de esta enzima son generalmente ácido linoleico y ácido linolénico que han sido previamente liberados de los lípidos de membrana por acción de acil-hidrolasas (Burns *et al.*, 1980). Los hidroperóxidos producidos por la lipoxigenasa no se acumulan, sino que son



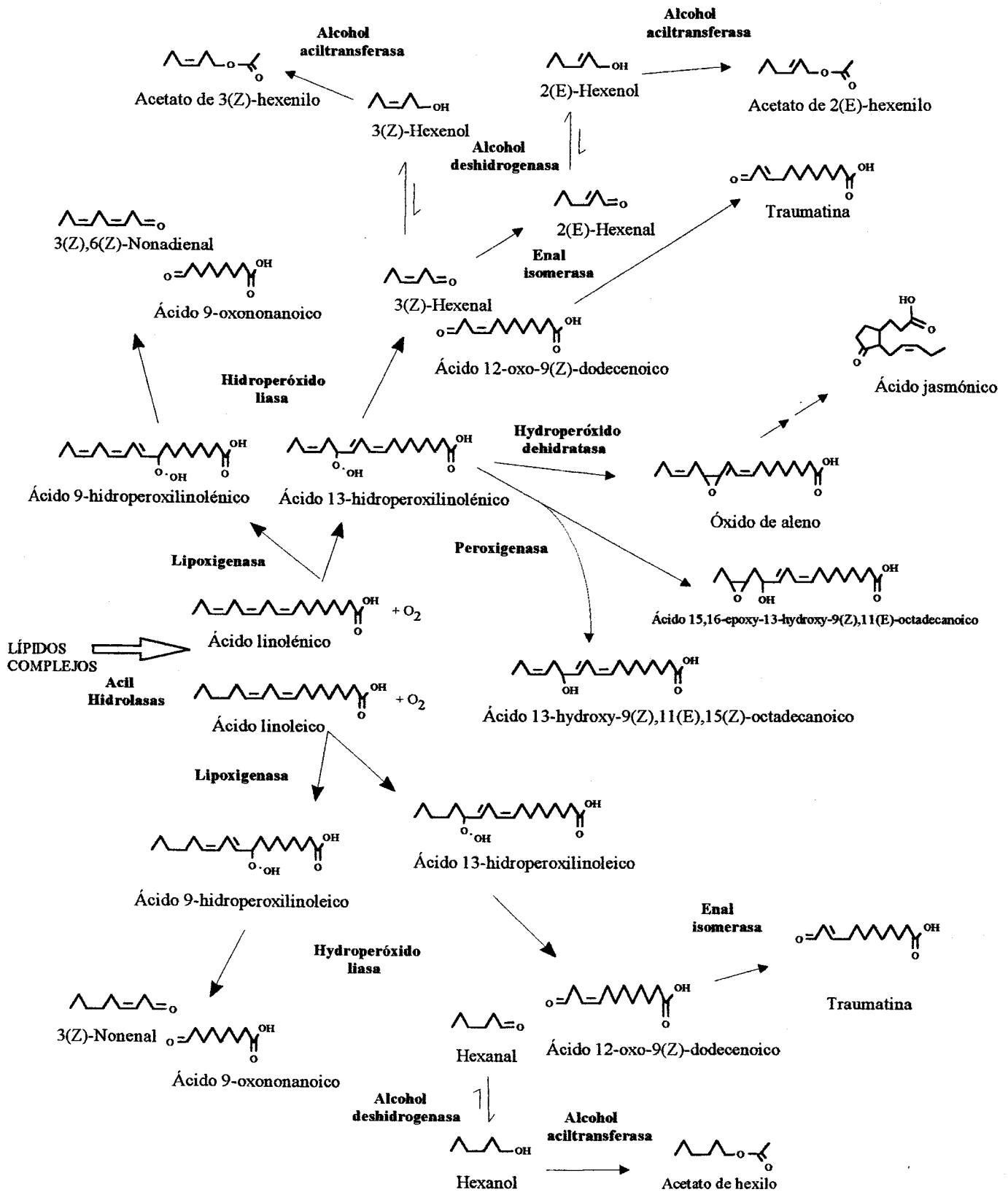


Figura 1.2. Esquema general de la ruta de la lipoxigenasa.

rápidamente degradados a través de diferentes vías para producir gran variedad de compuestos que se denominan colectivamente oxilipinas. Las principales rutas de degradación de hidroperóxidos son las de la hidroperóxido liasa (Vick y Zimmerman, 1976), que genera aldehidos volátiles y oxoácidos, la de la hidroperóxido dehidratasa (Song y Brash, 1991), que produce el correspondiente óxido de aleno, precursor de los jasmonatos, y la de la epoxidasa (Bleé y Schuber, 1993), que da lugar a ácidos grasos hidroxiepoxidados, precursores de la cutina (Figura 1.2).

A lo largo de toda la historia del estudio de la ruta de la lipoxigenasa se ha producido un claro desequilibrio entre las elucidaciones bioquímicas y estructurales realizadas, y las encaminadas a establecer su rol fisiológico. En los últimos años las técnicas de biología molecular desarrolladas a lo largo de la década de los 80 han permitido realizar un considerable avance en este último campo, de forma que hoy parece claro que esta ruta está relacionada con la respuesta al daño físico y defensa contra insectos y patógenos (Zimmerman y Coudron, 1979; Farmer y Ryan, 1992; Croft *et al.*, 1993; Scarpati *et al.*, 1993), regulación del crecimiento vegetativo, (Parthier, 1991), y mediación en las respuestas a diferentes tipos de estrés relacionados con el ácido absísico (Creelman *et al.*, 1992; Jensen *et al.*, 1997). Recientemente también se ha asociado a esta ruta con la regulación de la  $\beta$ -oxidación en semillas oleaginosas en germinación (Feussner *et al.*, 1995).

### **1.3. RUTA DE LA LIPOXIGENASA Y BIOSÍNTESIS DE VOLÁTILES.**

Uno de los aspectos que hace interesante a la ruta de la lipoxigenasa desde un punto de vista económico es ser la responsable de la biosíntesis de compuestos presentes en el aroma de gran número de alimentos (Gardner, 1989b; Robinson *et al.*, 1995), entre los cuales se encuentra el aceite de oliva virgen.

La rama de la ruta de la lipoxigenasa indiscutiblemente implicada en la biosíntesis de compuestos volátiles es la de la hidroperóxido liasa. Esta enzima actúa escindiendo los hidroperóxidos producidos por la lipoxigenasa en dos fragmentos carbonílicos (Vick y Zimmerman, 1976), un aldehido volátil y un oxoácido no volátil. Dependiendo de la

especificidad de sustrato de esta enzima los aldehídos generados son de seis o nueve átomos de carbono (Figura 1.2). En el primer caso dichos aldehídos dan lugar al llamado olor verde, típico de homogenados de hojas frescas (Hatanaka *et al.*, 1993), en el segundo caso originan el característico aroma de frutos como el pepino o la pera (Phillips y Galliard, 1978; Kim y Grosh, 1981). Los aldehídos producidos por la hidropéroxido liasa son susceptibles de transformación, generándose una amplia variedad de compuestos volátiles a partir de ellos. El cambio más directo lo experimentan los 3(Z)-enales producidos a partir del ácido linoléico, los cuales pueden isomerizarse a sus correspondientes 2(E)-enales por acción de una enal- isomerasa (Phillips *et al.*, 1979) o de un factor de isomerización no proteico (Hatanaka *et al.*, 1989). A continuación los aldehídos pueden ser reducidos a sus correspondientes alcoholes por mediación de las alcohol deshidrogenasas presentes en los tejidos de la planta (Yamashita *et al.*, 1976). Los alcoholes así producidos forman también parte del olor verde, siendo de especial importancia el 3(Z)-hexenol o alcohol de hoja. Finalmente, los alcoholes pueden reaccionar con acil-CoAs en un paso catalizado por la enzima alcohol aciltransferasa, para formar los correspondientes ésteres. Esta reacción se da típicamente en ciertos frutos como el plátano o la fresa (Harada *et al.*, 1985; Pérez *et al.*, 1993) así como en ciertas variedades de levadura (Minetoki *et al.*, 1993), generando los ésteres que forman parte de su aroma característico.

#### 1.4. ACIL-HIDROLASAS.

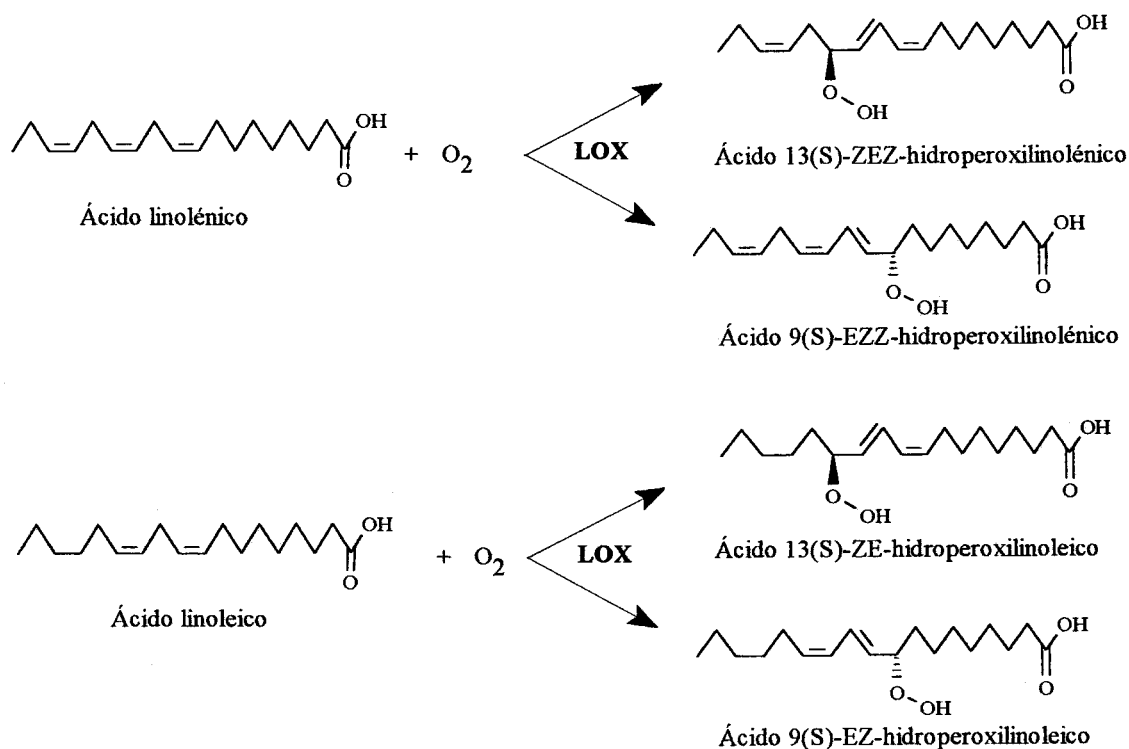
Los experimentos de marcaje realizados con precursores radiactivos indican que los aldehídos volátiles de seis átomos de carbono que dan lugar al olor verde, se producen a partir de ácidos grasos poliinsaturados libres (Hatanaka y Harada, 1973; Galliard y Phillips, 1976). Sin embargo la mayor parte de los ácidos grasos poliinsaturados que se hayan en plantas no se encuentran en estado libre, sino formando parte de lípidos de membrana (fosfolípidos, glicolípidos) o de reserva (triacilgliceroles). De esta forma, para que dichos ácidos grasos puedan ser metabolizados a través de la ruta de la lipoxigenasa han de ser previamente liberados de los glicerolípidos por acción de acil-hidrolasas, grupo de enzimas que incluyen a las lipasas, fosfolipasas y galactolipasas.

Estudios de la fracción lipídica tanto de hojas como de frutos durante la rotura de

tejidos han demostrado que se activan enzimas hidrolíticas que liberan fragmentos acílicos de las diferentes especies de glicerolípidos. En el caso de las hojas de té, después de homogeneizar durante 3 minutos más del 50% de los ácidos linoleico y linolénico fueron hidrolizados de los glicerolípidos, principalmente de la fracción neutra de los mismos, apareciendo simultáneamente un fuerte olor verde (Hatanaka *et al.*, 1976b). En el caso de los frutos de pepino se produjo un comportamiento similar, liberándose el 25% de los ácidos grasos esterificados después de 30 minutos de homogeneización de su pulpa, con una clara disminución en el contenido de galactolípidos, fosfolípidos y triacilgliceroles (Galliard *et al.*, 1976). En ningún caso se observó incremento de la fracción de ácidos grasos libres, indicando así una rápida metabolización de los mismos.

Dentro de las acil-hidrolasas, las más estudiadas en plantas son las lipasas (Huang, 1987; Henderson y Osborne, 1991), enzimas que hidrolizan triacilgliceroles. Otras acil-hidrolasas muestran especificidad por fosfolípidos o galactolípidos (Burns *et al.*, 1980) o por ambas clases simultáneamente dependiendo de la fuente (Hirayama *et al.*, 1975). La especificidad doble de una misma acil-hidrolasa también se ha observado para la hidrólisis de sulfolípidos y galactolípidos (Burns *et al.*, 1977).

En el caso de la aceituna, a pesar de ser un fruto con un alto contenido en triacilgliceroles, no cabe esperar que éstos suministren los ácidos grasos necesarios a la ruta de la lipoxigenasa debido a su bajo contenido en poliinsaturados. En consecuencia, los substratos para esta ruta deben de provenir de su fracción de lípidos polares, rica tanto en ácido linoleico como en ácido linolénico (Vioque y Maza, 1973; Mancha, 1974). Así, en experimentos realizados con extractos crudos de pulpa de aceituna, ésta mostró tanto actividad lipasa como fosfolipasa (Olías *et al.*, 1993). En dichos experimentos se incubaron los extractos de aceituna con triacilgliceroles procedentes de aceite de oliva y con fosfolípidos de soja, siendo liberados en el segundo caso una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados, demostrándose así que la pulpa de aceituna posee las enzimas necesarias para suministrar substratos específicos a la ruta de la lipoxigenasa.



**Figura 1.3.** Oxidación de ácidos grasos poliinsaturados catalizada por la lipoxigenasa.

## 1.5. LIPOXIGENASA.

La lipoxigenasa (linoleato:oxígeno oxidorreductasa, EC 1.13.11.12) cataliza la introducción de una molécula de oxígeno en el grupo 1(Z),4(Z)-pentadieno de un ácido graso poliinsaturado (linoleico o linolénico), para producir el correspondiente hidroperóxido. La molécula de oxígeno puede introducirse en las posiciones 13 o nueve de dichos ácidos grasos, transcurriendo la reacción con la migración y conjugación del doble enlace del carbono atacado, que adopta la configuración E al final de la reacción. Por otra parte, el carbono que recibe la nueva función oxigenada se transforma en un centro quiral, que adopta la configuración S (Figura 1.3).

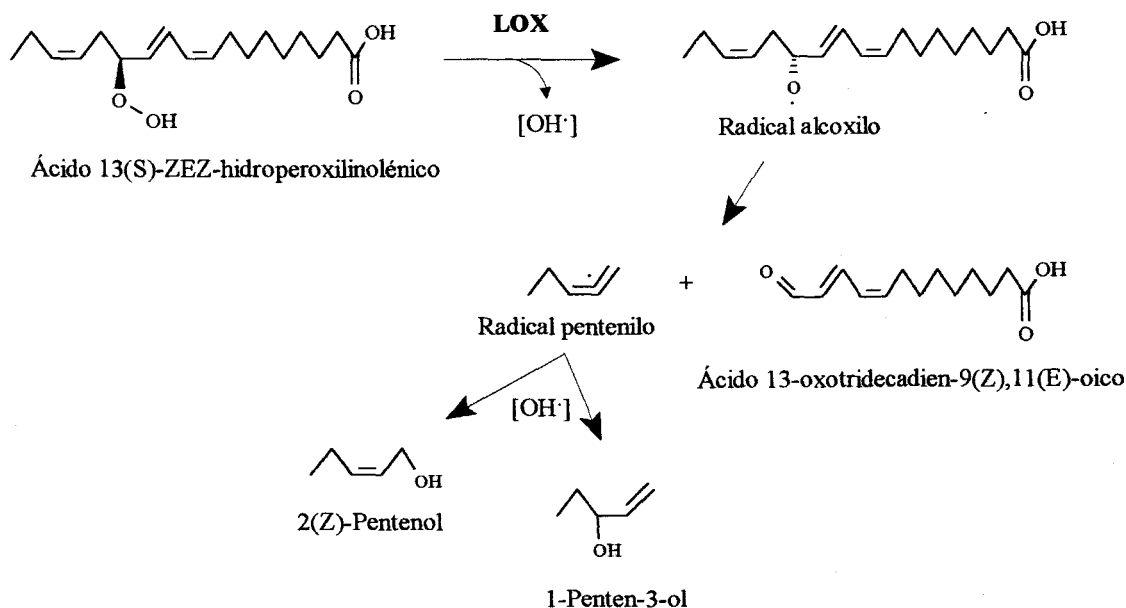
La lipoxigenasa (LOX), es la enzima más estudiada dentro de la ruta que lleva su nombre, habiéndose publicado hasta la fecha más de 50 revisiones sobre la misma (Hildebrand, 1989; Siedow, 1991; Gardner, 1991; Vick, 1993). Esta enzima fue puesta de manifiesto por primera vez hace más de 60 años (André y Hou, 1932), cuando se observó

que extractos proteínicos de semillas de soja catalizaban la oxidación de lípidos dependiente de oxígeno molecular. Más tarde se estableció que dicha actividad era capaz de producir la degradación de carotenos, con lo que se la denominó caroteno oxidasa (Sumner y Sumner, 1940), nombre que pasaría al más general de lipoxigenasa que ha llegado a nuestros días. La caracterización de los productos de esta enzima fue llevada a cabo durante las décadas de los 40 y 50 (Privett *et al.*, 1955), purificándose y cristalizándose por primera vez en 1947 (Theorell, 1947). En los años 70 se determinó la presencia de un átomo de hierro no hemínico en su molécula (Chan, 1973; Roza y Francke, 1973), se separó la primera serie de isoenzimas a partir de semillas de soja (Axelrod, 1974), y se comenzó el estudio de su mecanismo de reacción, el cual no se vería completado hasta mediados de la siguiente década (Veldinck, *et al.* 1977; Gardner, 1989). Durante este período cabe señalar el descubrimiento y desarrollo de la ruta de la LOX en mamíferos (Nugteren, 1975; Schewe *et al.*, 1975), donde participa en la biosíntesis de compuestos con actividad reguladora de gran importancia fisiológica como los leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas y prostaciclina. A finales de los 80 se determinó la estructura primaria de la LOX-1 y LOX-2 de soja (Shibata *et al.*, 1987; 1988), comenzándose el estudio de sus estructuras terciarias por técnicas cristalográficas a principio de los 90 (Steczko *et al.*, 1990; Stallings, 1990). En los últimos años se han clonado y secuenciado los correspondientes genes de especies vegetales como *Arabidopsis thaliana* (Bell y Mullet, 1993), tomate (Ferrie *et al.*, 1994) y patata (Royo *et al.*, 1996).

### 1.5.1. Otros productos y reacciones.

Aunque los hidroperóxidos representen el producto mayoritario de la enzima LOX, ésta también es capaz de generar simultáneamente otros productos, tales como cetodienos, dímeros de ácidos grasos, pentano u oxoácidos, sobre todo en condiciones anaerobias (Garssen *et al.*, 1971; 1972). Otra reacción típica de la LOX es la cooxidación de carotenos y otros pigmentos en presencia de ácidos grasos poliinsaturados, que la hacen útil como blanqueador alimentario (Vick y Zimmerman, 1987).

Desde el punto de vista de la biosíntesis de volátiles la reacción secundaria más importante de esta enzima es la lisis de los 13-hidroperóxidos del ácido linolénico, reacción



**Figura 1.4.**  $\beta$ -Escisión del ácido 13-hidroperoxilínolénico catalizada por la lipoxigenasa.

que conlleva la producción de un oxoácido de 13 y un alcohol de cinco átomos de carbono (ácido 13-oxo-12,9-tridecadienoico y 2-pentenol o 1-penten-3-ol; Figura 1.4). Esta reacción fue observada por primera vez en cotiledones de semilla de soja, siendo atribuida a una nueva forma de hidropéroxido liasa de mecanismo homolítico (Kondo *et al.*, 1995), semejantes a las existentes en microalgas (Vick y Zimmerman, 1989; Andrianarison *et al.*, 1989). Posteriormente se demostró que esta reacción era producida por mediación de la LOX-1, presente en alta proporción en la semilla de soja (Salch *et al.*, 1995).

### 1.5.2. Fuentes de lipoxigenasa, distribución en el reino vegetal y clasificación.

A principios de la década de los 70 se había confirmado la presencia de LOX en 40 especies vegetales diferentes (Pinsky *et al.*, 1971), número que se vio prontamente ampliado en trabajos posteriores (Axelrod, 1974; Eskin *et al.*, 1977). Desde entonces se ha aceptado la ubicuidad de esta enzima dentro del reino vegetal, de forma que su ausencia en una determinada especie se asocia a un método inadecuado de ensayo de actividad.

La LOX es especialmente abundante en semillas leguminosas, de forma que en gran

parte de los trabajos realizados se han usado estas especies como fuente de enzima. A partir de cotiledones de semilla de soja fueron purificadas 4 isoenzimas de LOX (Axelrod, 1974), que se denominaron LOX-1, LOX-2, LOX-3a, LOX-3b. Las dos últimas, al ser muy similares se denominan conjuntamente LOX-3. Las isoformas purificadas muestran características marcadamente diferentes; así la LOX-1 exhibe un pH óptimo de 9,0, mostrando especificidad para la producción de 13-hidroperóxidos (85%), mientras que las formas LOX-2 y LOX-3 presentan un pH óptimo de actividad entre 6,5 y 7,0, produciendo 13- y 9- hidroperóxidos en igual proporción. Su comportamiento en relación con la producción de compuestos secundarios y cooxidación de pigmentos es también diferente. De este modo, la LOX-3 es la más activa en este aspecto tanto en condiciones aerobias como anaerobias, la LOX-1 produce reacciones secundarias sólo a bajas concentraciones de oxígeno y finalmente la LOX-2 exhibe bajas producciones de compuestos secundarios en cualquier condición (Ramadoss *et al.*, 1978).

Aparte de las semillas de soja se han purificado series similares de isoenzimas a partir de diversas fuentes tales como otras semillas, tubérculos, raíces y frutos (Galliard y Chan, 1980). Las isoformas de LOX purificadas a partir de cotiledones de semillas fueron proteínas globulares, solubles. En otras fuentes como hojas, brotes o frutos aparecieron formas de LOX asociadas a la fase particulada (Hatanaka *et al.*, 1987; Feussner y Kindl, 1994; Droillard *et al.*, 1993).

La clasificación de LOXs vegetales reportada más recientemente se basa en criterios estructurales no enzimológicos derivados de sus secuencias de aminoácidos (Shibata *et al.*, 1994). De esta forma, las LOX se dividen en dos familias bien diferenciadas llamadas *Lox-1* y *Lox-2*. Las del primer tipo son las más frecuentes, caracterizándose por mantener entre ellas un alto grado de homología. En las enzimas del tipo *Lox-2* el grado de homología es mucho menor, diferenciándose además por poseer un péptido de tránsito hacia el cloroplasto.

### 1.5.3. Distribución de la Lipoxigenasa entre los órganos de la planta.

Los estudios de distribución de LOX, tanto a nivel de órganos como a nivel subcelular se han llevado a cabo en diversas especies con el objeto de obtener información que permita



dilucidar su rol fisiológico. En los estudios a nivel de órganos se han obtenido muy pocas conclusiones debido a la gran ubicuidad mostrada por la enzima. Así, la LOX ha sido detectada por medidas directas de actividad en gran variedad de órganos vegetales como semillas, hojas, raíces frutos y flores (Galliard y Chan, 1980). Su proporción en éstos cambió en función de la especie y estado de desarrollo de la planta estudiada (Pinsky, 1971; Vick y Zimmerman, 1976).

### 1.5.4. Distribución subcelular.

La distribución subcelular de la actividad LOX varía en función del órgano estudiado, así en el caso de hojas verdes se ha reportado en distintos estudios una alta actividad asociada a cloroplastos. Esto fue descrito por primera vez para hojas de brotes de trigo (Douillard y Bergeron, 1978), donde el 60% del total de la actividad LOX se halló asociada a la fracción de tilacoides. Al separar dicha fracción en un gradiente de densidad se encontró que la mayor parte de la actividad no coincidía con las membranas ricas en clorofila, por lo que se consideró a la LOX asociada a las membranas no verdes de tilacoides inmaduros. Más recientemente, estudios realizados con cloroplastos de hoja de espinaca y proplastos de inflorescencia de coliflor concluyeron que dicha actividad se encuentra tanto en las cubiertas membranosas como en los tilacoides de los mismos, hallándose además una forma soluble en el estroma (Bleé y Joyard, 1996; Blée, 1998). Por otra parte, la LOX asociada a cloroplastos ha sido reportada también para frutos, como es el caso de la LOX unida a la fase particulada de fruto de tomate (Bowsher *et al.*, 1992). En tejidos no fotosintéticos la LOX ha sido detectada en el citoplasma, vacuolas, lisosomas y mitocondrias (Wardale y Galliard, 1977; Wardale y Lambert, 1980).

Los estudios de localización subcelular han tomado importancia en los últimos años debido al descubrimiento de una forma de LOX que se expresa en los cuerpos grasos de los cotiledones de semillas de pepino en germinación (Feussner *et al.*, 1996), la cual podría estar directamente relacionada con la regulación de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos poliinsaturados en dichas semillas.

### 1.5.5. Especificidad de sustrato.

Como se ha mencionado anteriormente, la LOX reconoce la secuencia 1(Z), 4(Z)-pentadieno de los ácidos grasos poliinsaturados, aunque también se muestra activa con la 1(E), 4(Z)-pentadieno (Funk *et al.*, 1987). Estudios destinados a dilucidar la naturaleza de la interacción entre el sitio activo de la enzima y su sustrato investigaron el efecto sobre la actividad de oxidación de la LOX-1 de soja del alargamiento o acortamiento de la cadena de metilenos de los ácidos linoleico o linolénico, tanto en el extremo carboxílico como en el alílico (Hatanaka, 1993). Los sustratos alargados o acortados por el extremo carboxílico mostraron un rango de especificidad muy amplio, de forma que la actividad se incrementó progresivamente desde el sustrato de 12 átomos de carbono, alcanzando un máximo en el de 20, a partir del cual nuevos alargamientos hicieron disminuir la actividad. Por el contrario la elongación o acortamiento de los sustratos en el extremo metilo terminal provocaron una drástica caída de la actividad, de manera que en este último experimento la enzima se mostró prácticamente específica para los sustratos de 18 átomos de carbono. Estos resultados indican que la unión del sustrato a la enzima depende en mayor medida de la interacción hidrófoba con el extremo metílico terminal de la molécula de ácido graso que con el grupo carboxílico. Este hecho hace que la LOX-1 de soja sea capaz de usar como sustrato ácidos grasos poliinsaturados unidos a glicerolípidos (Kondo *et al.*, 1993). De esta manera, dicha enzima se muestra activa para la peroxidación de ácido linoleico unido tanto a acilgliceroles (monolinoleína, dilinoleína y trilinoleína) (Piazza *et al.*, 1996) como a fosfolípidos (fosfatidilserinas, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas) (Piazza y Nuñez, 1995). La actividad registrada dependió en gran medida del tensioactivo utilizado para solubilizar el sustrato, siendo la sal biliar deoxicolato el que proporcionó los mayores niveles de actividad. Por lo general la actividad mostrada por la LOX para oxidar glicerolípidos fue menor que para el ácido linoleico libre, excepto en el caso de la monolinoleína.

La capacidad para oxidar ácidos grasos poliinsaturados unidos a lípidos complejos ha sido descrita también para LOXs de otras fuentes como la de cotiledones de semilla de pepino (Matsui y Kajiwara, 1995) o la de brotes de cebada (Holtman *et al.*, 1996), todas ellas formas solubles de esta enzima. En el caso de formas unidas a membrana se han

realizado experimentos con LOX de microsomas de tomate, encontrándose actividades muy bajas o nulas en contraste con la forma soluble de LOX procedente del mismo fruto, que fue activa para la oxidación de fosfolípidos (Todd *et al.*, 1990; Droillard *et al.*, 1993). Estos datos apuntan a que la interacción con el substrato de la LOX unida a membrana podría ser diferente a la de la forma soluble.

Por otra parte, dependiendo de la fuente y origen del enzima las LOXs muestran diferente especificidad por los ácidos grasos poliinsaturados más comunes en vegetales, el linoleico y el linolénico. Por lo general las LOXs procedentes de semillas muestran preferencia por el ácido linoleico, como es el caso de la lenteja (Hilbers *et al.*, 1995), garbanzo (Sanz *et al.*, 1992) o guisante (Yoon y Klein, 1979), mientras que sus análogas procedentes de hojas o frutos son más activas con ácido linolénico, como viene a ser el caso de la manzana (Kim y Grosh, 1979), berenjena (Grossman *et al.*, 1971) u hojas de té (Hatanaka *et al.*, 1979).

### 1.5.6. Regioespecificidad.

Los productos del ciclo aerobio de reacción de la LOX son 13- o 9-Z,E-hidroperóxidos de los ácidos linoleico o linolénico. La mayor parte de las LOXs muestran preferencia para la producción de un determinado isómero, habiendo sido reportada la especificidad de distintas isoformas de esta enzima para gran número de especies vegetales (Galliard y Chan, 1980). La regioespecificidad puede verse afectada por parámetros como el pH; así la LOX-1 de soja se hace menos específica para la producción de 13-hidroperóxidos a pHs menores que 9,0 (Gardner, 1989).

### 1.5.7. Parámetros cinéticos.

Trabajos previos en los que se estudiaron sistemáticamente las cinéticas resultantes de la LOX-1 de soja a diferentes concentraciones de substrato, concluyeron que la velocidad de reacción aerobia de esta enzima era dependiente de la concentración de linoleato no micelar presente en el medio (Galpin y Allen, 1977).

De esta manera, las cinéticas resultantes de una determinada forma de LOX

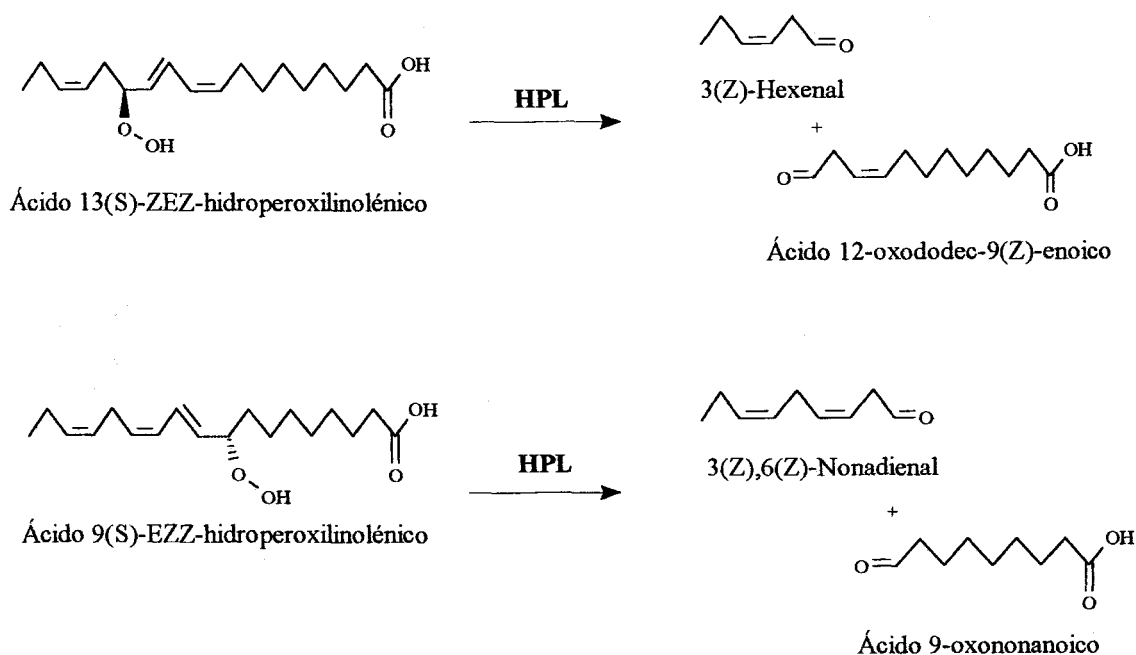
dependen del estado de agregación micelar de las moléculas del correspondiente ácido graso empleado como sustrato, parámetro que puede variar en gran medida en función de la temperatura, el pH, la presencia de tensioactivos y de la misma concentración de ácido graso. Esto implicaría que los parámetros cinéticos resultantes de medidas de LOX *in vitro* representan valores relativos, de escaso significado fisiológico.

Este hecho explica además la gran variabilidad en los valores de  $K_m$  que a menudo se encuentra en los trabajos publicados para una misma forma de LOX. Así, para la LOX-1 de soja se reportan valores de  $K_m$  desde 20  $\mu\text{M}$  (Galliard y Chan, 1980) hasta 1 mM (Tappel, 1962), siendo esta variabilidad incluso mayor en el caso de la forma soluble de la LOX de tomate para la que se han publicado valores de  $K_m$  desde 0,015  $\mu\text{M}$  (Bonnet y Crouzet, 1977) hasta 1,4 mM (Zamora *et al.*, 1987).

## **1.6. HIDROPERÓXIDO LIASA.**

La enzima hidropéroxido liasa (HPL) cataliza la lisis del enlace situado entre el carbono portador de la función hidropéroxido y el doble enlace de configuración E de los 13(S)- o 9(S)- hidropéroxidos de los ácidos grasos poliinsaturados. Los productos de la lisis son un aldehído volátil de seis o nueve átomos de carbono y un oxoácido no volátil de nueve o 12 átomos de carbono, en función del sustrato utilizado (Figura 1.5).

La formación de aldehídos volátiles a partir de los ácidos grasos linoleico o linoléico por parte de homogenados vegetales fue descrita por primera vez a mediados de los 60 (Drawert *et al.*, 1966). Posteriormente se estableció que el sistema que generaba estos compuestos requería oxígeno molecular (Fleming *et al.*, 1968), por lo que se propuso una ruta enzimática que implicaba la oxidación de dichos ácidos grasos por acción de la enzima LOX, seguida de la lisis de los hidropéroxidos formados (Tressl y Drawert, 1973). La enzima responsable de la rotura de los hidropéroxidos, la HPL, fue aislada y caracterizada por primera vez por Vick y Zimmerman (1976) a partir de plántulas de semilla de sandía, siendo descrita para gran número de especies vegetales a lo largo de las décadas de los 70 y 80 (Phillips y Galliard, 1978; Hatanaka *et al.*, 1987; Schreirer y Lorenz, 1982). Más recientemente fue purificada a homogeneidad a partir de hojas de té y frutos de pimiento (Matsui *et al.*, 1991; Shibata *et al.*, 1995), demostrándose que la enzima es un homotrímero



**Figura 1.5.** Lisis del 13- y 9- hidroperóxido del ácido linolénico catalizada por la hidroperóxido liasa.

constituido por subunidades de 55 Kda, así como la existencia de un grupo hemo dentro de su estructura (Shibata *et al.*, 1995b). El gen que codifica esta enzima fue finalmente clonado y secuenciado un año después (Matsui *et al.*, 1996), siendo clasificada dentro de la familia de las enzimas dependientes de citocromo P450.

Al igual que la LOX, esta enzima también ha sido relacionada con los mecanismos de defensa, habiéndose demostrado recientemente que el gen que la codifica se induce como parte de la respuesta de la planta a al daño físico (Bate *et al.*, 1998). La HPL actúa dentro de estos procesos dando lugar al precursor de la hormona traumatina (Zimmerman y Coudron, 1979), que induce mecanismos de reparación de heridas, y produciendo aldehidos volátiles que funcionan como inhibidores del crecimiento de microorganismos patógenos (Croft *et al.*, 1993) y como repelentes de insectos (Scarpati *et al.*, 1993).

### 1.6.1. Distribución dentro del reino vegetal.

Al igual que la LOX, la HPL puede considerarse una enzima distribuida ubicuamente dentro del reino vegetal. Los estudios sistemáticos de medida directa de actividad o de producción

de aldehídos de seis átomos de carbono a partir de ácidos grasos poliinsaturados utilizando diferentes fuentes (Hatanaka *et al.*, 1978, Sekiya *et al.*, 1983), han concluido en la presencia de HPL en todas las especies ensayadas, hallándose las actividades más altas en las plantas dicotiledóneas y las más bajas en las monocotiledóneas y especies comestibles.

La HPL no se haya localizada en ningún órgano determinado, habiendo sido medida en frutos, semillas, brotes de semillas y hojas de diversas especies. En todos los casos se ha mostrado como una enzima unida a membrana, que es preciso solubilizar con detergentes, generalmente Tritón X-100, para obtener la máxima actividad (Phillips y Galliard, 1978; Vick y Zimmerman, 1987).

### 1.6.2. Distribución subcelular.

Los estudios de localización subcelular se realizaron por centrifugación diferencial de extractos vegetales, seguida de separación los diferentes precipitados en gradientes de densidad, con posterior solubilización y ensayo de las fracciones obtenidas.

Los resultados difirieron en función del órgano estudiado, así en el caso de la HPL de hoja, toda la actividad se halló asociada a las membranas de los cloroplastos (Hatanaka *et al.*, 1982), mostrándose en trabajos más recientes su localización en las cubiertas membranosas de los mismos (Bleé y Joyard, 1996). En el caso de los frutos la situación fue diferente, encontrándose una distribución mucho más ubicua de la enzima. Así, en pulpa de frutos de pepino esta enzima fue detectada en membranas plasmáticas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi, así como en las membranas cloroplásticas del pericarpo (Wardale *et al.*, 1978). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos para cultivos celulares de la planta de tabaco, en los que aparecen dos formas de HPL, una asociada a orgánulos no fotosintéticos, presente en cualquier condición de cultivo, y otra asociada a cloroplastos que se induce con la luz (Sekiya *et al.*, 1984).

### 1.6.3. Especificidad de substrato.

Las HPLs se caracterizan por poseer una especificidad de substrato estricta, de manera que las formas de estas enzimas existentes en el reino vegetal pueden clasificarse en dos grupos,

según utilicen 13(S)-E,Z-hidroperóxidos o 9(S)-E,Z-hidroperóxidos como sustrato. Las primeras son las más comunes, siendo las responsables de la producción de los volátiles de seis átomos de carbono que dan lugar al olor verde (Hatanaka *et al.*, 1987). Las segundas sólo se hallan en ciertos frutos como el pepino, el melón o la pera, generando los aldehídos de nueve átomos de carbono que les confieren su característico flavor (Galliard *et al.*, 1976b, Kim y Grosh, 1981). En algunas fuentes, como los frutos de pepino, HPLs parcialmente purificadas fueron capaces de producir la lisis tanto de 13- como de 9-hidroperóxidos (Phillips y Galliard, 1978), por lo que se sugirió la posibilidad de una HPL de especificidad doble, posibilidad posteriormente descartada al demostrarse que dicha actividad era debida a dos HPLs de diferente especificidad (Matsui *et al.*, 1989).

Por otra parte, al igual que en el caso de la LOX, el extremo carboxílico de la molécula de sustrato juega un papel secundario en la catálisis por HPL. Así, cuando se ensayó la actividad usando HPL purificada de hojas de té con hidroperóxidos de diferentes longitudes de cadena, que mantenían la misma estructura en el extremo metilo terminal que los 13- hidroperóxidos naturales, se obtuvo un rango amplio de especificidad, con un máximo de actividad con el sustrato de 22 átomos de carbono. De esta manera, la misma HPL resultó también activa con 13-hidroperóxidos de compuestos con funciones distintas al grupo carboxilo, como el linoleil-alcohol, linoleil-aldehído o el éster metílico del ácido linoleico (Hatanaka *et al.*, 1987).

La especificidad de las HPLs por hidroperóxidos derivados de ácido linoleico o linolénico varía según la fuente de enzima. Así, en los trabajos realizados con hojas y frutos se encuentra generalmente una preferencia muy acusada por los hidroperóxidos del ácido linolénico. De esta forma en el caso de las HPLs de hojas de té y frutos de pimiento la actividad con el ácido 13-hidroperoxilínolénico es unas 10 veces mayor que para el ácido 13-hidroperoxilínoleico (Matsui *et al.*, 1991; Shibata *et al.*, 1995).

### 1.6.4. Parámetros cinéticos.

Las HPLs exhiben cinéticas típicas de saturación, que se ajustan al modelo de Michaelis-Menten. Los valores de Km obtenidos para enzimas purificadas de distintos frutos son del orden micromolar (Shibata *et al.*, 1995, Phillips y Galliard, 1978, Schreirer y Lorentz,

1982). En el caso del pimiento los valores de  $K_m$  más bajos se midieron para el ácido 13(S)-E,Z-hidroperoxilinolénico siendo de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  respectivamente para cada isoforma purificada. Los valores de  $K_m$  para el ácido 13(S)-E,Z-hidroperoxilinoico fueron de 20  $\mu\text{M}$ .

En plántulas de soja la situación es diferente, midiéndose valores de  $K_m$  mayores y con orden invertido respecto al substrato de mayor afinidad. Así para los ácidos 13(S)-E,Z-hidroperoxilinoico y 13(S)-E,Z-hidroperoxilinolénico los valores de  $K_m$  fueron 55 y 160  $\mu\text{M}$  respectivamente (Oliás *et al.*, 1990). Este dato parece indicar que las características de las HPLs se amoldan a los substratos de los que dispone según la especie, mostrando mayor afinidad por los hidroperóxidos de los ácidos grasos más abundantes en cada una.

## 1.7. ISOMERIZACIÓN DE ENALES.

Los 2(E)-enales son compuestos de gran importancia cuantitativa tanto dentro del llamado olor verde de hojas frescas (2(E)-hexenal) como en el típico aroma del pepino o la pera (2(E)-nonenal, 2(E)-3(Z)-nonadienal) (Hatanaka *et al.*, 1987, Galliard y Phillips, 1976). Experimentos de marcaje con ácido [ $U-^{14}\text{C}$ ]-linolénico usando homogenados de hojas frescas o pulpa de frutos de pepino concluyeron que estos compuestos no se formaban directamente a través de la lisis de los 13- o 9- hidroperóxidos sino que eran producidos vía 3(Z)-enales a través de un paso de isomerización (Galliard *et al.*, 1976b; Hatanaka *et al.*, 1976).

La etapa de isomerización de los 3(Z)-enales es la menos estudiada dentro de la ruta de la LOX, debido principalmente a las dificultades que conlleva la preparación de substratos adecuados para su estudio. A pesar de ello, los trabajos publicados han creado cierta controversia sobre la naturaleza de esta etapa, al haberse descrito vías tanto enzimáticas como no enzimáticas de isomerización. De este modo, Phillips *et al.*, (1979) caracterizaron una enzima que catalizaba la isomerización de los 3(Z)-enales, a la que se denominó enal-isomerasa. Esta enzima fue parcialmente purificada a partir de frutos de pepino, mostrando un peso molecular aparente de 150 kDa. Su pH óptimo fue 8,5, exhibiendo una  $K_m$  de 0,1 mM para el 3(Z)-nonenal. De entre todos los enales ensayados,



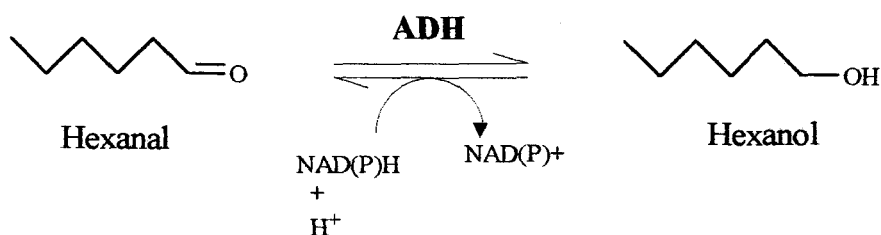
la enal-isomerasa se mostró específica para los sustratos fisiológicos 3(Z)-hexenal, 3(Z)-nonenal, y ácido 12-oxo-9Z-dodecenoico, no exhibiendo actividad con el E-3-nonanal ni con el 3(Z)-hexenol. Por otra parte, estudios de isomerización realizados con cloroplastos de hoja de té (Hatanaka *et al.*, 1989) usando 12-hidroxi-3Z-dodecenal como sustrato modelo, describieron un factor de isomerización no proteínico que catalizaba la formación del 2(E)-enal del mencionado sustrato. Dicho factor no mostró pérdida de actividad después de calentar a 80°C durante 20 minutos, siendo extraíble de los cloroplastos con etanol caliente. La actividad catalítica de este factor se incrementó a la vez que el pH, lo que sugiere que el factor posee un grupo básico que se activa en medio alcalino.

En el caso de la aceituna no se ha realizado trabajo alguno sobre la presencia de enal isomerasas o factores de isomerización, aunque el hecho de que el 2(E)-hexenal sea el compuesto más abundante dentro de la fracción de volátiles del aceite de oliva virgen, dando cuenta de entre el 70 y el 80% del total de dichos compuestos (Morales *et al.*, 1995), indica que ha de existir una elevada actividad enal-isomerasa, de naturaleza enzimática o química, en la pulpa de estos frutos.

### 1.8. ALCOHOL DESHIDROGENASA.

Las alcohol deshidrogenasas (ADHs), (alcohol:NAD oxidorreductasa, EC 1.1.1.1 y alcohol:NADP oxidorreductasa, EC 1.1.1.2), catalizan la reducción reversible, dependiente de piridín nucleótido, de aldehidos a alcoholes (Figura 1.6).

Estas enzimas están ampliamente extendidas en los seres vivos, jugando un papel importante en los procesos de fermentación alcohólica y degradación del etanol. En plantas han sido reportadas en gran número de especies (Davies *et al.*, 1973, Langston *et al.*, 1980, Tihanyi *et al.*, 1988), habiendo sido relacionadas con la resistencia a períodos de anoxia prolongada (Sachs *et al.*, 1980), y la biosíntesis del ácido cinámico (Davies *et al.*, 1973b). Por otra parte, experimentos donde aldehidos volátiles fueron incubados con tejidos de frutos u hojas, resultaron en la producción de los correspondientes alcoholes y ésteres volátiles (Hatanaka y Harada, 1973, Yamashita *et al.*, 1976, 1977), indicando así que éstos se forman a partir de los primeros mediando un paso de reducción catalizado por las ADHs presentes en dichos tejidos, que de esta forma serían responsables del perfil de alcoholes



**Figura 1.6.** Reducción de hexanal por acción de la alcohol deshidrogenasa.

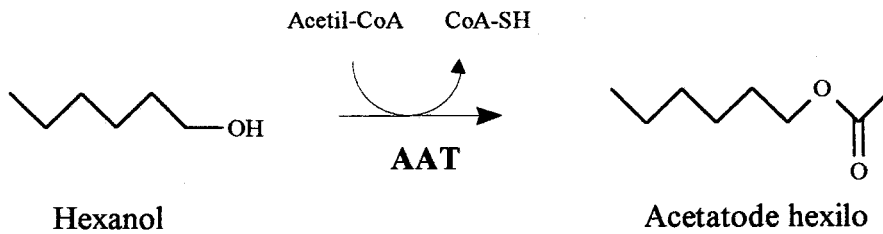
presente en el aroma de las diferentes especies vegetales estudiadas (Yamashita *et al.*, 1977, Mitchell y Jelenkovich, 1995).

En el caso de la aceituna se ha descrito la formación de alcoholes volátiles por parte de discos de pulpa de dicho fruto incubados en un medio conteniendo los correspondientes aldehidos y NADH, aunque la actividad ADH no pudo ser detectada *in vitro*, debido a la posible presencia de inhibidores en el extracto crudo ensayado (Olías *et al.*, 1993).

## 1.9. ALCOHOL ACILTRANSFERASA.

La enzima alcohol aciltransferasa (AAT, E.C. 2.3.1.84) cataliza la reacción de esterificación de un acil-CoA con un alcohol para producir el correspondiente éster y CoA libre (Figura 1.7). Los ésteres de alcoholes volátiles con acetato o butirato forman parte importante del aroma de muchos frutos y derivados de éstos (Dirinck *et al.*, 1977, Macku y Jennings, 1987, Pérez *et al.*, 1992). Dichos compuestos también están presentes en gran variedad de productos obtenidos por fermentación, por lo que el estudio de su biosíntesis está mucho más desarrollado en microorganismos fermentativos de uso industrial que en vegetales (Yamakawa *et al.*, 1978, Yoshioka y Hashimoto, 1981, Mauricio *et al.*, 1993).

Los primeros estudios sobre la biosíntesis de ésteres en vegetales partieron de experimentos de marcaje con precursores radiactivos realizados en plátano (Myers *et al.*, 1970, Tressl y Drawert, 1973); estos estudios se complementaron posteriormente con los realizados *in vivo* en frutos de fresa (Yamashita *et al.*, 1976), en los que se reportó la



**Figura 1.7.** Reacción de esterificación del hexanol con acetil-CoA catalizada por la enzima alcohol aciltransferasa.

síntesis de ésteres volátiles de acetato partir de sus correspondientes aldehidos. La dependencia de CoA de la reacción formadora de ésteres fue descrita poco después por Ueda y Ogata (1977), siendo purificada y caracterizada la primera AAT vegetal casi una década más tarde (Harada *et al.*, 1985) a partir de frutos de banana. En trabajos posteriores esta enzima ha sido purificada y caracterizada a partir de frutos de fresa (Pérez *et al.*, 1993) y manzana (Fellman *et al.*, 1993).

De forma similar a la ADH la AAT no pudo ser detectada en extractos crudos de pulpa de aceituna, sin embargo se observó que discos de tejido de estos frutos fueron capaces de producir ésteres volátiles de acetato cuando se incubaron en un medio conteniendo acetato y los correspondientes aldehidos, lo cual sugiere la acción sucesiva de las enzimas ADH, acetil-CoA sintetasa y AAT (Olías *et al.*, 1993).

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.**

Las aceitunas utilizadas en el presente trabajo se tomaron de una plantación localizada en las plantas experimentales del Instituto de la Grasa, en Bellavista, Sevilla, formada por 20 árboles de la variedad Picual de unos 25 años de edad dotados de riego por goteo. La toma de muestras se realizó a mano, tomando los frutos al azar y de uno en uno a lo largo de una hilera de olivos.

## **2.2. APARATOS.**

### **2.2.1. Centrífugas.**

Las centrifugaciones realizadas a aceleraciones iguales o inferiores a  $40000\times g$  se realizaron en una centrífuga Sorvall RC5C (EEUU), las realizadas a  $150000\times g$  se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Beckman L8-70M (EEUU). Para centrifugaciones preparativas a menor escala se empleó una microcentrífuga Heraeus (Alemania).

### **2.2.2. Espectrofotómetros.**

Las medidas de actividad LOX y HPL, así como las determinaciones de proteína y clorofila se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU640 (EEUU). Las medidas de ADH y AAT se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Sigma ZFP22 (Alemania).

### **2.2.3. Medidas de radiactividad.**

La radiactividad se midió por centelleo líquido en un contador Rackbeta II LKB-LS (Suecia), empleando cóctel de centelleo Beckman Ready Safe (EEUU). Las muestras radiactivas se disolvieron en 3 ml del mencionado cóctel, llevándose a cabo el contaje durante 240 s.

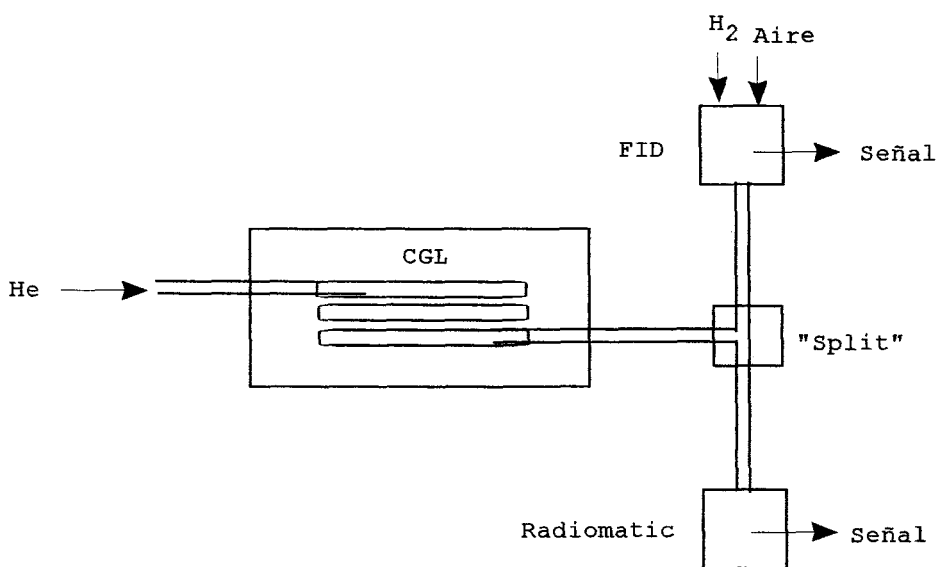
Por otra parte, las bandas radiactivas en placas de cromatografía en capa fina fueron

detectadas y cuantificadas en un betascopio Instant Imager de Packard (EEUU).

## 2.2.4. Cromatografía.

### 2.2.4.1. Cromatografía gas-líquido (CGL).

El análisis de volátiles se llevó a cabo en un cromatógrafo Shimadzu GC-14A (Japón) equipado con una columna empaquetada de 2 m x 2 mm Carbowax 20M de Supelco (EEUU), detector de ionización de llama (FID), inyector manual y radiodetector Radiomatic Flo-One (Packard, EEUU). Este equipo, diseñado para el análisis de muestras radiactivas, está dotado de una bifurcación "split" a la salida de la columna del cromatógrafo, que divide la corriente de elución en dos partes alícuotas: una (20%) es canalizada hacia el detector de FID y la otra (80%) al detector de radiactividad (Radiomatic) (Figura 2.1). Los registros de FID y radiactividad fueron procesados por un programa informático suministrado por el fabricante. La toma de muestras del espacio de cabeza se llevó a cabo con una jeringa de gases calefactable Tracer MHS (EEUU).



**Figura 2.1.** Esquema de funcionamiento del equipo de CGL diseñado para el análisis de muestras radiactivas.

#### **2.2.4.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).**

Se empleó un equipo de HPLC HP 1090 Hewlett Packard (EEUU), dotado de una columna Lichrosorb SiG 60, 5µm, 200 x 2 mm (Bio-rad, EEUU), detector diodo-Array e inyector manual Reodhine con "loop" de 20 µl. Los cromatogramas obtenidos fueron procesados automáticamente por un integrador Thinkjet de Hewlett Packard.

#### **2.2.4.3. Purificación de enzimas.**

En todos los pasos de purificación de enzimas se empleó una bomba peristáltica P-3 y un colector de fracciones Redifrac, ambos suministrados por Pharmacia . Las fases que se emplearon fueron: DEAE-Sepharosa de Pharmacia (intercambio iónico), Biogel HT de Bio-Rad (hidroxilapatito) y Cibacrom Blue 2-Sepharosa CL-6B de Sigma-Aldrich (EEUU)(afinidad).

### **2.3. PRODUCTOS.**

#### **2.3.1. Cromatografía en capa fina.**

La cromatografía en capa fina se realizó en placas de gel de sílice SiG 60, 2,5 mm suministradas por la casa Whathman (EEUU).

#### **2.3.2. Columnas de extracción y desalado.**

La extracción en fase sólida se realizó en columnas octadecilo de J.T. Baker (EEUU). El desalado de extractos enzimáticos se llevó a cabo en columnas de Sephadex G-25 PD-10 adquiridas de Pharmacia (Suecia).

#### **2.3.3. Precursores radiactivos.**

Todos los productos radiactivos empleados en el presente trabajo ([1-<sup>14</sup>C]-18:2 (58 mCi/mmol), [U-<sup>14</sup>C]-18:2 (1 Ci/mmol) y [U-<sup>14</sup>C]-acetato sódico (50 mCi/mmol) fueron

suministrados por Dupont (EEUU).

### 2.3.4. Enzimas.

Se emplearon LOX de soja, (630000 U/mg prot) y catalasa de hígado de bovino (11000 U/mg prot) de la casa Sigma-Aldrich .

### 2.3.5. Otros.

El aceite de vernonia y el ácido 9,10-epoxiesteárico preparado a partir de ácido oleico adquirido de Sigma fueron suministrados por el Dr. Francisco Millán (Instituto de la Grasa, Sevilla). La resina ácida activada amberlita XN-1005 fue cedida por el Dr. Manuel Alaiz (Instituto de la Grasa, Sevilla). Los restantes compuestos empleados como substratos o patrones fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

## 2.4. FRACCIONAMIENTO Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

### 2.4.1. Cromatografía en capa fina de gel de sílice. Procedimiento general.

#### *2.4.1.1. Cromatografía en capa fina analítica.*

Un volumen de disolución problema equivalente a entre 20 y 100 µg de lípido se colocó en la placa a utilizar junto con los correspondientes patrones, formando bandas de 1 a 3 cm. La placa se desarrolló con un eluyente adecuado retirándose del tanque de fase móvil cuando el frente alcanzó el 80% de la longitud total de la misma. A continuación se eliminó el solvente de la placa con N<sub>2</sub> bajo una campana de gases, procediéndose al revelado de la misma. Las placas utilizadas fueron de un tamaño en cm que varió entre 20 × 20, 10 × 20, 5 × 20 ó 5 × 10, dependiendo del número de muestras a analizar. El revelado de las mismas se realizó por exposición a vapores de yodo o calentamiento a 100°C después de pulverización con 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las bandas radiactivas fueron reveladas en un betascopio



Instant Imager (Packard, EEUU).

#### ***2.4.1.2. Cromatografía en capa fina preparativa.***

Entre 25 y 50 mg del compuesto a purificar se colocaron en una banda de unos 17 cm de longitud sobre una placa de 20 × 20 cm, junto a los correspondientes patrones. Como en el caso anterior, la placa se desarrolló con la fase móvil adecuada hasta un 80% de su longitud. Una vez eliminado el disolvente bajo N<sub>2</sub> se colocó sobre la placa cubriendo la zona de aplicación de la muestra un vidrio, determinándose la posición de los patrones por exposición de la placa a vapores de yodo. Tras marcar la posición del patrón de interés, se retiró el vidrio y se raspó la banda de sílice correspondiente al compuesto a purificar, la cual se depositó en una columna de vidrio. Dicho compuesto fue eluido de la sílice con un volumen de la misma fase móvil empleada equivalente a 10 volúmenes del lecho de sílice formado.

#### **2.4.2. Análisis de volátiles por cromatografía de gases.**

Se utilizó helio como gas portador, con un flujo de 40 ml/min. El detector de ionización de llama estaba alimentado de un flujo de hidrógeno de 20 ml/min junto con 200 ml/min de aire. Los tiempos de retención de los compuestos producidos por la ruta de la LOX a partir del ácido linoleico (hexanal, hexanol y 3(Z)-nonenal), así como el patrón interno acetato de isoamilo, se determinaron inyectando entre 5 y 10 µg de patrones comerciales de dichos compuestos disueltos en metanol, a una concentración de 10 mg/ml. Los análisis se llevaron a cabo manteniendo la columna en régimen isoterma a 140°C.

##### ***2.4.2.1. Inyección del espacio de cabeza.***

La toma de muestras de compuestos volátiles en las incubaciones realizadas con [U-<sup>14</sup>C]-18:2 se realizó por el método de espacio de cabeza estático. Los viales resultantes de las incubaciones se mantuvieron en un baño a 70°C durante al menos 30 min, tras los cuales se tomó 1 ml de su espacio de cabeza con la jeringa de gases termostatzada a 80°C, manteniendo siempre los viales en el baño para evitar la condensación de los volátiles. La toma de muestras se realizó equilibrando el contenido de la jeringa con el espacio de cabeza

del vial durante 30 s, después de los cuales el contenido de la jeringa fue rápidamente inyectado en el cromatógrafo.

### **2.4.3. Análisis y separación preparativa de hidroperóxidos por HPLC.**

Para el análisis y detección de hidroperóxidos se registró la absorbancia a 234 nm a salida de columna. Las condiciones de operación fueron diferentes dependiendo si se analizaban hidroperóxidos libres o sus ésteres metílicos.

#### ***2.4.3.1. Análisis de ésteres metílicos de hidroperóxidos.***

Los hidroperóxidos libres obtenidos a partir de incubaciones de ácido linoleico o linolénico con LOXs de distintas fuentes fueron metilados con diazometano (Apartado 2.5.1.1.). Los ésteres metílicos resultantes se redisolvieron en hexano y la disolución se pasó por un filtro Millipore de 45  $\mu\text{m}$ . El volumen de muestra fue de 50  $\mu\text{l}$  (equivalente a 3-6  $\mu\text{g}$  de solutos). La fase móvil utilizada fue hexano-éter etílico (92:8), a un flujo de 0,8 ml/minuto. En estas condiciones se separaron 4 isómeros de ésteres metílicos de hidroperóxidos (13-EZ, 13-EE, 9-EZ y 9-EE-hidroperóxidos), los cuales fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los correspondientes patrones obtenidos por oxidación de linoleato o linolenato con LOX de soja o patata según se describe en el Apartado 2.5.2.

#### ***2.4.3.2. Separación preparativa de hidroperóxidos libres.***

Los hidroperóxidos obtenidos por oxidación de los ácidos linoleico o linolénico con LOXs de soja o patata se disolvieron en la fase móvil y fueron filtrados a continuación a través de membranas de 0,45  $\mu\text{m}$ . Seguidamente los mencionados patrones de hidroperóxidos fueron analizados en su forma libre, inyectándose cantidades similares a las anteriormente mencionadas para los ésteres metílicos. La fase móvil utilizada fue hexano-isopropanol-ácido acético (98:2:0,05) a un flujo de 1,25 ml/min. Una vez conocidos los tiempos de retención de cada isómero se inyectaron cantidades de hidroperóxidos que oscilaron entre 100 y 200  $\mu\text{g}$ , recogiendo el isómero a purificar a salida de columna mientras era registrado su pico correspondiente. Los hidroperóxidos purificados volvieron a ser analizados para comprobar su pureza, almacenándose posteriormente a  $-20^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de  $\text{N}_2$ .

## **2.5. PREPARACIÓN DE SUBSTRATOS Y SUBSTANCIAS PATRONES.**

### **2.5.1. Reacciones de derivatización.**

#### ***2.5.1.1. Metilación.***

Las reacciones de metilación de grupos carboxílicos de diferentes compuestos se llevaron a cabo con diazometano, según el método establecido por Schlenk y Gellerman (1960). El sistema de producción de diazometano consistía en dos tubos conectados en serie, el primero de los cuales contenía éter etílico y el segundo una disolución compuesta por 0,7 ml de carbitol (2- $\beta$ -etoxietanol), 0,7 ml de éter etílico y 1 ml de KOH al 60%. La reacción se comenzó añadiendo unos 5 mg de diazald (N-metil-N-p-toluensulfonamida) disuelto en 1 ml de éter etílico en el segundo tubo. En el medio de reacción descrito, el diazald se descompone para producir diazometano, un gas que se arrastra mediante una corriente de N<sub>2</sub> burbujeada a través del contenido de los dos tubos. La corriente de salida del segundo tubo, rica en diazometano, se burbujeó finalmente a través de la muestra disuelta en éter etílico-metanol (10:1) y colocada en un baño con hielo. La reacción de esterificación se dio por terminada cuando la disolución etérea conteniendo la muestra tomó un color amarillo pálido.

#### ***2.5.1.2. Reducción de hidroperóxidos.***

La reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos hasta sus correspondientes hidroxiácidos se llevó a cabo utilizando una cantidad de muestra de 1-10 mg disuelta en 0,5 ml de metanol, añadiéndose seguidamente 10 mg de NaBH<sub>4</sub>. La reacción produce desprendimiento de H<sub>2</sub> y se deja proceder hasta que cesa el burbujeo. Se añade entonces 1,5 ml de NaCl al 5%, y se recuperan los hidroxiácidos resultantes mediante dos extracciones sucesivas con éter etílico.

#### ***2.5.1.3. Preparación de 2,4-dinitrofenilhidrazonas (DNPHZ) de aldehidos.***

Una cantidad de compuesto carbonílico de 1 a 10 mg se colocó en un tubo Pirex dotado de tapón de rosca, eliminándose el disolvente bajo una corriente de N<sub>2</sub>. Seguidamente se

añadió sobre el residuo 0,5 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina al 2% en 2 M HCl, siendo la disolución resultante calentada durante 10 minutos a 80°C después de agitar en Vortex. Una vez se enfrió la muestra, las correspondientes DNPHZs se extrajeron por tres veces con 1 ml de hexano.

## 2.5.2. Hidroperóxidos.

Los hidroperóxidos usados como substratos o patrones en el presente trabajo fueron preparados a partir de los correspondientes ácidos grasos poliinsaturados por oxidación con LOX comercial de soja o LOX preparada a partir de tubérculos de patata, empleando una modificación del método descrito por Phillips y Galliard (1978). En el primer caso se obtiene una mezcla de productos en la que predominan los 13-hidroperóxidos, en el segundo predominan los 9-hidroperóxidos.

### 2.5.2.1. *Reacción de oxidación.*

Se tomaron 100 mg del correspondiente ácido graso, a los que se añadieron 100 µl de Tween-20 y 5 ml de agua destilada, homogeneizándose la mezcla resultante mediante agitación. Seguidamente se añadió un equivalente de 2M KOH para neutralizar el ácido graso y la disolución se llevó hasta 30 ml con agua destilada. Separadamente, a 70 ml de tampón 0,2 M de ácido bórico-KOH, pH 9,0, 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en el caso de la LOX de soja, o 50 mM MES, pH 6,0, 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para la LOX de patata, se añadieron 60 unidades de catalasa comercial de Sigma. La disolución resultante se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con objeto de que se saturase de oxígeno. Esta disolución se mezcló en un matraz dotado de agitador magnético con la de ácido graso, colocándose en un baño con hielo. A continuación se añadió una cantidad suficiente de LOX como para transformar todo el ácido graso presente en la disolución en 30 minutos. La reacción de oxidación se llevó a cabo con agitación suave, controlándose el avance de la misma por medidas periódicas de absorbancia a 234 nm de alícuotas de 20 µl de la mezcla de reacción, diluidas hasta 1 ml con etanol. La reacción se dio por concluida cuando se hubo transformado entre un 70 y un 80% del substrato, después de lo cual se añadió gota a gota 5 M HCl hasta llevar el valor de pH por debajo de 3,0.

### **2.5.2.2. *Extracción en fase sólida.***

Una columna octadecilo de 50 x 10 mm fue activada y equilibrada por elución con 10 ml de metanol y 10 ml del tampón de reacción. A continuación se pasó a través de la misma la mezcla de reacción acidificada con ayuda de ligero vacío, lavándose seguidamente con 2 ml de hexano. Los hidroperóxidos unidos a la columna fueron finalmente eluidos con 3 ml de metanol.

### **2.5.2.3. *Purificación de los hidroperóxidos.***

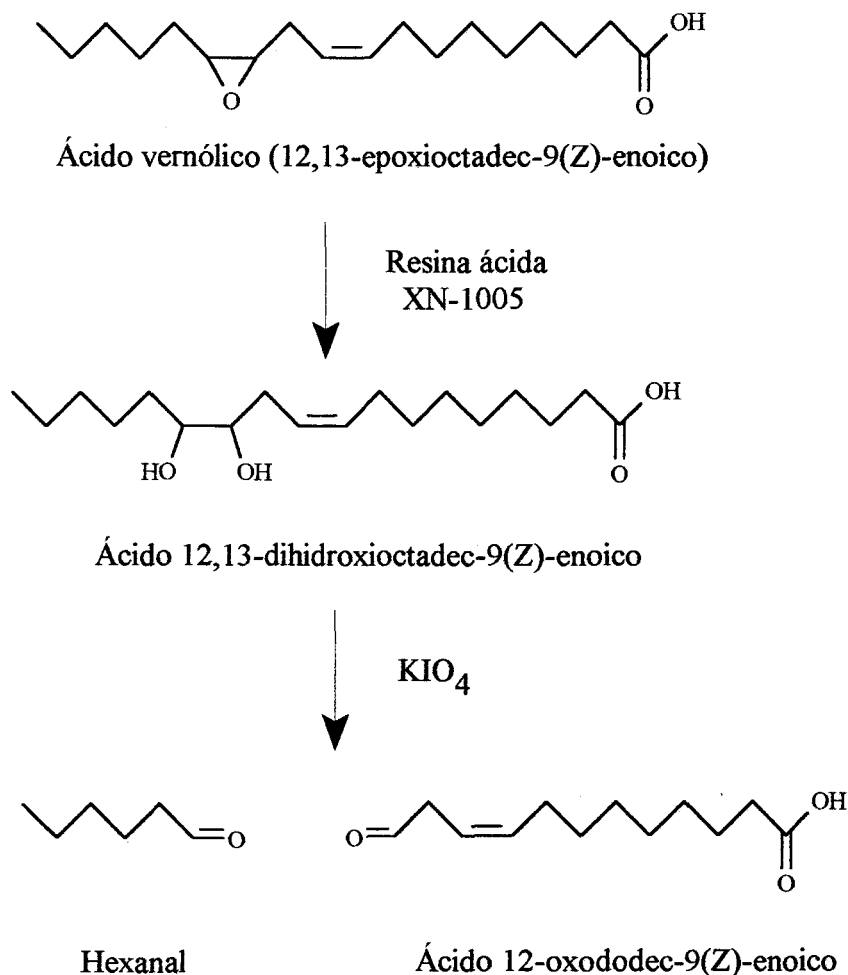
La disolución de hidroperóxidos obtenida de la columna octadecilo se encuentra contaminada por restos del sustrato no transformado, así como por productos secundarios de la reacción de la LOX, que podrían interferir en los ensayos enzimáticos. Por ello, los hidroperóxidos fueron purificados por CCF preparativa (ver 2.4.1.2), usando la mezcla hexano-éter etílico-ácido fórmico (50:50:1) como fase móvil. La disolución de hidroperóxidos purificados eluida de la sílice se evaporó a temperatura ambiente en un rotavapor, resuspendiéndose el residuo en 3 ml de metanol. Esta disolución se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de  $\text{N}_2$ .

## **2.5.3. Oxoácidos.**

Los productos de la enzima HPL, ácido 12-oxododec-9(Z)-enoico y ácido 9-oxononanoico se prepararon por síntesis degradativa a partir de ácidos grasos epoxidados, para su uso como patrones en los experimentos de marcaje con precursores radiactivos.

### **2.5.3.1. *Ácido 12-oxododec-9(Z)-enoico.***

Este compuesto se preparó a partir del ácido vernólico (ácido 12,13-epoxioctadec-9(Z)-enoico), mayoritario en el aceite de semillas de vernonia (*Vernonia anthelmintica*). Un volumen de 1 ml de aceite de vernonia se disolvió en 5 ml de 1 M KOH en etanol, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 12 horas para su saponificación. A continuación el hidrolizado obtenido se centrifugó para eliminar la turbidez, añadiéndose 5 ml de agua



**Figura 2.2.** Apertura del grupo epóxido del ácido vernólico seguida de la lisis del diol resultante para producir hexanal y ácido 12-oxododec-9Z-enoico.

destilada al sobrenadante, que fue extraído tres veces con 5 ml de hexano. Las fases orgánicas obtenidas fueron desechadas, siendo la fase hidroalcohólica complementada hasta 75 ml con agua destilada. Esta disolución fue finalmente acidificada con 1 M HCl y a continuación extraída tres veces con 50 ml de éter etílico. Las fases etéreas combinadas se pasaron por un lecho de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para eliminar los restos de humedad, siendo seguidamente llevadas a sequedad en un rotavapor. El residuo conteniendo los ácidos grasos del aceite de semillas de vernonia se disolvió en 5 ml de cloroformo, almacenándose a -20°C en atmósfera de N<sub>2</sub>.

El ácido vernólico presente en alta proporción en el mencionado hidrolizado se

purificó por CCF preparativa, aplicando 0,25 ml de dicha disolución en una placa de gel de sílice de 20 x 20 cm, que fue desarrollada con hexano- éter etílico- ácido fórmico (50:50:1). Una vez eluida de la sílice, la disolución de ácido vernólico se llevó a sequedad en rotavapor y se resuspendió en 1,5 ml de cloroformo.

La preparación del ácido 12-oxododec-10-enoico, se llevó a cabo por apertura del anillo epóxido del ácido vernólico para producir el correspondiente diol, seguida de la lisis de este último con  $\text{KIO}_4$  (Figura 2.2). La apertura del epóxido se llevó a cabo empleando el método descrito por Vioque (1969). Se tomaron 0,5 ml de disolución de ácido vernólico (equivalente a unos 10 mg), que fue evaporada bajo  $\text{N}_2$  y redisuelta en 1 ml de benceno. A continuación se añadieron 100 mg de amberlita XN-1005 activada, manteniéndose la disolución con agitación magnética suave durante 30 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido la solución se decantó, la amberlita fue lavada con 0,5 ml de éter etílico, se combinaron las fases orgánicas y se comprobó el rendimiento por CCF, apareciendo una sola banda de  $R_f$  inferior al del ácido vernólico, correspondiente al ácido 12,13-dihidroxiotadec-9(Z)-enoico.

El siguiente paso consistió en la rotura del diol para dar lugar al oxoácido objeto de la síntesis. Así, 50 mg de  $\text{NaIO}_4$  se disolvieron en 0,5 ml de 0,5 M HCl, llevándose a continuación hasta 5 ml con etanol. Un volumen de 0,5 ml (3 mg aprox.) de la disolución de diol fue evaporada sobre  $\text{N}_2$ , redisolviéndose en 0,5 ml de la mencionada disolución de  $\text{NaIO}_4$ . Después de 30 minutos se añadieron 3 ml de NaCl al 5 %, siendo extraída la disolución resultante 3 veces con 2 ml de éter etílico. La fase orgánica combinada se secó sobre  $\text{NaSO}_4$  anhidro, evaporándose bajo  $\text{N}_2$ . El residuo se disolvió en 0,5 ml de cloroformo y se analizó por CCF, apareciendo una sola banda, con un  $R_f$  2,5 veces superior al del diol, correspondiente al ácido 12-oxo-9(Z)-dodecenoico.

### **2.5.3.2. Ácido 9-oxononanoico.**

Este compuesto se preparó de forma totalmente análoga al anterior oxoácido a partir del ácido 9,10-epoxiesteárico. Para comprobar la naturaleza carbonílica de los compuestos preparados, disoluciones de los mismos fueron tratadas con 2,4-dinitrofenilhidrazina, extrayéndose con hexano las correspondientes hidrazonas (ver Apartado 2.5.1.3.), que fueron analizadas por CCF, apareciendo como bandas amarillas únicas en cada caso. Ambas

hidrazonas mostraron valores próximos de Rf cuando fueron cromatografiadas en placas de sílice siendo la del ácido 12-oxododec-9(Z)-enoico algo superior al del 9-oxononanoico.

#### 2.5.4. Preparación de las sales potásicas de ácidos grasos e hidroperóxidos.

Tanto los ácidos grasos como sus correspondientes hidroperóxidos fueron utilizados en forma de sales potásicas solubles en H<sub>2</sub>O en los ensayos enzimáticos e incubaciones con precursores radiactivos.

##### *2.5.4.1. Preparación de las sales potásicas de ácidos grasos.*

Aproximadamente 25 mg de ácido graso se pesaron con exactitud en un tubo graduado, añadiéndose a continuación 25 µl de Tween-20 y 1 ml de agua destilada. La mezcla resultante se emulsionó por agitación, añadiéndose a continuación un equivalente de KOH 2M. La mezcla se volvió a agitar y se añadió suficiente agua destilada para obtener una disolución 10 mM. Esta disolución fue finalmente clarificada por sonicación durante 2 ó 3 min, siendo almacenada en viales de 5 ml a -20°C, en atmósfera de N<sub>2</sub>.

##### *2.5.4.2. Preparación de las sales potásicas de hidroperóxidos.*

Las disoluciones de hidroperóxidos empleadas de rutina se prepararon diluyendo con agua destilada, hasta una concentración de 1 mM, las disoluciones metanólicas resultantes de la purificación de estos compuestos (ver Apartado 2.5.2.3.). Estas disoluciones fueron finalmente clarificadas por la adición de un equivalente de 2M KOH, y se almacenaron en atmósfera de N<sub>2</sub> a -20°C.

En el caso de los hidroperóxidos purificados por HPLC, las disoluciones recogidas de los mismos se evaporaron bajo N<sub>2</sub> en un baño de hielo, añadiéndose para su redisolución un volumen de 1mM KOH suficiente como para obtener disoluciones de la misma concentración de cada hidroperóxido.



### 2.5.5. Acetato de isoamilo marcado.

El acetato de isoamilo radiactivo se preparó para ser utilizado como patrón interno en los experimentos de marcaje con [U-<sup>14</sup>C]-18:2. Un volumen de 100 µl de alcohol isoamílico (3-metilbutanol), equivalente a 1,1 µmoles, se disolvieron en 340 µl de ácido acético glacial, añadiéndose a continuación 0,9 MBq de [U-<sup>14</sup>C]-acetato sódico (50 mCi/mmol), y 100 mg de NaSO<sub>4</sub> anhidro en un tubo Pirex dotado de tapón de rosca. La mezcla resultante se mantuvo a 80°C durante 4 días, después de los cuales fue neutralizada con 3 ml de NH<sub>4</sub>OH al 33%, apareciendo una fase sobrenadante de acetato de isoamilo radiactivo, que fue extraída con 0,5 ml de hexano. El producto obtenido se analizó por radio-CGL, apareciendo un solo pico correspondiente al acetato de isoamilo en el registro de radiactividad. Se obtuvieron 0,06 MBq de éster radiactivo, con una radiactividad específica de 0,16 MBq/µmol.

## 2.6. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.

### 2.6.1. Preparación de extractos de frutos frescos.

Las aceitunas recién recolectadas fueron lavadas con abundante agua y agua destilada. Los frutos fueron entonces deshuesados y de cada uno se preparó un anillo de pulpa de 2-4 mm mediante corte transversal de su parte central. Estos anillos fueron inmediatamente sumergidos en un tampón 50 mM de fosfato potásico, pH 7,0, conteniendo 0,1 % ascorbato (tampón Pi-A) a 0-4°C. Unos 10 g de tejido así preparado se colocaron en un mortero y se trituraron en presencia de nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. El mortero conteniendo el tejido triturado, una vez evaporado el nitrógeno líquido, se colocó en un baño de hielo y se procedió a la preparación del extracto utilizando 50 ml de medio de extracción y 5 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) lavada con ácido. El tampón de extracción utilizado (Sánchez y Harwood, 1992) contenía 50 mM HEPES, pH 7,5, 330 mM sorbitol, 20 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 2 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,1% ascorbato, 10% glicerol, 7 mM 2-mercaptoetanol y 0,3 mM DTE (estos dos tioletes se añadieron justo antes

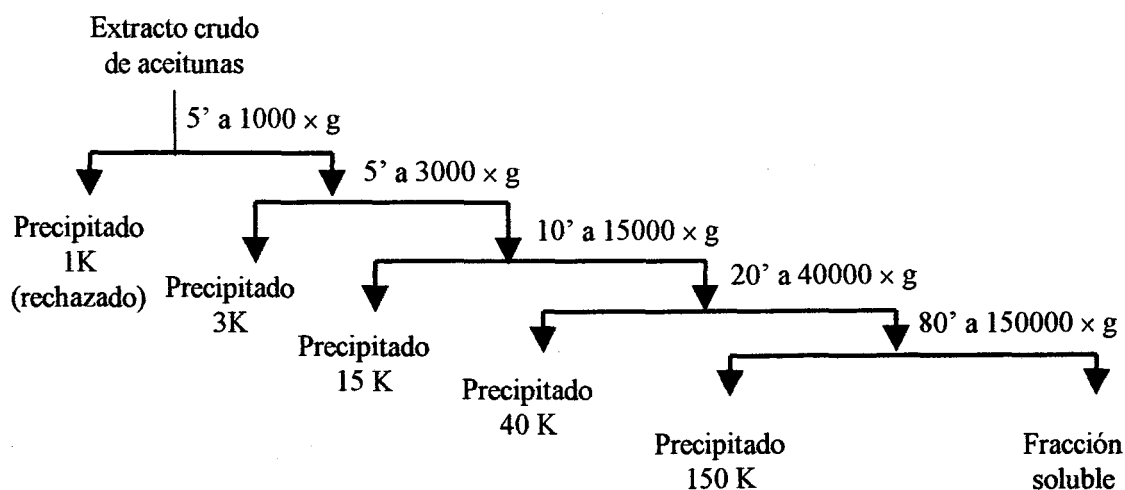
del comienzo de la preparación). La operación de extracción se realizó en tres etapas. Primero se añadieron unos 20 ml de tampón y la mitad del PVPP y se trituró durante 1-2 minutos. El tejido homogeneizado se decantó sobre un filtro de Miracloth y volvió a triturarse otras dos veces con unos 15 ml de tampón y el resto del PVPP.

El extracto así preparado fue a continuación fraccionado por centrifugación, de acuerdo a un protocolo que implicaba centrifugación a  $1000\times g$  durante 5 minutos, para eliminar los restos de tejido y células enteras del extracto, centrifugación a  $40000\times g$  durante 20 minutos, con lo que precipitaron las membranas de mayor densidad y centrifugación a  $150000\times g$  durante 80 minutos, con lo que lo hicieron las de menor densidad. El precipitado de  $1000\times g$  fue rechazado, mientras que los de  $40000\times g$  (40 K) y  $150000\times g$  (150 K) se resuspendieron en 6 y 3 ml respectivamente de 25 mM HEPES, pH 7,5, 10% glicerol (con 0,5 % de Tritón X-100 en el caso de la HPL), usando un homogeinizador manual de vidrio enfriado en un baño de hielo. El sobrenadante de 150 K constituyó la fracción soluble de los frutos de aceituna.

En los estudios de distribución subcelular el procedimiento de preparación del extracto crudo fue análogo al descrito, solo que no se congeló el tejido con nitrógeno líquido antes de la molturación. En este caso dicho extracto fue sometido al programa de centrifugación fraccionada que se indica en la Figura 2.3. El precipitado obtenido a  $1000\times g$  fue desechado, mientras que los obtenidos a  $3000\times g$ ,  $15000\times g$ ,  $40000\times g$  y  $150000\times g$  fueron resuspendidos en volúmenes de 4 ml las dos primeras fracciones y 2 ml las dos últimas de 25 mM HEPES, pH 7,5, 10 % glicerol, usando un homogeinizador de vidrio a  $0^{\circ}C$ . Las preparaciones destinadas a ensayo de actividad HPL incluían 0.5% de Tritón X-100 en el tampón de resuspensión. Las fracciones resuspendidas fueron denominadas 3 K, 15 K, 40 K y 150 K respectivamente.

## 2.6.2. Distribución histológica.

Para llevar a cabo la separación de tejidos se partió de frutos frescos verdes de un diámetro entre 1,5 y 2,5 cm. Una vez lavados, los frutos se deshuesaron, cortándose anillos de pulpa de su parte central en forma análoga al Apartado 2.6.1. Dichos anillos se colocaron en una placa Petri conteniendo tampón Pi-A, de forma que con un sacabocados de tamaño



**Figura 2.3.** Protocolo de fraccionamiento del extracto crudo de aceitunas para la obtención de diferentes fracciones subcelulares.

adecuado se separaron un anillo de epicarpo verde y otro de mesocarpo, procurando eliminar contaminación de un tejido en otro con un bisturí. Cuando se tuvieron unos 5 g de cada tejido se procedió a preparar de forma separada extractos crudos según el protocolo establecido en el apartado anterior, los cuales fueron finalmente fraccionados por centrifugación diferencial, obteniéndose las correspondientes fracciones 3 K, 15 K, 40 K y 150 K de cada tejido.

### 2.6.3. Preparación de polvo acetónico de pulpa de aceitunas.

Aceitunas recién recogidas fueron deshuesadas y 100 g aproximadamente de la pulpa obtenida fueron molturados con 750 ml de acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La operación se realizó en tres pasos implicando homogeneización en una batidora doméstica y filtración a vacío en Buchner de la suspensión resultante. Cada paso de homogeneización se realizó a un nivel medio de revoluciones, con 250 ml de la acetona fría durante tres periodos de 30 s. El sólido retenido se lavó finalmente con 150 ml de éter etílico seco para eliminar los restos de agua, extendiéndose a continuación sobre una hoja de papel bajo una campana de gases a fin de permitir la eliminación del disolvente. El polvo acetónico así obtenido fue tamizado para eliminar las partículas más gruesas, almacenándose a  $-20^{\circ}\text{C}$  en frascos herméticos dotados de desecador de gel de sílice, condiciones en las que se preservaron las actividades enzimáticas durante al menos un año.

#### 2.6.4. Preparación de extractos de polvo acetónico.

Extractos conteniendo actividad ADH o AAT se obtuvieron del polvo acetónico descrito en el apartado anterior resuspendiendo 100 mg de material en 3 ml de tampón de resuspensión (ver composición más adelante), usando un homogeinizador manual de vidrio enfriado en un baño de hielo. La suspensión resultante se introdujo en tubos Eppendorf, que fueron centrifugados a 10000 rpm durante 3 minutos en una microcentrífuga. El sobrenadante claro obtenido constituyó el extracto crudo. En preparaciones a mayor escala se mantuvo la razón peso/volumen de polvo acetónico frente a tampón de resuspensión, llevándose a cabo la centrifugación durante 10 minutos a 30000×g en la centrífuga preparativa Sorvall RC5C. Los tampones empleados fueron 50 mM fosfato potásico, pH 7,2, 7 mM 2-mercaptoetanol, 0,5 mM DTE, 10% glicerol para la ADH, y 25 mM HEPES, pH 7,5, 0,05% Tritón X-100, 7mM 2-mercaptoetanol, 10% glicerol para la AAT.

#### 2.6.5. Fraccionamiento de la proteína soluble con sulfato amónico.

El extracto enzimático a fraccionar se colocó en un vaso de precipitado situado en un baño de hielo. Seguidamente se añadió lentamente la cantidad de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  adecuada para alcanzar el nivel de saturación deseado, manteniendo la disolución continuamente agitada. Una vez añadida la sal la disolución se mantuvo con agitación suave durante 30 minutos a 0°C. La suspensión resultante fue centrifugada durante 10 minutos a 30000×g. A continuación la disolución sobrenadante se decantó, y el precipitado se resuspendió en un volumen adecuado de tampón usando un homogeinizador manual de vidrio. El tampón utilizado varió según la enzima a ensayar posteriormente. Así, éstos fueron 50 mM fosfato potásico, pH 7,2, 7 mM 2-mercaptoetanol, 0,5 mM DTE, 10% glicerol para la ADH, y 25 mM HEPES, pH 7,5, 10% glicerol, 0,1% ascorbato para la AAT.

### 2.6.6. Preparación de lipoxigenasa de patata.

La LOX de tubérculo de patata se preparó de acuerdo al protocolo establecido por Galliard y Phillips (1971). Una masa de 50 g de tubérculo de patata, previamente lavada y troceada, se homogeneizó en una batidora con 100 ml de 50 mM fosfato potásico, pH 7,0, 2 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , filtrándose el homogenado resultante a través de 2 capas de tejido Miracloth. Seguidamente el filtrado obtenido se centrifugó durante 15 minutos a  $40000\times g$ , rechazándose el precipitado y sometiéndose el sobrenadante a fraccionamiento por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Un solo corte desde 0 al 50% de saturación fue realizado, resuspendiéndose el precipitado obtenido en 8 ml de 50 mM fosfato potásico, pH 7,2, 50% glicerol. Dicho corte de proteína contenía unos 20 nkat/mg prot de actividad LOX.

### 2.6.7. Cambio de solvente de fracciones enzimáticas.

El cambio de solvente se realizó introduciendo 2 ml de extracto en una columna preempaquetada de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia) previamente equilibrada con 25 ml del tampón en el que se desea tener la disolución de enzima. Cuando toda la fracción hubo entrado en columna ésta se eluyó con 3 ml del mismo tampón, recogiendo a salida de la misma la fracción enzimática en el nuevo solvente.

## 2.7. INCUBACIONES CON SUBSTRATOS RADIATIVOS.

Los precursores utilizados en estos experimentos fueron ácido linoleico marcado en el carbono uno ( $[1-^{14}\text{C}]-18:2$ ) y uniformemente marcado ( $[U-^{14}\text{C}]-18:2$ ). En el primer caso se analizó la incorporación del precursor en compuestos no volátiles por CCF, en el segundo su incorporación en compuestos volátiles por CGL.

### 2.7.1. Experimentos de marcaje con $[1-^{14}\text{C}]-\text{linoleato}$ .

Estos experimentos se realizaron por incubación del mencionado precursor radiactivo con

resuspensiones de polvo acetónico de aceituna. El extracto enzimático consistió en una suspensión de 100 mg de polvo acetónico en 3 ml de 50 mM MES, pH 6,0, 7 mM 2-mercaptoetanol, 0,5% Tritón X-100, preparado a temperatura ambiente con un homogeneizador manual de vidrio. El medio de incubación contenía 1 mM [1-<sup>14</sup>C]-linoleato (5,7 kBq/μmol) y 0,25 ml de resuspensión de polvo acetónico, equivalentes a aproximadamente 1 mg de proteína, en 0,3 ml de volumen final. Las incubaciones se realizaron por duplicado en tubos Pirex dotados de tapón de rosca durante 30 minutos, a temperatura ambiente y con agitación continua proporcionada por pequeños agitadores magnéticos introducidos en cada tubo. Una vez finalizado el tiempo de incubación se añadieron 50 μl de ácido acético glacial a cada muestra, procediéndose a la extracción de lípidos, según se describe a continuación.

#### ***2.7.1.1. Extracción de lípidos.***

La extracción de lípidos se realizó siguiendo el protocolo establecido por Hara y Radin (1978). Al final de la incubación se añadió un volumen de 5 ml de hexano-isopropanol (3:2) a la mezcla de reacción y a continuación 2,5 ml de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 6,7%. Los tubos se agitaron vigorosamente y se centrifugaron 2 minutos x 2500 rpm. De esta forma se decantó una fase orgánica superior que fue retirada con una pipeta Pasteur. A continuación la fase acuosa se reextrajo con 3,5 ml de hexano-isopropanol (7:2), siguiendo el mismo procedimiento anterior. Se tomaron alícuotas del extracto orgánico y de la fase acuosa remanente para medir su radiactividad por centelleo líquido.

#### ***2.7.1.2. Fraccionamiento de lípidos.***

La fase orgánica conteniendo los lípidos obtenida en la etapa anterior fue evaporada bajo N<sub>2</sub> a sequedad, redisolviéndose el residuo en 50 μl de cloroformo. Los lípidos así obtenidos fueron fraccionados por CCF en placas de 20 x 20 cm junto con los patrones de hidroperóxidos y oxoácidos según se indica en el procedimiento general (Apartado 2.4.1). Las placas fueron desarrolladas con hexano-éter etílico-ácido fórmico (50:50:1), siendo reveladas a continuación las bandas correspondientes a lípidos radiactivos por contaje durante un tiempo de 1 a 2 h en un betascopio Instant Imager. La posición de los patrones se determinó por exposición de la placa a vapores de yodo.

Una vez identificadas y localizadas las bandas radiactivas en la placa, ésta se pulverizó con H<sub>2</sub>O-MeOH (1:1), y se procedió al raspado de las mismas. La radiactividad de cada una de ellas fue medida por centelleo líquido.

### 2.7.1.3. Estudios de especificidad.

En los experimentos de marcaje encaminados al estudio de la especificidad del sistema de producción de aldehidos volátiles en aceituna el protocolo de extracción y fraccionamiento de lípidos fue diferente al anteriormente indicado.

En estos experimentos se empleó [1-<sup>14</sup>C]-linoleato con una radiactividad específica de 130 kBq/μmol. A los productos de la incubación se le añadieron 15 μl de 5M HCl y 25 μl de 2,4-dinitrofenilhidrazina al 2% en 2M HCl, manteniéndose 30 minutos a temperatura ambiente, con lo que se formaron las correspondientes DNPHZ de los oxoácidos presentes en el medio (Apartado 2.5.1.3.). A continuación se procedió a la extracción y concentración de lípidos según se indica en el Apartado 2.7.1.1. Los extractos resultantes fueron fraccionados por CCF en placas de gel de sílice impregnadas con polietilenglicol-400 (PEG-400), empleándose éter etílico-hexano-ácido fórmico (80:20:1) como fase móvil. Este sistema permitió la separación del precursor no transformado, de la fracción de hidroperóxidos y de las DNPHZs de los ácidos 12-oxo-9(Z)-dodecenoico y 9-oxononanoico. Los porcentajes relativos de incorporación en dichos compuestos fueron calculados por contaje durante 1h en el betascopio Instant Imager. A continuación la fracción de hidroperóxidos marcados fue raspada de la placa y eluída de la sílice, siendo éstos metilados con diazometano (Apartado 2.5.1.1) y reducidos con NaBH<sub>4</sub> (Apartado 2.5.1.2) hasta sus correspondientes hidroximetil ésteres. Dichos compuestos fueron cromatografiados en placas de gel de sílice empleándose hexano-éter etílico 3:2 como solvente. En este sistema fue posible separar el 13- del 9-hidroxiéster, estableciéndose el porcentaje relativo de incorporación en cada isómero por contaje en el betascopio durante 2 h.

### 2.7.2. Experimentos de marcaje con [U-<sup>14</sup>C]-linoleato.

Estos experimentos se realizaron por incubación del mencionado precursor con

resuspensiones de polvo acetónico de aceitunas realizadas por homogeneización de 100 mg del mencionado polvo acetónico en 5 ml de 50 mM MES, pH 6,0, 7 mM 2-mercaptoetanol, 0,5 % Tritón X-100 utilizando un homogeneizador de vidrio a temperatura ambiente. El medio de incubación contenía 0,5 mM [U-<sup>14</sup>C]-linoleato (50 kBq/μmol) y 0,25 ml de resuspensión de polvo acetónico, equivalentes aproximadamente a 0,75 mg de proteína, en un volumen final de 0,3 ml. Las incubaciones se realizaron por duplicado en viales de vidrio de 2 ml de capacidad, dotados con septum de teflón y ventana de inyección. Las incubaciones de rutina se realizaron a temperatura ambiente con agitación basculante. Una vez concluido el tiempo de incubación se inyectaron en cada vial 15 μl de disolución de <sup>14</sup>C-acetato de isoamilo, equivalentes a 250 Bq, que servirán como patrón interno, introduciéndose los viales a continuación en un baño calefactado a 70°C. Después de 30 minutos se tomó una muestra de 1 ml del espacio de cabeza para el análisis de volátiles mediante radio-CGL (Apartado 2.4.2.1.). Una vez determinados los volátiles, los viales se retiraron del baño, y se tomaron 0,2 ml de la mezcla de incubación que contenía cada uno, que fueron introducidos en tubos de metilar para la determinación de los compuestos no volátiles mediante el protocolo descrito en el Apartado 2.7.1.3.

## **2.8. ENSAYOS ENZIMÁTICOS.**

### **2.8.1. Lipoxigenasa.**

Esta enzima se ensayó empleando los siguientes métodos:

#### ***2.8.1.1. Método espectrofotométrico de Axelrod et al. (1981).***

La reacción catalizada por la LOX implica la introducción de una molécula de oxígeno en el sistema de dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados. Como se describió en el Apartado 1.5, dicha reacción conlleva la migración un doble enlace C-C, de forma que en los productos finales (los hidroperóxidos de los mencionados ácidos grasos) aparece una secuencia de dobles enlaces conjugados que no se encuentra presente los substratos (Figura 1.3). Esta conjugación de dobles enlaces es la responsable de que dichos hidroperóxidos posean una fuerte banda de absorción en el ultravioleta, mostrando un máximo de



absorbancia a 234 nm, con un coeficiente de extinción molar de 25000.

El método de ensayo de actividad LOX descrito por Axelrod *et al.*(1981) se basa en la diferencia de absorbancia a 234 nm que existe entre los ácidos grasos poliinsaturados y sus correspondientes hidroperóxidos. El procedimiento general consiste en la medida continua y en función del tiempo del incremento de absorbancia a 234 nm del medio de reacción (una disolución tamponada de ácido linoleico o linolénico) causada por la adición del extracto enzimático.

En el caso de la LOX de aceituna la mezcla de ensayo estándar consistía en 50 mM acetato sódico, pH 5,0, 0,4% Tween-20, 0,5 mM de ácido graso, y una cantidad de extracto enzimático equivalente a entre 10 y 50 µg de proteína, en un volumen final de 1 ml contenido en una cubeta de cuarzo. El ensayo se inicia en ausencia de extracto enzimático, que se añade al medio de reacción una vez que se comprueba la estabilidad de la línea base. A continuación se mide el incremento de absorbancia a 234 nm durante el primer minuto de reacción. La actividad del extracto se calculó considerando un coeficiente de extinción molar a 234 nm de 25000 para los hidroperóxidos de los ácidos grasos linoleico y linolénico.

### **2.8.1.2. Método espectrofotométrico de Jiang *et al.*(1991).**

Los hidroperóxidos de los ácidos grasos poliinsaturados son capaces de oxidar en disolución acuosa el  $Fe^{2+}$  para dar lugar a  $Fe^{3+}$  más el correspondiente hidroxiácido. Jiang *et al.*(1991) desarrollaron un procedimiento de medida de la peroxidación de membranas biológicas basado en esta reacción. Dicho método consiste en la incubación las muestras de membrana en un medio conteniendo  $Fe^{2+}$ , seguida de la determinación del  $Fe^{3+}$  producido empleando un reactivo específico, el naranja de xilenol. Dicho método ha sido posteriormente empleado en la medida de actividad LOX sobre glicerolípidos por Piazza y Nuñez (1995). En el presente trabajo se empleó como procedimiento de medida de LOX alternativo al de Axelrod *et al.*(1981).

La mezcla de ensayo consistió en una disolución 50 mM acetato sódico, pH 5,0, 0,5 mM de ácido linoleico o linolénico y extracto enzimático equivalente a entre 20 y 50 µg de proteína en un volumen final de 0,5 ml. Esta disolución se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, después de lo cual se tomó un volumen de 0,1 ml que fue añadido sobre

0,9 ml de reactivo de naranja de xilenol (ver composición más adelante). La disolución resultante se agitó y se dejó desarrollar el color durante 30 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 560 nm frente a un blanco constituido por la disolución resultante de mezclar 0,1 ml de mezcla de ensayo sin extracto enzimático y 0,9 ml de reactivo de naranja de xilenol. La actividad LOX fue calculada tomando un coeficiente de extinción molar de 43000 para el cromóforo formado.

Reactivo naranja de xilenol: 0,1 mM naranja de xilenol (Sigma-Aldrich, EEUU), 0,25 mM  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 4 mM BHT, en metanol.

## 2.8.2. Hidroperóxido liasa.

La enzima hidroperóxido liasa fue ensayada por dos métodos diferentes que se describen a continuación.

### 2.8.2.1. Medida de la destrucción del dieno conjugado.

La lisis de los hidroperóxidos catalizada HPL (Figura 1.3) implica la destrucción del grupo cromóforo constituido por los dos dobles enlaces conjugados descrito en el Apartado 2.8.1.1. De esta forma, la actividad HPL puede ser determinada mediante la medida del descenso de absorbancia a 234 nm provocado por el extracto enzimático en una disolución acuosa de concentración conocida de hidroperóxido del ácido linoleico o linolénico. Este método ha sido empleado por varios autores para la medida de actividad HPL procedente de distintas fuentes (Kim y Grosh, 1981; Schreier y Lorenz, 1982; Shibata *et al*, 1995).

Para la determinación de la HPL de aceituna la mezcla de ensayo estándar consistió en 50 mM MES, pH 6,0, 40  $\mu\text{M}$  de hidroperóxido y una cantidad de extracto enzimático equivalente a entre 10 y 20  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen final de 1 ml contenido en una cubeta de cuarzo. El procedimiento de medida de actividad empleado fue análogo al descrito en el Apartado 2.8.1.1. para la LOX, implicando la comprobación de la estabilidad de la línea base, más la medida del descenso de absorbancia a 234 nm durante el primer minuto de reacción causada por la adición del extracto enzimático.

### 2.8.2.2. Medida de la formación de hexanal.

Los productos de la rotura de los hidroperóxidos de los ácidos grasos por parte de la HPL son aldehidos volátiles y oxoácidos (Figura 1.3). En el caso del ácido 13-EZ-hidroperoxilinoico los productos resultantes son el hexanal y el ácido 12-oxo-9(Z)-dodecenoico, cuyos derivados DNPHZ son fácilmente separables por CCF en placas de sílice (Apartado 2.4.1.). Por otra parte, la hexil-DNPHZ muestra una fuerte banda de absorción a 357 nm, con un coeficiente de extinción molar calculado experimentalmente de 23000. El presente método de ensayo se basó en la determinación espectrofotométrica del hexanal producido por el correspondiente extracto enzimático a partir del mencionado hidroperóxido, siendo una modificación de los métodos publicados por Shibata *et al.* (1995) y Olías *et al.* (1990).

La mezcla de ensayo consistió en una disolución 50 mM MES, pH 6,0, 1 mM de ácido 13-ZE-hidroperoxilinoico, y una cantidad de extracto enzimático equivalente a entre 50 y 100 µg de proteína en un volumen final de 1 ml. Las disoluciones de ensayo fueron incubadas 5 minutos a temperatura ambiente en tubos Pirex dotados de tapón de rosca, después de lo cual se añadieron 0,25 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina al 2 % en 5M HCl. Los tubos se mantuvieron a 80°C durante 10 minutos, siendo enfriados seguidamente en un baño de hielo. Estas disoluciones fueron extraídas a continuación por tres veces con 0,5 ml de cloroformo. Las fases orgánicas obtenidas fueron combinadas y evaporadas bajo N<sub>2</sub>. El residuo resultante se redisolvió en 50 µl de cloroformo y se fraccionó por CCF en placas de sílice, empleándose hexano-éter etílico-ácido fórmico (50:50:1) como solvente. La banda correspondiente a la DNPHZ de hexanal fue localizada por comparación de su R<sub>f</sub> con el correspondiente patrón y raspada de la placa. Dicho compuesto fue eluído de la sílice con 1 ml de etanol y se determinó la absorbancia de la disolución resultante a 357 nm. El blanco estuvo constituido por una preparación conteniendo extracto enzimático hervido.

### 2.8.3. Alcohol deshidrogenasa.

La reducción de aldehidos catalizada por la ADH (Figura 1.6) se ensayó midiendo la disminución de absorbancia a 334 nm debida a la oxidación de piridín nucleótidos. La mezcla de ensayo estándar contenía 50 mM fosfato potásico, pH 7,2, 10 mM hexanal, 0,2

mM NAD(P)H, y una cantidad de extracto enzimático equivalente a entre 10 y 20  $\mu$ g de proteína en un volumen final de 1 ml. Cuando se ensayó esta actividad con aldehídos de cadena larga se añadió un 0,4% de Tween-20 a la mezcla de ensayo con el fin de facilitar la disolución de los mismos. En todos los casos la reacción se iniciaba mediante la adición del sustrato carbonílico.

#### **2.8.4. Alcohol aciltransferasa.**

La síntesis de ésteres catalizada por la AAT conlleva la transferencia de un grupo acilo desde un tioéster de CoA hasta un alcohol volátil. La reacción implica la liberación del cofactor CoA-SH de forma concomitante a la producción de los mencionados ésteres (Figura 1.7). La actividad enzimática puede ser ensayada, por tanto, mediante la medida del CoA-SH liberado en el medio de reacción. Dicha medida se llevó a cabo según el método descrito por Fellman *et al.* (1993), consistente en la adición a la mezcla de ensayo de ácido 5,5-ditio-bis-nitrobenzoico (DTNB), compuesto que reacciona con los tioles libres produciendo una especie fuertemente coloreada que se determina espectrofotométricamente.

La mezcla de ensayo contenía 50 mM HEPES, pH 7,5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM hexanol, 0,4 mM acetil-CoA y una cantidad de extracto enzimático equivalente a 50-100  $\mu$ g de proteína en un volumen final de 0,5 ml. Dicha mezcla de ensayo fue incubada 10 minutos a 30°C, añadiéndose a continuación 25  $\mu$ l 20 mM de DTNB disuelto en 0,1 M de HCO<sub>3</sub>Na. Después de haberse desarrollado el color, proceso que llevó unos 10 minutos, fue medida la absorbancia a 407 nm de las muestras. La actividad AAT se calculó a partir de la diferencia de absorbancia entre muestras conteniendo hexanol y blancos con la misma composición pero sin el mencionado alcohol. El valor del coeficiente de extinción molar a 407 nm del cromóforo formado por el DTNB y el CoASH, determinado experimentalmente, fue 10400.

### **2.9. PURIFICACIÓN DE ENZIMAS.**

De las enzimas que participan en la ruta de la LOX se purificaron parcialmente la HPL y la ADH.

### 2.9.1. Purificación de la hidroperóxido liasa.

#### *2.9.1.1. Preparación y solubilización de la enzima.*

En la purificación descrita en el Apartado 3.3.4 de Resultados y Discusión se partió de 225 g de aceitunas recolectadas 16 semanas después de la floración que fueron triturados en una batidora doméstica en presencia de 500 ml de tampón de molturación (ver Apartado 2.6.1) y 50g de PVPP lavado con ácido. La suspensión obtenida se filtró a través de dos capas de tejido Miracloth, constituyendo el extracto resultante el homogenado crudo de aceituna. A continuación dicho extracto fue centrifugado a 20000×g durante 30 minutos. El precipitado se resuspendió en 50 ml de 25 mM TRIS, pH 8,0, 10% glicerol, 7 mM 2-mercaptoetanol, usando un homogenizador manual de vidrio, volviéndose a centrifugar a 20000×g durante 15 minutos. Este segundo precipitado se resuspendió de nuevo en un volumen de 50 ml 25 mM TRIS, pH 8,0, 10% glicerol, 7 mM 2-mercaptoetanol, 0,5% Tritón X-100 (tampón A), con objeto de solubilizar las membranas biológicas contenidas en él. La suspensión se mantuvo 1 h con agitación en un baño de hielo y finalmente se centrifugó a 40000×g durante 20 minutos, constituyendo el sobrenadante la fracción de membranas solubilizadas.

#### *2.9.1.2. Cromatografía de intercambio iónico.*

La fracción de membranas solubilizadas se introdujo en una columna de cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sepharosa (150 x 15 mm), equipada con camisa refrigerante a 3°C, equilibrada con tampón A. A continuación la columna se eluyó con 310 ml del mismo tampón, a un flujo de 1 ml/min, tomándose fracciones de 11 ml a salida de columna. Seguidamente fue introducido en columna un gradiente lineal de NaCl desde 0 hasta 0,3 M en tampón A, abarcando un volumen de 120 ml, con el cual se eluyó la actividad HPL. Finalmente la columna fue eluída con 100 ml de NaCl 0,3 M en tampón A. Las fracciones activas se combinaron siendo destinadas a purificación por cromatografía en hidroxilapatito.

#### *2.9.1.3. Cromatografía en hidroxilapatito.*

Las fracciones activas combinadas resultantes de la etapa anterior se introdujeron en una columna de hidroxilapatito (100 x 15 mm), equilibrada con 25 mM fosfato potásico, pH 7,0, 7 mM 2-mercaptoetanol, 0,5% Tritón X-100 (tampón B). Acto seguido la columna fue

eluida con 50 ml de tampón B, a un flujo de 1 ml/min, recogándose fracciones de 10 ml a salida de columna. A continuación se introdujo un gradiente de fosfato potásico de 25 a 200 mM en el mismo tampón. Dicho gradiente abarcó un volumen de 100 ml, recogándose fracciones de 2,5 ml a salida de columna. Dos picos de actividad HPL fueron eluidos de la columna. Las fracciones de mayor actividad de cada pico se almacenaron a 5°C, procediéndose a continuación a la caracterización de las HPLs presentes en ellas.

## 2.9.2. Purificación de la alcohol deshidrogenasa.

### *2.9.2.1. Preparación del extracto y concentración de la actividad.*

Una masa de 3 g de polvo acetónico, preparado a partir de aceitunas recogidas 24 semanas después de la floración, se resuspendió en 90 ml 50 mM fosfato potásico, pH 7,2, 14 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM DTE, 10 % glicerol, utilizando un homogeizador de vidrio. La suspensión resultante fue centrifugada a 27000×g durante 10 minutos. Seguidamente, el sobrenadante obtenido fue fraccionado por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  según se indica en el Apartado 2.6.6. El corte de precipitación del 30 al 60% de saturación, conteniendo la mayor parte de la actividad, fue desalado sobre en una columna PD-10 (Apartado 2.6.7) frente a 25 mM fosfato potásico, pH 7,2, 7 mM 2-mercaptoetanol, 0,5 mM DTE, 10% glicerol (tampón C) y destinado a purificación por cromatografía de intercambio iónico.

### *2.9.2.2. Purificación por cromatografía de intercambio iónico.*

El corte de precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  obtenido en la etapa anterior fue introducido en la misma columna de cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sephadex utilizada para la purificación de la HPL (Apartado 2.9.1.2), equilibrada esta vez con tampón C. Después de cargar el extracto enzimático, la columna fue eluida con 50 ml de tampón C, a un flujo de 1 ml/min, y se tomaron fracciones de 11 ml a salida de columna. En estas condiciones un primer pico de actividad NADP-ADH denominado IE-1 fue eluido de la columna. A continuación ésta fue eluida con un gradiente de 225 ml desde 0 hasta 0,2 M de NaCl en tampón B, resultando la elución de un segundo pico (IE2) mostrando tanto actividad NAD- como NADP-ADH. Las fracciones activas correspondientes a los dos picos fueron combinadas y concentradas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , llevando las disoluciones

enzimáticas al 70% de saturación en dicha sal.

### **2.9.2.3. Purificación por cromatografía de afinidad.**

Las fracciones resultantes del paso anterior fueron sometidas a purificación por cromatografía de afinidad en una columna Cibacrom Blue-Sepharosa, 10 x 50 mm. El primer pico de actividad resultante de la cromatografía de intercambio iónico (IE 1), fue introducido en dicha columna, previamente equilibrada con tampón C. La columna fue eluída a continuación con 40 ml de tampón C, seguido de 40 ml de 1 M NaCl y 40 ml de 1 mM NADPH en el mismo tampón, introducidos a un flujo de 1 ml/min, recogiéndose fracciones de 5 ml sin que fuera eluída la actividad de la columna. Finalmente la actividad NADP-ADH (enzima NADP-ADH I) fue eluída con 50 ml de 3 M NaCl en tampón C. El segundo pico de actividad resultante de la etapa de purificación en DEAE-Sepharosa (IE-2), fue también purificado en la misma columna de afinidad. De esta forma, dicha fracción fue introducida en la columna previamente equilibrada con tampón C, y trabajando en las mismas condiciones que para la anterior fracción, la columna fue eluída con 50 ml del tampón C y 50 ml de 0,3 M NaCl en tampón C sin que se recuperase actividad enzimática alguna. A continuación se introdujeron en columna 50 ml de 1 mM NADH en el mismo tampón, con lo que fue eluído un pico mostrando exclusivamente actividad NAD-ADH (enzima NAD-ADH). Seguidamente la columna se eluyó con 50 ml 1 M NaCl en tampón C y finalmente con 50 ml 1 mM NADPH en el mismo tampón, con lo que fue eluído un pico mostrando exclusivamente actividad NADP-ADH (enzima NADP-ADH II). Las tres fracciones activas obtenidas fueron llevadas al 50% de glicerol y almacenadas a  $-25^{\circ}\text{C}$ .

## **2.10. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA Y CLOROFILA.**

### **2.10.1. Determinación de proteína.**

La determinación de proteína en extractos enzimáticos se realizó por los métodos que a continuación se describen. Todas las muestras se realizaron en duplicado.

#### **2.10.1.1. Método de Bradford (1976).**

Este método se empleó para extractos enzimáticos libres de Tritón X-100. Se tomaron 100

µl de extracto enzimático convenientemente diluido hasta un contenido de entre 2 y 10 µg de proteína. A continuación se añadieron 2 ml de reactivo de Coomasie, homogeneizándose la mezcla resultante por agitación suave. Después de 2 minutos se midió la absorbancia a 596 nm. El contenido de proteína se estableció por interpolación de la absorbancia medida en una recta de calibrado simultáneamente realizada con BSA.

Preparación del reactivo de Coomasie: Se disolvieron 50 mg de azul brillante de Coomasie E-250 en 25 ml de etanol, añadiéndose a continuación 50 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 %. La disolución resultante se llevó a 500 ml con agua destilada, almacenándose en una botella de vidrio topacio después de ser filtrada a través de papel.

#### **2.10.1.2. Método de Dulley y Grieve (1975).**

Este método es una modificación del reportado por Lowry *et al.* (1951) para muestras conteniendo Tritón X-100. Se partió de 0,25 ml de disolución convenientemente diluida conteniendo entre 10 y 100 µg de proteína, a la que se añadió 1,25 ml de disolución 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 M NaOH, 0,78 % dodecilsulfato sódico, 0,01 % tartrato sódico, siendo la muestra rápidamente homogeneizadas en Vortex. Las disoluciones obtenidas se mantuvieron 10 minutos a temperatura ambiente, añadiéndose a continuación 0,125 ml de reactivo comercial Lowry-Cicateoult al 50 % en agua destilada. Después de 30 minutos a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 750 nm. El contenido de proteína se estableció por interpolación de la absorbancia medida en una recta de calibrado previamente realizada con BSA.

#### **2.10.2. Determinación de clorofila.**

La clorofila se determinó por el método espectrofotométrico descrito por Bruinsma (1961). A 0,2 ml de extracto enzimático se añadieron 0,8 ml de acetona, centrifugándose a continuación la mezcla resultante a 2000×g durante 2 minutos en el caso de fracciones enzimáticas de membrana. Seguidamente se midió la absorbancia a 652 nm, y se calculó la concentración de clorofila considerando que una disolución de concentración 1mg/ml de dicho compuesto da lugar a un valor de absorbancia a 652 nm igual a 26 (Douce *et al.*, 1990).



### **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

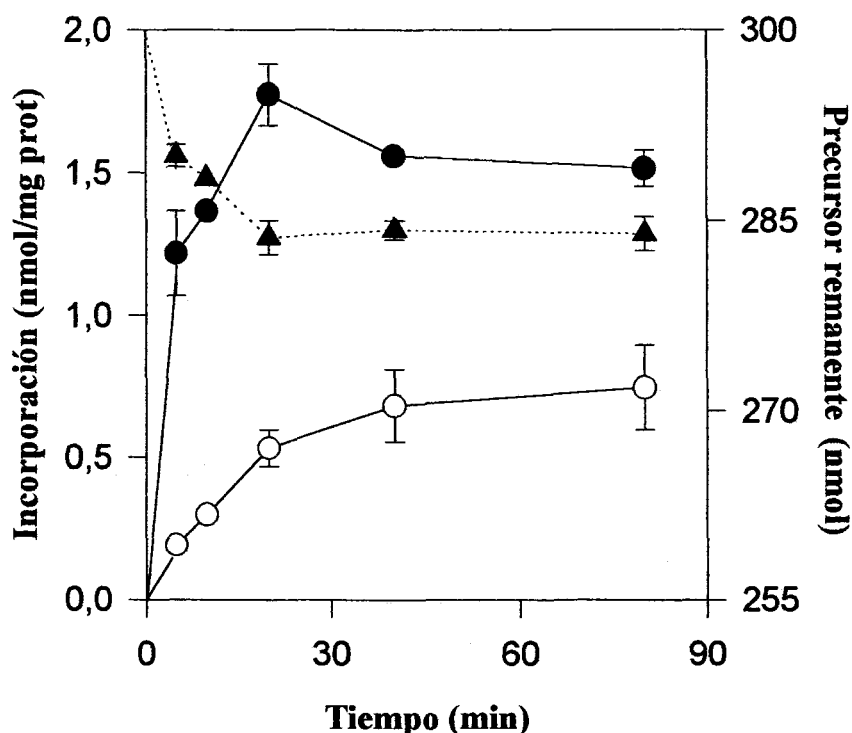
### **3.1. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD GLOBAL DE LA RUTA DE LA LIPOXIGENASA: EXPERIMENTOS CON PRECURSORES RADIATIVOS.**

Estos experimentos se llevaron a cabo por incubación de ácido linoleico marcado con suspensiones de polvo acetónico de aceituna, con objeto de caracterizar globalmente la ruta de la lipoxigenasa en los mencionados frutos. El uso de polvo acetónico de aceituna supuso una serie de ventajas sobre el uso de tejido fresco. Así, la aceituna, además de ser un fruto rico en polifenoles y pigmentos, compuestos que podrían inhibir las enzimas de la ruta estudiada (Cohen *et al.*, 1984; Dohi *et al.*, 1991; Richard-Forget *et al.*, 1995), posee un período de desarrollo muy largo, que limita la disponibilidad de material biológico fresco durante gran parte del año. El uso de polvo acetónico permitió trabajar con un material libre de lípidos neutros, polifenoles y pigmentos, que son extraídos en la acetona fría, y que en las condiciones de almacenamiento empleadas mantiene la actividad bioquímica inalterada durante meses.

Los sustratos utilizados fueron ácido linoleico marcado en el carbono uno ([1-<sup>14</sup>C]-18:2) o uniformemente marcado ([U-<sup>14</sup>C]-18:2). En los experimentos realizados con el primero se llevó a cabo el análisis de la incorporación en compuestos no volátiles, mientras que en los realizados con el segundo se estudió el marcaje en compuestos volátiles mediante análisis del espacio de cabeza de los viales de incubación.

#### **3.1.1. Experimentos de marcaje con [1-<sup>14</sup>C]-linoleato.**

Los productos de la incubación de [1-<sup>14</sup>C]-linoleato con polvo acetónico de aceituna fueron típicamente hidroperóxidos y oxoácidos, compuestos resultantes de la acción de las enzimas LOX y HPL sobre el sustrato radiactivo. La naturaleza de dichos compuestos, así como la influencia de diferentes parámetros de operación sobre la producción de los mismos se investigó en estos experimentos.



**Figura 3.1.** Influencia del tiempo de incubación en la formación de hidroperóxidos (-●-) y oxoácidos (-○-) a partir de [1-<sup>14</sup>C]-18:2 (-▲-). Se empleó polvo acetónico de aceitunas preparado a partir de aceitunas recogidas 20 semanas después de la floración. Los resultados son la media de dos determinaciones.

### 3.1.1.1. Influencia del tiempo de incubación.

Como primer acercamiento al estudio de la actividad global de la ruta de la ruta de la LOX se realizó un seguimiento en función del tiempo de la producción de hidroperóxidos y oxoácidos a partir del precursor marcado. Para ello se analizó la incorporación en dichos compuestos que tuvo lugar a lo largo de un intervalo de tiempo de 80 minutos.

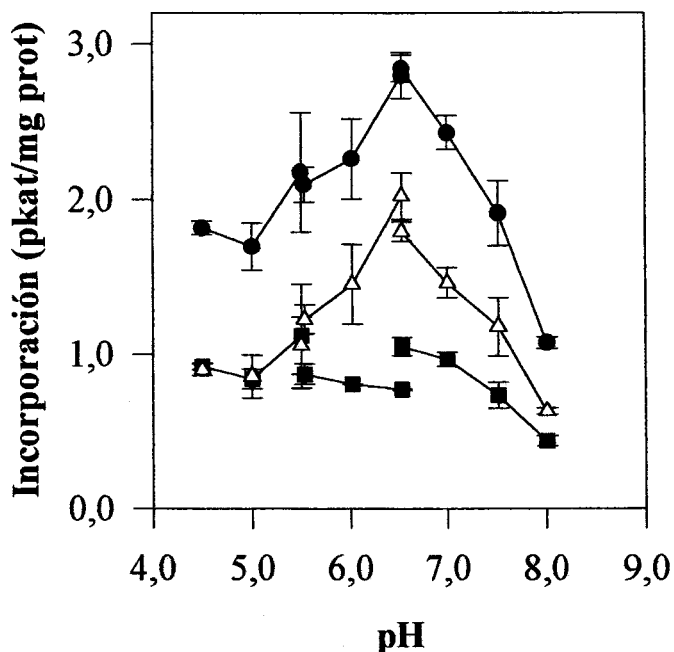
Los resultados se muestran en la Figura 3.1. Como puede observarse, se produjo una rápida incorporación de radiactividad en hidroperóxidos a tiempos cortos de incubación, que fue haciéndose moderada a tiempos más largos hasta alcanzados 20 minutos, punto en el que comenzó a disminuir, haciéndose prácticamente constante en los últimos 40 minutos. Por el contrario la producción de oxoácidos se incrementó a lo largo

del experimento de forma continua y progresiva, observándose los mayores incrementos de la radiactividad incorporada a tiempos cortos de incubación. De estos resultados puede deducirse que la LOX presente en el polvo acetónico de aceituna actúa rápidamente, produciendo la mayor parte de los hidroperóxidos en los primeros minutos de reacción. La actividad LOX disminuyó a lo largo del experimento, haciéndose prácticamente nula a partir de los 20 minutos de incubación, como queda reflejado en la curva de precursor, el cual no registró disminución alguna a partir del tiempo señalado. Esta rápida pérdida de actividad puede deberse a la inactivación por producto de la LOX, reportada para otras fuentes en trabajos anteriores (Fauconnier y Marlier, 1996). Por otra parte, el incremento progresivo de la incorporación en oxoácidos se debió a la acción de la HPL sobre los hidroperóxidos que a medida que avanzaba la reacción catalizada por la LOX se encontraban disponibles en el medio. Al permanecer inactiva dicha enzima a partir del minuto 20, puede observarse como el incremento en oxoácidos es equivalente a la disminución de hidroperóxidos, indicando que la HPL continúa catalizando la lisis de estos últimos.

En base a estos resultados se estableció un tiempo de incubación de 30 minutos para los restantes experimentos, debido a que éste es el tiempo aproximado en el que permanece activa la LOX. Por otra parte, y a efectos prácticos, el tiempo normal de batido de la pasta de aceituna durante la elaboración de aceite de oliva es, así mismo, 30 minutos (Alba, 1997).

#### *3.1.1.2. Efecto del pH del medio.*

La influencia del pH sobre la ruta de la LOX en frutos de aceituna fue estudiada efectuando incubaciones del substrato marcado con polvo acetónico en un intervalo de dicho parámetro que abarcó desde pH 4,5 hasta pH 8,0. Para ello se emplearon los tampones acetato sódico, HEPES, y TRIS a una concentración de 50 mM. Una misma cantidad de polvo acetónico se resuspendió a temperatura ambiente en dichos tampones conteniendo 7 mM de 2-mercaptoetanol y 0,5 % Tritón X-100, realizándose las incubaciones como se indica en Materiales y Métodos (Apartado 2.7.1.). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.2. Se registraron incorporaciones tanto en hidroperóxidos como en oxoácidos a todos los valores de pH ensayados, lo que sugiere que las enzimas responsables de su producción poseen un intervalo amplio de actividad respecto a dicho parámetro. Las



**Figura 3.2.** Efecto del pH sobre la formación de hidropéroxidos (-■-) y oxoácidos (-Δ-) a partir de  $[1-^{14}\text{C}]-18:2$ , así como en la incorporación total (-●-). Se emplearon suspensiones de polvo acetónico de aceitunas recogidas 20 semanas después de la floración en diferentes tampones: acetato sódico (pHs de 4,5 a 5,5), MES (pHs de 5,5 a 6,5) y HEPES (pHs de 6,5 a 8). Cada punto representa la media de dos determinaciones.

mayores incorporaciones de radiactividad registradas tuvieron lugar a pH 6,5, lo que se ajusta a la acción de una LOX de características similares a la LOX-2 de la semilla de soja (Apartado 1.5.2.), con un valor de pH óptimo semejante al de otros frutos como el tomate o el pimiento (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1992; Ealing, 1994). Por otra parte, también se han descrito HPLs con un óptimo de pH similar, como es el caso de las de frutos de pimiento y tomate que mostraron su actividad máxima a pH 6,0 (Shibata *et al.*, 1995; Schreier y Lorenz, 1982).

### 3.1.1.3. Estudios de especificidad de sustrato y posición.

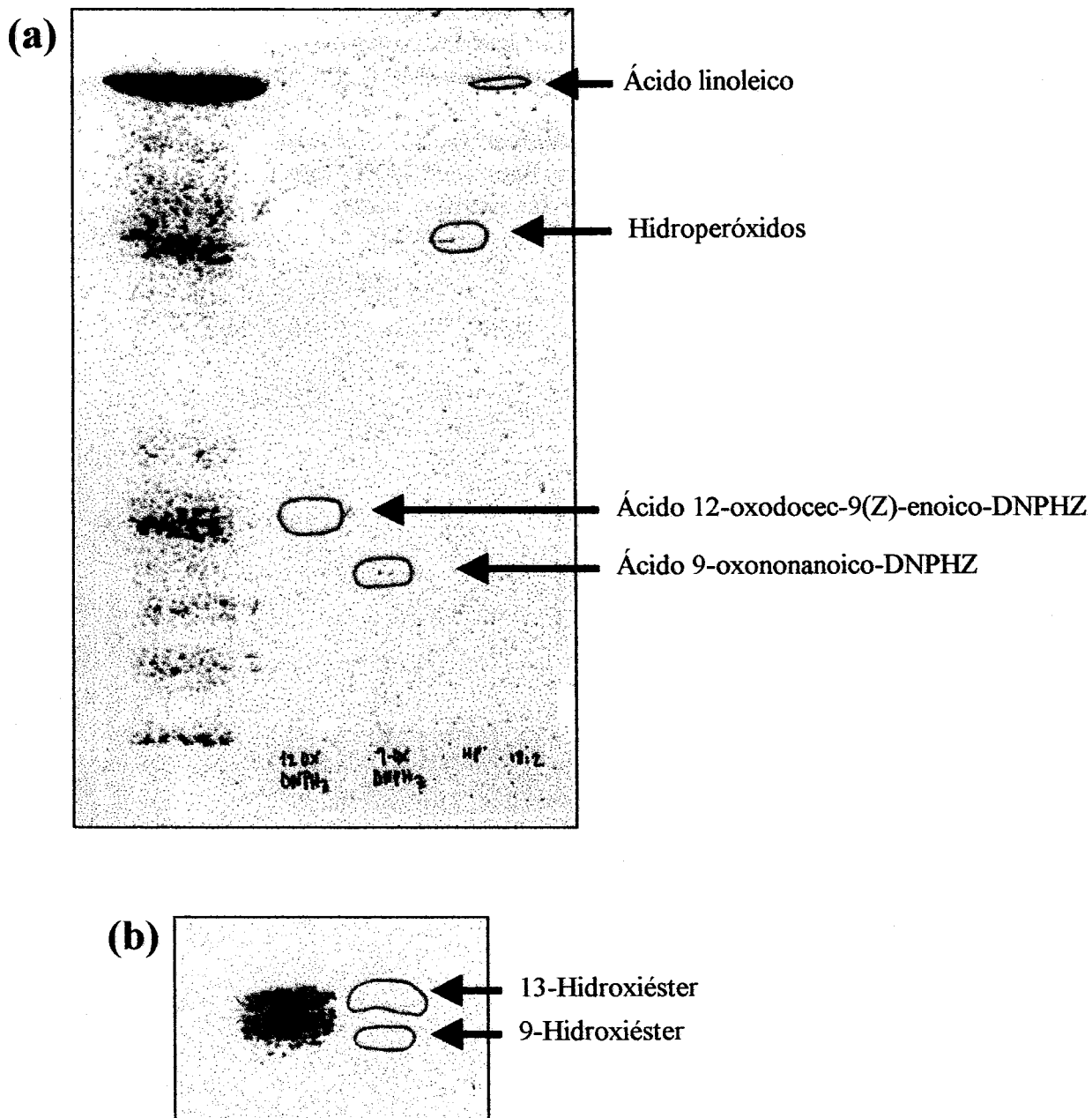
Las especificidades de las enzimas LOX y HPL de pulpa de aceituna son dos factores clave

a la hora de justificar bioquímicamente el perfil de volátiles del aceite de oliva virgen. Así, en función de estos parámetros se producirán volátiles de seis o de nueve átomos de carbono, que conferirán diferentes notas al aroma del producto final (Figura 1.2).

El análisis de la composición de las fracciones de oxoácidos e hidroperóxidos resultantes de la metabolización de [1-<sup>14</sup>C]-18:2 puede proporcionar información acerca de la regioespecificidad de la LOX, así como de la especificidad de sustrato de la HPL de la pulpa de aceituna. El procedimiento empleado para investigar este punto se describe en el Apartado 2.7.1.3. Dicho procedimiento implicó la derivatización de los oxoácidos producidos en el medio de incubación hasta sus correspondientes dinitrofenilhidrazonas (DNPHZs), seguida de la extracción y fraccionamiento de los lípidos resultantes en placas de sílice impregnadas en PEG-400. En este sistema se produjo la separación de las DNPHZs de los oxoácidos de 12 y nueve átomos de carbono, pudiéndose calcular la incorporación relativa de radiactividad en estos compuestos así como en hidroperóxidos totales (Figura 3.3a). Seguidamente, tal y como se describe en dicho apartado, se calculó la incorporación de radiactividad en los 13- y 9- isómeros dentro de la fracción de hidroperóxidos, cromatografiando sus correspondientes metil-hidroxiésteres en placas de sílice (Figura 3.3b). Los resultados se muestran en la Tabla 3.1. El ácido 12-oxododec-9(Z)-enoico fue el único componente de la fracción de oxoácidos, en la que no se detectó la presencia del producto alternativo, el ácido 9-oxononanoico. Sin embargo, en la fracción de

**Tabla 3.1.** Composición relativa de las fracciones de hidroperóxidos y oxoácidos producidos a partir de ácido linoleico por suspensiones de polvo acetónico de aceitunas (20 WAF). Los resultados son la media de dos determinaciones independientes.

Producto	Incorporación relativa (%)
Ácido 13-E,Z-hidroperoxilinoléico	21 ± 2
Ácido 9-E,Z-hidroperoxilinoléico	23 ± 5
Ácido 12-oxododec-9(Z)-enoico	56 ± 3
Ácido 9-oxononanoico	0



**Figura 3.3.** Cromatografía en capa fina de los productos de la incubación de una suspensión de polvo acetónico de aceitunas con  $[1-^{14}\text{C}]$ -18:2. (a) Radiocromatograma de los productos de incubación después del tratamiento con 2,4-dinitrofenilhidrazina y separados en placa de sílice impregnada en PEG-400 con éter etílico: hexano: ácido fórmico (80:20:1). (b) cromatografía en capa fina de los metil-hidroxiésteres de la fracción de hidroperóxidos resultante de (a) con hexano: éter etílico (3:2).

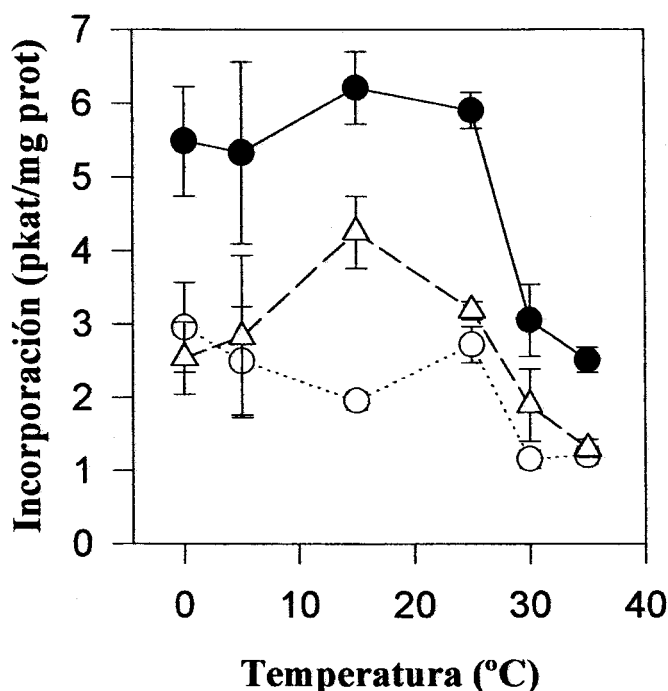
hidroperóxidos aparecieron cantidades similares tanto del 9- como del 13- isómero. Estos resultados indican que la HPL de aceituna se muestra estrictamente específica para catalizar la lisis de los 13-hidroperóxidos, lo que justificaría la sola presencia del ácido 12-oxo-9(Z)-dodecenoico, así como la ausencia del ácido 9-oxononanoico en la mezcla de reacción. Este patrón de especificidad de la HPL es el más común en el reino vegetal, habiendo sido reportado para frutos y hojas de distintas especies (Schreier y Lorenz, 1982; Matsui *et al.*, 1991; Shibata *et al.*, 1995). Por otra parte, en el caso de la LOX, aunque fueron detectados porcentajes equivalentes de ambos isómeros de posición, al realizar el cómputo total de los mismos incluyendo los que fueron escindidos a ácido 12-oxododec-9(Z)-enoico, resultó una alta regioespecificidad para la producción de 13-hidroperóxidos (77%). De esta forma, las enzimas LOX y HPL presentes en el fruto de la aceituna poseen la especificidad que cabría esperar para una eficaz producción de aldehídos de seis átomos de carbono, resultado que está plenamente de acuerdo con la composición de volátiles del aceite de oliva, donde estos compuestos son los mayoritarios y los enales de nueve átomos de carbono, así como sus productos derivados, están totalmente excluidos (Morales *et al.*, 1994).

#### **3.1.1.4. Influencia de la temperatura.**

El aceite de oliva virgen ha de ser obtenido, por definición, mediante métodos exclusivamente físicos, sin que medie en su manufactura ninguna transformación química introducida artificialmente con objeto de producir un aumento del rendimiento o una modificación de las características del producto final. Este hecho limita en gran medida las posibles modificaciones del proceso, enfocadas a una mejora de la calidad organoléptica del aceite, que se puedan llevar a cabo en función de las propiedades de las enzimas responsables de la síntesis de volátiles. De esta forma, dichas modificaciones quedan supeditadas a la optimización de los parámetros físicos que afectan a la mencionada ruta enzimática. Entre dichos parámetros, el que puede ser modificado con mayor facilidad es la temperatura de operación en la etapa de batido de la pasta de aceitunas.

El intervalo de temperaturas en el que se efectuaron las incubaciones del sustrato marcado con resuspensiones de polvo acetónico abarcó desde cero hasta 45°C, incluyéndose así las temperaturas de batido más comúnmente empleadas por la industria





**Figura 3.4.** Efecto de la temperatura sobre la metabolización de [1-<sup>14</sup>C]-18:2 a través de la ruta de la lipoxigenasa por polvo acetónico de aceitunas recogidas 20 semanas después de la floración. (-Δ-) Oxoácidos, (-○-) hidroperóxidos, (-●-) incorporación total. Los resultados son la media de dos determinaciones independientes.

(Alba, 1997). En la Figura 3.4 se muestra como, sorprendentemente, la metabolización del linoleato marcado se incrementó a bajas temperaturas, alcanzando un máximo a 15°C, y disminuyendo bruscamente a temperaturas superiores a 25°C. Este comportamiento fue más acusado si cabe en el caso de la incorporación de radiactividad en oxoácidos, asociada a la producción de aldehidos C6, no siendo tan claro, por otra parte, para la incorporación de radiactividad en hidroperóxidos. Estos datos indican que el sistema formado por las enzimas LOX y HPL de aceituna posee una temperatura óptima inusualmente baja para la degradación del ácido linoleico, implicando una estimulación de la producción de volátiles

a temperaturas menores a 25°C. Por otra parte, no deben descartarse otras posibilidades como una inactivación de dichas enzimas a temperaturas de trabajo moderadamente altas o un posible aumento del O<sub>2</sub> disponible para la LOX, debido a la mayor solubilidad de dicho gas a baja temperatura.

Los resultados obtenidos podrían ser interesantes desde un punto de vista tecnológico, ya que implican que cambios en un parámetro de operación como la temperatura utilizada durante el proceso de batido inducen una variación en la cantidad de volátiles del aceite obtenido, y por tanto, cambios en la calidad organoléptica del producto final. De esta forma, un aumento de la temperatura de operación por encima de 25°C con objeto de obtener un mayor rendimiento inactivaría considerablemente la biosíntesis de aldehidos volátiles, implicando una pérdida de flavor del aceite resultante.

La pérdida de flavor causada por altas temperaturas de batido es un fenómeno ya conocido por los almazareros, y que aparece descrito en varias publicaciones (Kiritsakis, 1994; Alba, 1997). Hasta la fecha, dicha pérdida de flavor había sido atribuida a una supuesta degradación o volatilización de los componentes del aroma. En el presente trabajo se aporta una justificación de dicho fenómeno basada en resultados a nivel bioquímico. Más adelante, en esta tesis, se profundizará en la influencia de la temperatura sobre la ruta estudiada, analizando el efecto que dicho parámetro ejerce sobre las enzimas LOX y HPL.

### 3.1.2. Experimentos de marcaje con [U-<sup>14</sup>C]-18:2.

Los experimentos de marcaje con [U-<sup>14</sup>C]-18:2 implicaron la determinación por radio-CGL de la incorporación de radiactividad en compuestos volátiles que tiene lugar a partir del mencionado precursor. La técnica empleada para la toma de muestras de estos últimos fue la de espacio de cabeza estático (Apartado 2.4.3.1), técnica que si bien resulta sencilla desde un punto de vista metodológico, plantea serios problemas de sensibilidad y reproducibilidad. El método desarrollado para subsanar las mencionadas dificultades fue la introducción de un patrón interno radiactivo en el sistema, que al tiempo de dar cuenta de la calidad del muestreo, permita efectuar la cuantificación de forma reproducible. El patrón interno radiactivo seleccionado fue el acetato de isoamilo por tres razones fundamentales: este compuesto mostró en el sistema de CGL empleado un tiempo de retención semejante al

de los patrones de los compuestos que serán objeto del análisis (hexanal, hexanol, acetato de hexilo); por otra parte, aunque el acetato de isoamilo aparezca en pequeñas cantidades en el perfil de volátiles del aceite de oliva virgen, está bien establecido que no se forma a partir de ácidos grasos, sino de aminoácidos (Myers *et al.*, 1970), siendo además un compuesto fácil de preparar por reacción directa de alcohol isoamílico con acetato radiactivo (ver Apartado 2.5.5).

Una vez seleccionado el patrón interno se hubo de establecer cuantitativamente la distribución de cada compuesto volátil entre la disolución acuosa en la que son producidos y el espacio de cabeza. El reparto de los compuestos hexanal, hexanol y acetato de isoamilo entre la fase acuosa y el espacio de cabeza fue calculado experimentalmente introduciendo disoluciones acuosas de concentración conocida de dichas sustancias en los viales de ensayo y analizando su espacio de cabeza por CGL. Estos viales se calentaron a 70°C para enriquecer el espacio de cabeza en volátiles y obtener así una mayor respuesta. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre las fases se estimó en 30 min. En la Figura 3.5 se muestran las gráficas de composición del espacio de cabeza en función de la concentración inicial de cada compuesto volátil. Así, se observó que la relación entre la concentración inicial en la fase acuosa y la composición final del espacio de cabeza era aproximadamente lineal. Los valores de las pendientes ( $H_i$ ) para cada uno de los compuestos ensayados se muestran en la Tabla 3.2, y son los que se han utilizado para cuantificar los compuestos volátiles obtenidos en los experimentos de marcaje realizados con  $[U-^{14}C]-18:2$ .

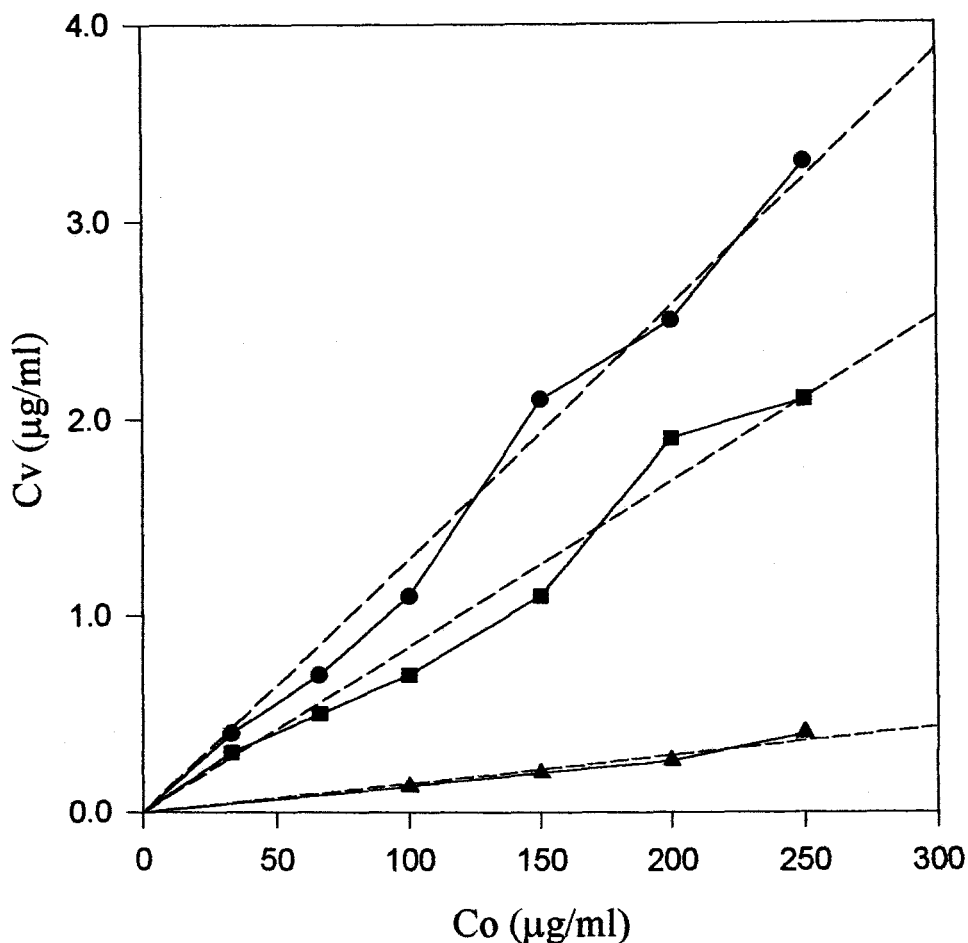
Así pues, conociendo el valor de  $H_i$  de un compuesto volátil dado “i”, puede establecerse que en el equilibrio:

$$C_{vi} = C_{oi} H_i \quad (a)$$

donde  $C_{vi}$  es la concentración en la fase vapor y  $C_{oi}$  la concentración inicial en la fase acuosa del compuesto dado.

En el caso de que “i” fuera un compuesto radiactivo la concentración y la radiactividad se relacionarán a través de la radiactividad específica ( $\theta_i$ ), de forma que:

$$R_i = \theta_i C_i \quad (b)$$



**Figura 3.5.** Relación entre la composición de la fase vapor del espacio de cabeza ( $C_v$ ) y la concentración inicial de la fase acuosa ( $C_o$ ), en el equilibrio a  $70^\circ\text{C}$  para los compuestos hexanal (-●-), acetato de isoamilo (-■-) y hexanol (-▲-).

donde  $C_i$  representa la concentración y  $R_i$  el número de desintegraciones por unidad de tiempo y volumen correspondientes a dicha concentración.

Por otra parte, si un compuesto volátil radiactivo "i" es analizado por radio-CGL, la señal obtenida por unidad de volumen de muestra ( $S_i$ ) será directamente proporcional a  $R_i$ , de forma que:

$$S_i = \alpha_i R_i \quad (c)$$

Así, en virtud de las ecuaciones c y b, para un componente volátil cualquiera “i”, así como para un patrón interno “p” introducido en el sistema se tendrá que:

$$C_{vi} = \frac{S_i}{\alpha_i \theta_i} \qquad C_{vp} = \frac{S_p}{\alpha_p \theta_p}$$

donde  $\alpha_i$  y  $\alpha_p$  serán idénticos si se analiza el mismo isótopo. Al utilizarse en este caso únicamente el isótopo  $^{14}\text{C}$  se designará a los factores de respuesta simplemente con la letra  $\alpha$ .

Por otra parte, si el análisis se realiza a partir del espacio de cabeza de un vial sellado en equilibrio con una fase acuosa, se tendrá que sustituyendo (a) en las ecuaciones anteriores:

$$C_{op} = \frac{S_p}{H_p \alpha \theta_p} \qquad C_{oi} = \frac{S_i}{H_i \alpha \theta_i}$$

Dividiendo ambas expresiones resulta que:

$$\frac{C_{oi}}{C_{op}} = \frac{S_i H_p \theta_p}{S_p H_i \theta_i}$$

**Tabla 3.2.** Constantes  $H_i$  (relación entre concentraciones en fase vapor y acuosa) calculadas para diferentes compuestos volátiles.

Compuesto	$H_i$
Hexanal	0,0133
Hexanol	0,0017
Acetato de isoamilo	0,0089

Sustituyendo (b) en la anterior expresión se tendrá que:

$$\frac{R_{oi}}{R_{op}} = \frac{S_i H_p}{S_p H_i}$$

con lo que es posible calcular la incorporación en “i” existente inicialmente en disolución acuosa por análisis del espacio de cabeza si se conocen  $H_p$ ,  $H_i$ , (Tabla 3.2),  $S_i$ ,  $S_p$ , (datos de integración del radiocromatógrafo) y  $R_{op}$  (radiactividad introducida en el sistema en forma del patrón interno).

### 3.1.2.1. Experimentos de control.

Como primer acercamiento al estudio de la producción de volátiles a partir de [U-<sup>14</sup>C]-18:2 por parte de la pulpa de aceituna se realizó un estudio de validación del procedimiento descrito. Esto se llevó a cabo investigando la incorporación de radiactividad en compuestos volátiles en una preparación estándar (Apartado 2.7.2.), una preparación estándar conteniendo 20 mM de NADPH y un blanco preparado con extracto enzimático hervido, con objeto de comprobar la reproducibilidad del método mediante el estudio de las desviaciones estándar de los distintos replicados, así como la posible influencia del cofactor

**Tabla 3.3.** Incubación de polvo acetónico de aceitunas con [U-<sup>14</sup>C]-18:2. El medio de incubación contenía 6 mg de polvo acetónico en 0,3 ml de tampón MES, pH 6,0, 0.5% Tritón X-100, 7 mM 2-mercaptoetanol. Las incubaciones se llevaron a cabo en triplicado a temperatura ambiente durante 45 minutos.

Tratamiento	Incorporación (pkat/mg prot)	
	Hexanal	Hexanol
Control	0,92 ± 0,11	nd
+20 mM NADPH	0,93 ± 0,13	nd
Blanco	nd	nd

nd: no detectado

NADPH en la síntesis de dichos compuestos.

Como se muestra en la Tabla 3.3, el hexanal fue el único producto volátil formado a partir del precursor radiactivo, no apareciendo señal del mismo en la incubación realizada con extracto inactivado. Las desviaciones estándar observadas entre los replicados, en torno al 10%, indican que el método establecido es aceptable para ser empleado en la cuantificación de volátiles en experimentos de marcaje. Por otra parte, la ausencia de incorporación en compuestos volátiles de nueve átomos de carbono confirma el resultado obtenido en el estudio de especificidad realizado con  $[1-^{14}\text{C}]-18:2$  en el que no se apreció la formación del oxoácido correspondiente a la lisis de 9-hidroperóxidos (Tabla 3.1).

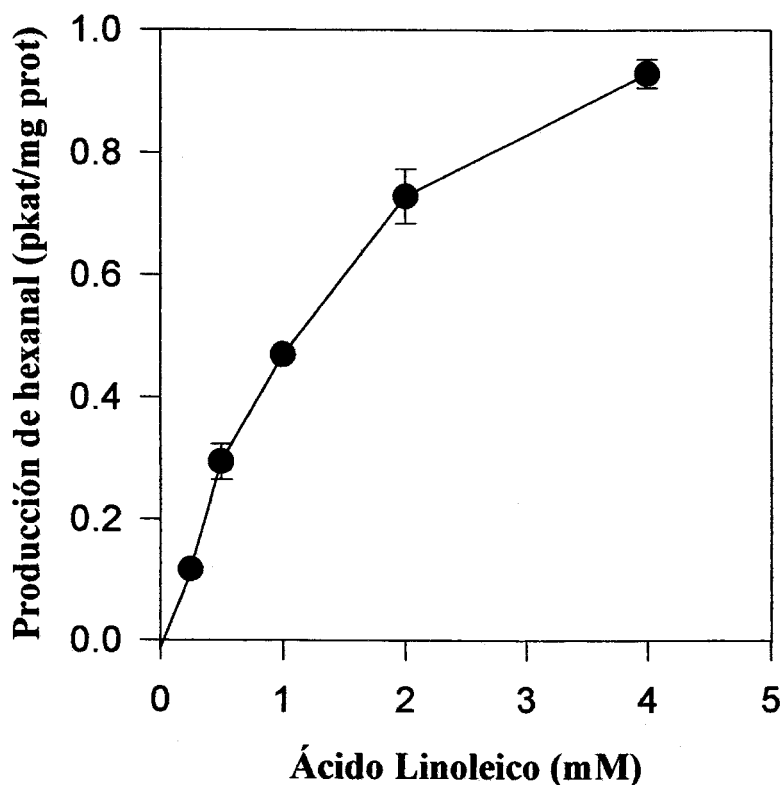
### ***3.1.2.2. Curva de sustrato.***

El estudio de la influencia de la concentración inicial de precursor sobre la producción de volátiles puede suministrar información acerca de la concentración de linoleato que se debe emplear para obtener la máxima incorporación de radiactividad en estos compuestos, así como proporcionar un primer acercamiento a los valores de los parámetros cinéticos de las enzimas que participan en la ruta estudiada.

Se realizaron incubaciones a diferentes concentraciones de ácido linoleico, en un intervalo que abarcó desde 0,25 mM hasta 4 mM. Las preparaciones se realizaron como se indica en Materiales y Métodos (Apartado 2.7.2.), añadiendo a los distintos replicados el mismo volumen de disolución de linoleato potásico convenientemente diluida para alcanzar la concentración final deseada en cada uno. De nuevo el único compuesto volátil en el que se registró incorporación de radiactividad fue el hexanal. Como puede verse en la Figura 3.6 la formación de hexanal a partir de 18:2 sigue una típica cinética de saturación, de manera que la velocidad de formación del volátil se incrementó de forma aproximadamente lineal con la concentración de ácido graso hasta 1 mM, decayendo dichos incrementos a mayores concentraciones del sustrato, sin alcanzar la saturación a la concentración máxima empleada, 4 mM. De estos datos puede derivarse una  $K_m$  aparente de 8,4 mM, lo que sugiere que el sistema de producción de volátiles requiere altas concentraciones de sustrato para su saturación.

### ***3.1.2.3. Curva de temperatura.***

La inducción de la ruta de la LOX a baja temperatura observada en los experimentos de

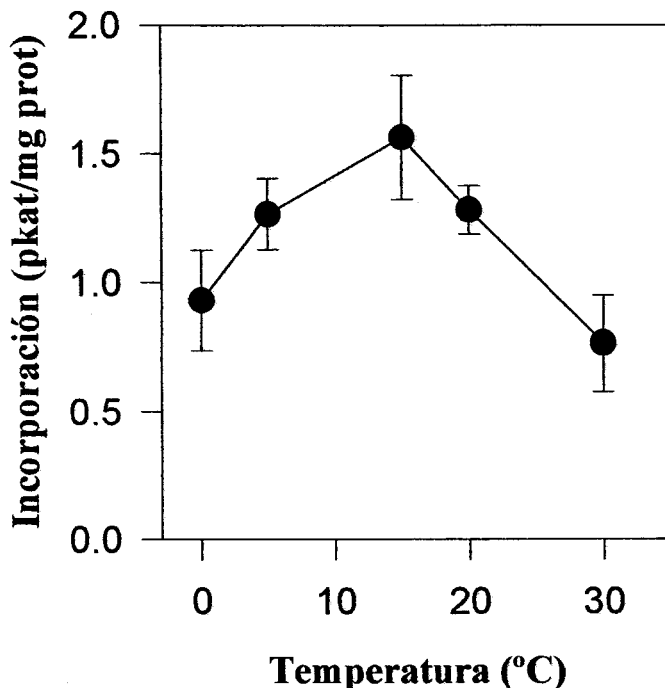


**Figura 3.6.** Efecto de la concentración de ácido linoleico sobre la formación de hexanal. Se empleó polvo acetónico preparado a partir de aceitunas recogidas 20 semanas después de la floración como fuente de enzima. Cada punto corresponde a la media de dos determinaciones.

marcaje con  $[1-^{14}\text{C}]-18:2$  mediante el estudio de la incorporación de dicho precursor en hidroperóxidos y oxoácidos (Apartado 3.1.1.4.), debería traducirse a su vez en un aumento paralelo de la producción de aldehidos volátiles. Para confirmar este punto se estudió la influencia de la temperatura de incubación sobre la incorporación de  $[U-^{14}\text{C}]-18:2$  en hexanal por parte de resuspensiones de polvo acetónico de pulpa de aceitunas.

Los resultados se muestran en la Figura 3.7, donde puede apreciarse que al igual que en la anterior curva de temperaturas (Figura 3.4) la máxima incorporación de radiactividad tuvo lugar a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , registrándose un claro descenso de la misma a





**Figura 3.7.** Efecto de la temperatura sobre la formación de hexanal a partir de  $[U-^{14}C]-18:2$  en hexanal. Se empleó polvo acetónico de aceitunas (20 SDF) como fuente de enzima. Cada punto representa la media de dos determinaciones independientes.

temperaturas superiores a 20°C. De esta forma, Los resultados obtenidos con  $[1-^{14}C]-18:2$  fueron reproducidos, confirmándose la influencia que ejerce la temperatura en la biosíntesis de los volátiles que forman parte del aroma del aceite de oliva virgen.

Una vez caracterizado el sistema global de producción de aldehidos volátiles presente en la pulpa de aceituna, se procedió a la caracterización individual de cada una de las enzimas que componen dicho sistema, con objeto de confirmar mediante medidas de actividad *in vitro* los resultados obtenidos en los experimentos de marcaje. Así mismo, se pretendió establecer una base bioquímica más amplia para la justificación del perfil de volátiles del aceite de oliva, abarcando no sólo la biosíntesis de aldehidos sino además la de alcoholes y ésteres.

### 3.2. LIPOXIGENASA DE PULPA DE ACEITUNA.

La lipoxigenasa (LOX) cataliza la introducción de una molécula de O<sub>2</sub> en la secuencia 1,4-pentadieno de ácidos grasos poliinsaturados, proceso que constituye el primer paso dentro de la cascada de reacciones que da lugar a los compuestos volátiles constituyentes del olor verde (Hatanaka *et al.*, 1993). En el presente trabajo se planeó caracterizar la LOX presente en la pulpa de aceituna, con objeto de dilucidar su contribución a la biosíntesis del flavor del aceite de oliva virgen en función de sus propiedades y nivel de actividad.

#### 3.2.1. Actividad lipoxigenasa en extractos crudos.

Diversos protocolos de preparación de esta enzima de acuerdo a trabajos precedentes fueron probados sin éxito, debido principalmente a la turbidez de los extractos causada por el alto contenido en lípidos, polifenoles y pigmentos de los mencionados frutos. Finalmente, la enzima fue detectada en las fracciones membranosas obtenidas por centrifugación a 40000×g (40 K) y 150000×g (150 K) a través del protocolo de preparación que se describe en Materiales y Métodos (Apartado 2.6.1.). Las actividades medidas a lo largo de la temporada usando ácido linoleico como substrato variaron entre 0,5 y 2,5 nkat/mg prot en la fracción de 40 K y entre 1 y 3 nkat/mg prot en la de 150 K, lo que significó una actividad total de entre 2,5 y 10 nkat/g PF. Estas actividades fueron superiores o del mismo orden que a las reportadas para otros frutos como el tomate (Bowsher *et al.*, 1992), manzana (Kim y Grosh, 1979) o kiwi (Boyes *et al.*, 1992), a pesar de que, como ya se ha mencionado, la aceituna es una fuente rica en potenciales inhibidores de la enzima (Cohen *et al.*, 1984, Dohi *et al.*, 1991, Richard-Forget *et al.*, 1995). Por otra parte, la aceituna se diferencia de otras fuentes de lipoxigenasa por poseer una alta actividad asociada a fracciones subcelulares particuladas, no detectándose cantidades significativas de la misma en el sobrenadante final del protocolo de centrifugación ni en sus cortes de precipitación con sulfato amónico. Esta situación se asemeja más a la descrita para hojas verdes (Hatanaka *et al.*, 1978), que a la de otros frutos como el tomate o el pepino, donde la mayor parte de la actividad se ha encontrado en la fase soluble (Wardale y Lambert, 1980;

Bowsher *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1997).

### 3.2.2. Distribución subcelular de la lipoxigenasa.

Uno de los puntos cruciales a la hora de realizar un acercamiento al rol fisiológico y la regulación de la LOX es el estudio de su compartimentación dentro de la célula vegetal. Las LOXs se han mostrado como enzimas muy ubicuas en cuanto a su distribución, habiendo sido reportada su presencia en el citoplasma, vacuolas, lisosomas y mitocondrias de tejidos no fotosintéticos (Wardale y Galliard, 1977; Wardale y Lambert, 1980) así como en los cloroplastos de tejidos fotosintéticos (Hatanaka *et al.*, 1978; Bowsher *et al.*, 1992; Blée y Joyard, 1996).

Por otra parte, dentro de la clasificación de las LOXs vegetales propuesta por Shibata *et al.* (1994) en dos familias (*Lox 1* y *Lox 2*) con diferentes rasgos estructurales, aparece un claro sesgo respecto a la localización subcelular de las formas pertenecientes a cada una. Así, las enzimas asociadas a la familia *Lox 2* se caracterizan por poseer un péptido de tránsito hacia el cloroplasto. El estudio de estas LOXs cloroplásticas ha tomado cierto auge en los últimos años, debido a que dichas enzimas son inducibles mediante estímulos externos (Peng *et al.*, 1994; Heitz *et al.*, 1997), siendo las responsables de la acumulación de ácido jasmónico que se registra tras la rotura de los tejidos (Bell *et al.*, 1995), lo cual las implica directamente en la cadena de transducción de señales que activa la respuesta al daño físico y ataque de insectos fitófagos en plantas (Seo *et al.*, 1997). Por otro lado, investigaciones más detalladas concernientes a la distribución de estas actividades dentro de los cloroplastos apuntan a la existencia de tres formas, una unida débilmente a la cubierta membranosa, otra unida a los tilacoides y finalmente una forma soluble presente en el estroma (Blée y Joyard, 1996; Blée, 1998).

El primer acercamiento a la determinación de la localización subcelular de la LOX en aceituna se llevó a cabo fraccionando un extracto crudo de pulpa de aceituna siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 2.6.1., a través del cual se obtuvieron sucesivos precipitados por centrifugación a 3000×g (3 K), 15000×g (15 K), 40000×g (40 K) y 150000×g (150 K) en los que fue determinada esta actividad. La distribución de la actividad entre los distintos precipitados se muestra en la Tabla 3.4. Así, aunque la enzima se detectó

**Tabla 3.4.** Distribución de la LOX entre las diferentes fracciones membranosas aisladas a partir de la pulpa de aceituna. Se partió de 10 g de pulpa de aceitunas recolectadas 26 semanas después de la floración. Las actividades se midieron por triplicado, usando ácido linoleico como sustrato.

Fracción	LOX		Proteína (mg)	Clorofila	
	(nkat)	(%)		(mg)	(%)
3K	5,9 ± 0,4	24	21,2	0,12	55
15K	6,4 ± 0,1	26	20,0	0,07	32
40 K	4,0 ± 0,4	16	9,6	0,02	9
150 K	8,1 ± 0,2	33	16,2	0,01	4

en todas las fracciones ensayadas, fueron especialmente activas las de mayor densidad y contenido en clorofila, resultado que apunta, aun a falta de un estudio de marcadores enzimáticos, a la existencia de formas cloroplásticas de LOX en la pulpa de aceituna. Por otro lado, la fracción de microsomas (150 K) también mostró un alto nivel de actividad LOX, lo que podría deberse a la presencia de formas de esta enzima de localización diferente. Si estos resultados se confirman, sería de gran interés investigar la posible inducción de las LOXs cloroplásticas de aceituna a través de estímulos externos, con vistas a establecer su papel en los mecanismos de respuesta al estrés de este fruto.

### 3.2.3. Distribución histológica de la lipoxigenasa.

La pulpa de aceituna posee dos tipos de tejido bien diferenciados, el epicarpo, rico en cloroplastos, el cual permanece verde durante la mayor parte del desarrollo de los frutos, y el mesocarpo, de consistencia carnosa, donde tiene lugar la acumulación de triacilglicérols. Las actividades bioquímicas relacionadas con la biosíntesis de lípidos han sido caracterizadas en ambos tejidos, estableciéndose claras diferencias en cuanto a su

**Tabla 3.5.** Distribución de la LOX entre las fracciones membranosas del epicarpo y mesocarpo de la pulpa de aceituna. Se partió de 5 g de cada tejido, empleándose frutos recogidos 28 semanas después de la floración. Las actividades se midieron por triplicado, usando ácido linoleico como sustrato.

Fracción	Epicarpo				Mesocarpo			
	LOX		Clorofila		LOX		Clorofila	
	(nkat)	(%)	(mg)	(%)	(nkat)	(%)	(mg)	(%)
3K	1,61±0,01	12,4	0,06	24	1,14±0,04	8,9	0,02	8
15K	2,4±0,2	18,7	0,06	24	2,1±0,3	16,4	0,02	8
40K	0,91±0,05	7,0	0,05	20	0,5±0,2	3,9	0,01	4
150K	1,8±0,3	14,0	0,02	8	2,4±0,4	18,7	0,01	4
<b>Total</b>	<b>6,7</b>	<b>52,1</b>	<b>0,19</b>	<b>76</b>	<b>6,1</b>	<b>47,9</b>	<b>0,06</b>	<b>24</b>

capacidad de fotosíntesis de ácidos grasos (Sánchez, 1994).

Los resultados de localización subcelular inducen a pensar que han de existir diferencias en el nivel de LOX presente en los dos tejidos que forman la pulpa de estos frutos. Para investigar este punto se realizaron preparaciones de pericarpo y mesocarpo de aceituna, fraccionándose los extractos crudos resultantes por centrifugación diferencial tal y como se describe en el Apartado 2.6.2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.5, donde puede apreciarse que no existe diferencia notable entre los niveles de actividad medidos para ambos tejidos, representando cada uno aproximadamente la mitad de la actividad total de la pulpa de los frutos. Por otra parte, la actividad se repartió de forma similar dentro de las diferentes fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, observándose para ambos tejidos una distribución análoga a la de la pulpa completa (Tabla 3.4). Así mismo, la aparición de fracciones activas de alta densidad y bajo contenido en clorofila en las preparaciones de mesocarpo sugieren que esta enzima se halla unida a plastos y proplastos no verdes además de a cloroplastos fotosintéticamente activos. Una situación semejante a esta se describió para el caso de la inflorescencia de coliflor (Wardale

y Galliard, 1977), para la cual se ha establecido recientemente que las fracciones de alta densidad con actividad LOX estaban constituidas por proplastos, que a pesar de no haberse desarrollado aun como orgánulos maduros poseían actividad LOX en sus cubiertas membranosas.

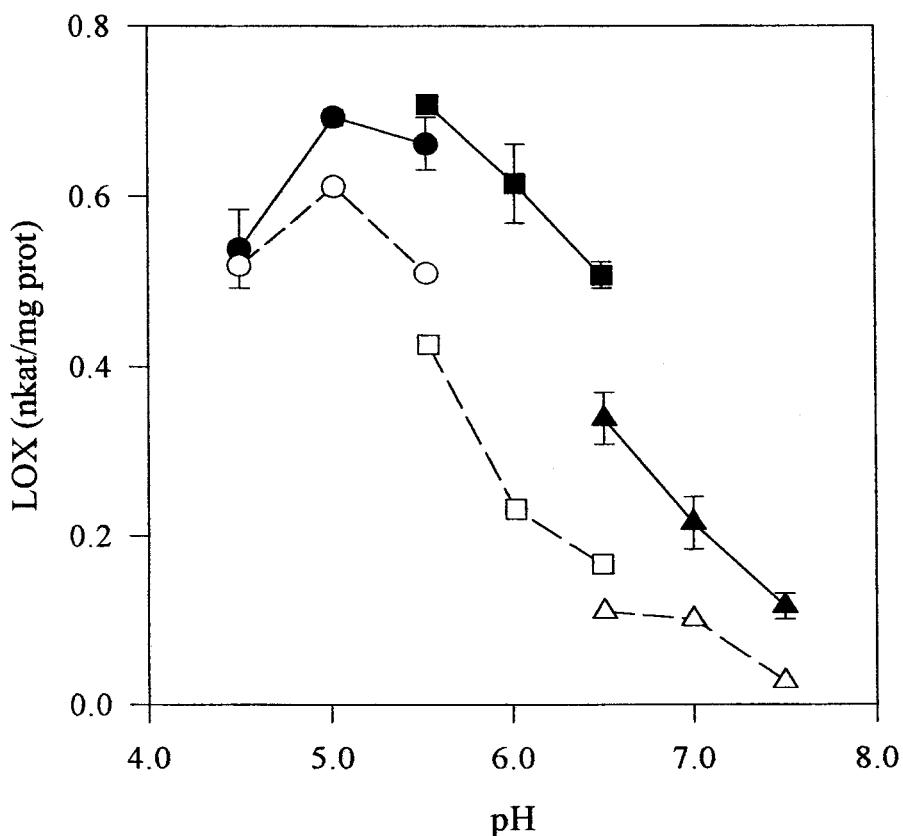
Los resultados de distribución histológica de la LOX de aceituna difieren, así mismo, de los obtenidos en frutos de pepino, donde la actividad LOX se halló localizada principalmente en el epicarpo verde (Wardale y Lambert, 1980; Jang *et al.*, 1995).

#### 3.2.4. Curvas de pH.

Las LOXs son enzimas que presentan un amplio espectro de valores de pH óptimo según su fuente de origen. Así, se han descrito LOXs con máximos de actividad a pHs muy alcalinos, como es el caso de la LOX-1 de soja (Axelrod, 1974), aunque los valores más comunes entre los publicados se encuentran entre 6,0 y 7,0. Ensayos preliminares mostraron que la LOX de aceituna no exhibía actividades detectables a valores de pH mayores de 8,0, por lo que la influencia de dicho parámetro se estudió dentro de un intervalo de valores de pH desde 4,5 hasta 7,5, empleándose los tampones acetato sódico, MES y fosfato potásico. Dicho estudio se realizó para la actividad presente en los precipitados de 3 K, conteniendo LOX supuestamente cloroplástica, y 150 K, conteniendo la forma microsómica, con objeto de estudiar posibles rasgos diferenciales entre ambas.

Como puede observarse en la Figura 3.8, las curvas obtenidas para ambas preparaciones presentaron sólo pequeñas diferencias. Así, la curva correspondiente al precipitado de 3 K resultó ligeramente más ancha, con un intervalo de pH óptimo más amplio que el exhibido por la LOX presente en el precipitado de 150 K. Los valores de pH óptimo determinados fueron 5,0 para el precipitado de 150 K y entre 5,0 y 5,5 para el de 3 K, ambos algo más bajos que el pH óptimo registrado en los experimentos de marcaje con  $[1-^{14}\text{C}]-18:2$  (Figura 3.2), y muy similares a los descritos para LOXs de otros frutos como el tomate (Ealing 1994), el pimiento (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1992) o el pepino (Jang *et al.*, 1995).

Por otra parte, estos valores de pH son semejantes al del agua de vegetación resultante de los frutos de aceituna durante el proceso de elaboración del aceite, que se sitúa



**Figura 3.8.** Curvas de pH de LOXs procedentes de diferentes fracciones particuladas de fruto de aceituna, precipitado de 3K (—) y precipitado de 150 K (----). Estas enzimas fueron ensayadas empleando acetato sódico (-●-, -○-), MES (-■-, -□-) y fosfato potásico (-▲-, -△-) como tampones de ensayo para abarcar el intervalo de valores de pH indicado.

entre 4,0 y 5,0 (Alba, 1997), por lo que la LOX de aceituna actúa en una situación de pH muy favorable durante las etapas de molienda y batido de la pasta de aceituna.

### 3.2.5. Especificidad de sustrato de la lipoxigenasa.

Los sustratos fisiológicos de las LOXs vegetales son los ácidos grasos linoleico o linolénico, entendiéndose por especificidad de sustrato a la capacidad relativa de una determinada LOX para catalizar la oxidación de cada uno de ellos. Éste es un parámetro

**Tabla 3.6.** Especificidad de sustrato de las LOXs unidas a membranas de alta (fracción 40 K) y baja densidad (fracción 150 K). Las preparaciones de membrana se realizaron con aceitunas recolectadas 27 semanas después de la floración. Los resultados son la media de tres determinaciones.

Substrato	Fracción 40K		Fracción 150 K	
	LOX (nkat/mg prot)	(%)	LOX (nkat/mg prot)	(%)
Ácido linoleico	0,53 ± 0,04	54 ± 4	0,8 ± 0,04	53 ± 3
Ácido linolénico	0,98 ± 0,02	100 ± 2	1,5 ± 0,05	100 ± 3

de gran importancia en la biosíntesis de volátiles ya que en función del ácido graso utilizado por esta enzima se producirán aldehidos de mayor o menor grado de insaturación. De esta forma, a partir del ácido linoleico se producirán vía HPL hexanal ó 3(Z)-nonenal, y a partir del ácido linolénico 3(Z)-hexenal ó 3(Z),6(Z)- nonadienal (Figura 1.2.).

Como se muestra en la Tabla 3.6 las LOXs procedentes de las dos fracciones ensayadas exhibieron especificidades semejantes, siendo ambas unas dos veces más activas con el ácido linolénico que con el linoleico. Este perfil de especificidad es coherente con los resultados publicados anteriormente, en cuanto a que, por regla general, las LOXs procedentes de órganos fotosintéticos son más activas con el ácido linolénico, mientras que las procedentes de órganos no fotosintéticos lo son con el ácido linoleico (Grossman *et al.*, 1971; Hatanaka *et al.*, 1979; Kim y Grosh, 1979; Jang *et al.*, 1995; Yoon y Klein, 1979; Sanz *et al.*, 1992; Hilbers *et al.*, 1995). Así mismo, la especificidad de sustrato resultante está en buena concordancia con la composición de volátiles del aceite de oliva, donde predominan las especies insaturadas de aldehidos y alcoholes C6, de las cuales es precursor el ácido linolénico (Morales *et al.*, 1995).

Por otra parte, los resultados aquí obtenidos, junto con los del apartado anterior concernientes al efecto del pH del medio, muestran que las actividades LOX presentes en los precipitados de alta y baja densidad aislados de pulpa de aceituna presentan características muy similares, apuntando así a que se trate de la misma enzima. Esto



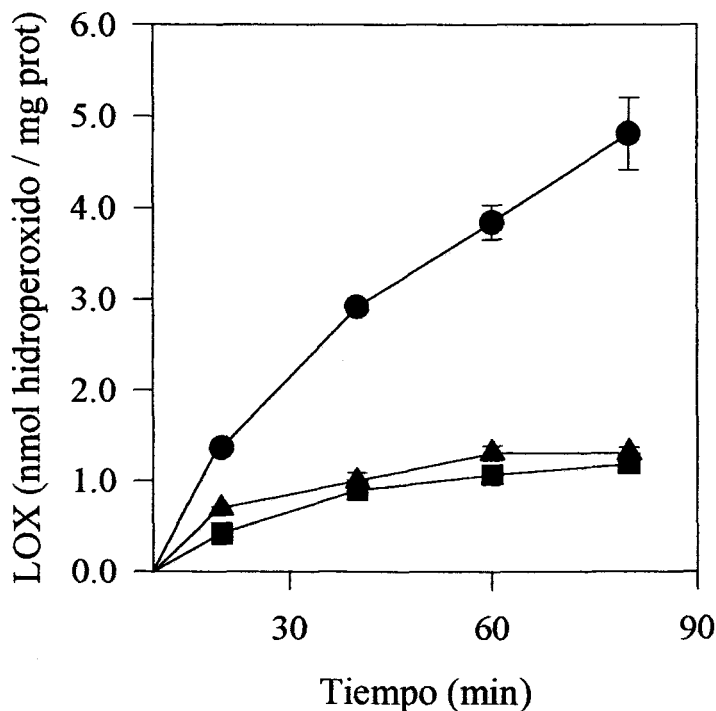
concuerta con los resultados reportados en la literatura, donde se mencionan formas de LOX unidas débilmente a las membranas de cobertura de cloroplastos y proplastos, que podrían desprenderse de los mismos durante la preparación de los extractos pasando a formar parte de fracciones menos densas (Blée, 1998).

### 3.2.6. Oxidación de ácidos grasos esterificados.

A pesar de estar sólidamente establecido que los sustratos específicos de las LOXs son los ácidos grasos poliinsaturados libres, en los últimos años ha tomado importancia creciente el estudio de la oxidación catalizada por esta enzima de ácidos grasos poliinsaturados esterificados a glicerolípidos (Kondo *et al.*, 1993), debido principalmente a las potenciales aplicaciones industriales de esta reacción (Piazza y Nuñez, 1995; Piazza *et al.* 1996), así como a su posible rol fisiológico en la iniciación de la  $\beta$ -oxidación en semillas oleaginosas en germinación (Kindl, 1997).

Desde el punto de vista de la biosíntesis de volátiles es interesante conocer la capacidad de la LOX de aceituna para la oxidación ácidos grasos poliinsaturados esterificados a glicerolípidos, ya que las especies oxidadas resultantes de esta reacción podrían representar una fuente alternativa de hidroperóxidos de ácidos grasos, una vez hidrolizadas por acción de una acil-hidrolasa. En particular, se han descrito fosfolipasas muy específicas que hidrolizan a los ácidos grasos con funciones oxigenadas de las membranas biológicas (Bañor *et al.*, 1991, 1993). Así, la acción conjunta de la LOX sobre fosfolípidos de membrana, junto con la de dichas fosfolipasas podría proveer a la HPL de los hidroperóxidos necesarios para la síntesis de aldehídos volátiles por una vía alternativa a la expuesta en la Figura 1.2. En el presente trabajo se tomó como sustrato modelo de los lípidos de membrana a la dilinoleoil-fosfatidilcolina (DLPC). La actividad de la LOX de aceituna con dicho sustrato se ensayó mediante el método de Jiang *et al.* (1991) en las condiciones establecidas en el Apartado 2.8.1.2 para ácidos grasos libres, empleándose una concentración de fosfolípido de 0,25 mM, la cual proveyó de una concentración final de fragmentos acílicos idéntica a la del ensayo estándar.

Como primera aproximación se estudió la peroxidación con respecto al tiempo del mencionado sustrato por parte de fracciones de microsomas procedentes de aceitunas



**Figura 3.9.** Oxidación de dilinoleoil-fosfatidilcolina por lipoxigenasa de microsomas de aceitunas recolectadas en diferentes estadios de maduración. (-●-) 14, (-▲-) 25 y (-■-) 34 semanas después de la floración.

recolectadas en distintos períodos de maduración. Como se observa en la Figura 3.9, la LOX de aceituna fue capaz de catalizar la oxidación de la DLPC en todos los casos, hallándose el mayor nivel de actividad en los microsomas de aceitunas inmaduras, recolectadas 14 semanas después de la floración.

Una vez comprobada la capacidad de la LOX de aceituna para oxidar ácidos grasos esterificados, se procedió al estudio de la especificidad relativa de esta enzima hacia la DLPC en comparación con los ácidos grasos no esterificados. Esto se llevó a cabo ensayando la LOX procedente de una preparación de microsomas de pulpa de aceituna (precipitado de 150 K) con DLPC, ácido linoleico y ácido linolénico mediante el método colorimétrico de Jiang *et al.* (1991), empleándose un tiempo de incubación de 5 minutos

**Tabla 3.7.** Especificidad de la LOX de frutos de aceituna. Comparación de las velocidades de oxidación de ácidos grasos libres y esterificados. Se emplearon microsomas preparados a partir de frutos recolectados 20 semanas después de la floración. Cada determinación se realizó por triplicado.

Substrato	LOX (nkat/mg prot)	%
Ácido linolénico	1,67 ± 0,06	100
Ácido linoleico	0,77 ± 0,04	46
DL-PC	0,01 ± 0,00	1

para los ácidos grasos libres y de 40 minutos para la DLPC. Los resultados muestran que la DLPC fue un sustrato muy pobre para la LOX de aceituna en comparación con los ácidos grasos linoleico y linolénico (Tabla 3.7), dando lugar a actividades del 1% de las medidas con este último ácido graso. Este resultado apunta a que los ácidos grasos poliinsaturados libres son los sustratos específicos de la LOX de aceituna, por lo que la contribución de la ruta alternativa propuesta en este apartado parece pequeña o nula, siendo necesaria por tanto la presencia de acil-hidrolasas que liberen los ácidos grasos de los lípidos de membrana como paso previo a la formación de compuestos volátiles a través de esta ruta.

### 3.2.7. Regioespecificidad de la lipoxigenasa.

Se entiende por regioespecificidad de la LOX a su capacidad para introducir la molécula de O<sub>2</sub> en la posición 13- ó 9- de los ácidos linoleico o linolénico, y producir por lo tanto un isómero posicional de hidroperóxido u otro. Este parámetro varía ampliamente en función del origen de la enzima, o incluso de la isoforma estudiada dentro de una misma fuente (Galliard y Chan, 1980; Axelrod, 1974), pudiendo verse además modificado por las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción de oxidación (Gardner, 1989). La regioespecificidad de la LOX, junto con la especificidad de sustrato de la siguiente enzima

de la ruta, la HPL, son dos parámetros fundamentales dentro del mecanismo de síntesis de volátiles en las diferentes especies de vegetales, ya que determinan la presencia en mayor o menor proporción de aldehídos de seis ó nueve átomos de carbono y compuestos derivados, los cuales confieren diferentes notas al aroma que generan.

Los estudios de regioespecificidad de la LOX de aceituna implicaron la incubación de ácido linoleico o linolénico con fracciones activas preparadas a partir de la pulpa de este fruto, seguida del análisis por HPLC de los hidroperóxidos resultantes. El procedimiento utilizado para la producción de hidroperóxidos fue análogo al descrito en el Apartado 2.5.2.1., empleándose en este caso como fuente de enzima el precipitado obtenido por centrifugación a 15000×g (15 K) de un extracto crudo preparado a partir de 10 g de pulpa de aceituna, y manteniéndose en los medios de incubación la misma composición que se empleó en el ensayo estándar de actividad LOX (Apartado 2.8.1.1).

Los hidroperóxidos obtenidos de las incubaciones fueron purificados por CCF preparativa (Apartado 2.4.2), metilados con diazometano (Apartado 2.5.1.1) y analizados por HPLC (Apartado 2.4.4.1). Los resultados de las composiciones de hidroperóxidos obtenidas se muestran en la Tabla 3.8., y en ellos puede observarse que los isómeros mayoritarios que en ambos casos se produjeron fueron el 13-ZE y el 13-ZEZ para los ácidos linoleico y linolénico respectivamente, con un contenido del 67 % y 73 % en cada caso. Las composiciones de hidroperóxidos expresadas en función de los isómeros de posición fueron de un 78 % de 13-hidroperóxidos frente a un 22 % de 9- en el caso del ácido linoleico y de un 88 % de 13- frente a un 12 % de 9- para el caso del ácido linolénico. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los experimentos de marcaje con [1-<sup>14</sup>C]-18:2 (Tabla 3.1), los cuales predijeron una regioespecificidad semejante para la LOX de aceituna, con una producción de más de un 70 % de isómeros 13-. Sin embargo, los resultados aquí presentados contradicen un estudio de regioespecificidad previo, en el cual se reporta una producción mayoritaria de isómeros 9- para la LOX de pulpa de aceituna (Olías *et al.*, 1993). La causa de esta discordancia puede encontrarse en la metodología empleada en dicho trabajo, en el cual se incubaron los correspondientes ácidos grasos con extractos crudos preparados a partir de pulpa de aceituna, por homogeneización de la misma con un tampón conteniendo 0,3 % de Tritón X-100. La inclusión de dicho tensioactivo en el medio extracción implica la solubilización y activación de la HPL, enzima que en aceituna, como

**Tabla 3.8.** Regioespecificidad de la LOX de aceituna.

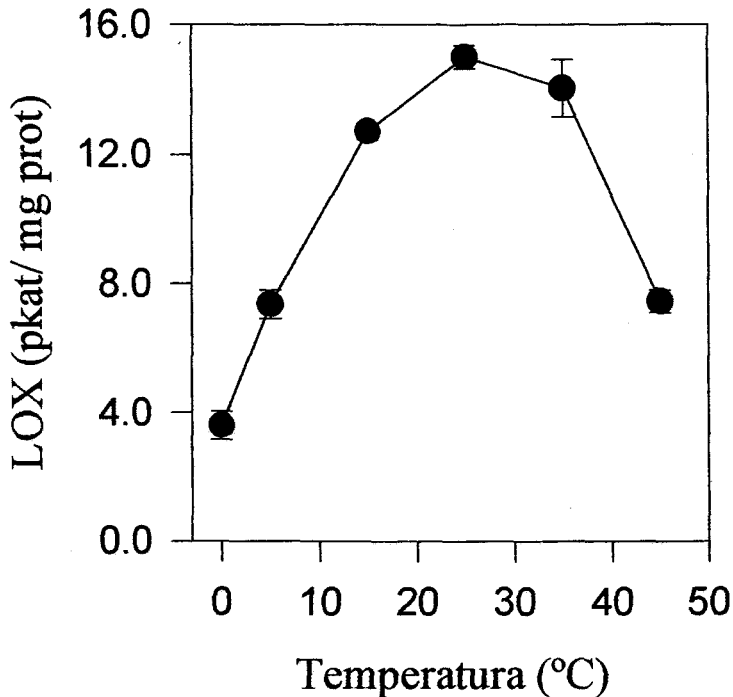
Precursor	Isómero de hidroperóxido formado (%)			
	13-ZE(Z)	13-EE(Z)	9-EZ(Z)	9-EE(Z)
Ácido linoleico	67	11	17	7
Ácido linolénico	73	15	12	nd

nd: no detectado

se ha demostrado en los experimentos de marcaje expuestos anteriormente, da lugar a la lisis específica de los 13-hidroperóxidos haciendo bajar el porcentaje de dichos isómeros (Tabla 3.1), lo que falsea el resultado de regioespecificidad cuando éste implica la sola determinación de hidroperóxidos sin atender a la fracción de oxoácidos. De esta manera, a la hora de establecer la regioespecificidad de una determinada LOX en una fracción cruda se ha de tener precaución con las posibles actividades metabolizadoras de hidroperóxidos, y en el caso de la presencia de éstas, llevar a cabo un análisis complementario de sus posibles productos. Finalmente, los resultados obtenidos sobre la regioespecificidad de la LOX de aceituna, se encuentran en buena concordancia con el perfil de volátiles del aceite de oliva, el cual está formado mayoritariamente por aldehídos de seis átomos de carbono y compuestos derivados, que se forman a partir de los isómeros de hidroperóxido mayoritarios sintetizados por la LOX de aceituna a partir de los ácidos linoleico y linolénico, los ácidos 13-ZE-hidroperoxilinoico y 13-ZEZ-hidroperoxilinoico.

### 3.2.8. Curva de temperatura de la lipoxigenasa.

Los inesperados resultados obtenidos en los Apartados 3.1.1.4 y 3.1.2.3, en los que la biosíntesis de aldehídos volátiles se vio estimulada a bajas temperaturas de incubación, habían de ser justificados y confirmados mediante medidas directas de actividad de las enzimas responsables de la formación de estos compuestos (LOX y HPL). Con este fin, la



**Figura 3.10.** Curva de temperaturas de la LOX procedente de microsomas de aceituna recogidas 34 semanas después de la floración. El tiempo de incubación en los ensayos fue de 30 minutos para reproducir las condiciones del batido de la pasta de aceitunas. Cada punto representa la media de tres determinaciones de actividad.

LOX procedente de membranas de pulpa de aceituna fue ensayada dentro de un intervalo de temperaturas que abarcó desde 0 hasta 45°C. Los ensayos se realizaron mediante el método de Jiang *et al.* (1991), empleándose un período de incubación de 30 minutos, con objeto de simular el tiempo de batido de la pasta de aceituna en el proceso de elaboración del aceite de oliva virgen. Así pues, la curva de temperaturas resultante mostró un intervalo óptimo de actividad entre 15 y 35°C, sufriendo un abrupto descenso a temperaturas inferiores o superiores a las mencionadas (Figura 3.10). De esta forma, la LOX de aceituna es capaz de suministrar eficazmente los precursores de los aldehidos volátiles C6 a la temperatura óptima observada en los experimentos de marcaje (15°C), aunque estos resultados no justifican el brusco descenso en la formación de oxoácidos y hexanal que tuvo

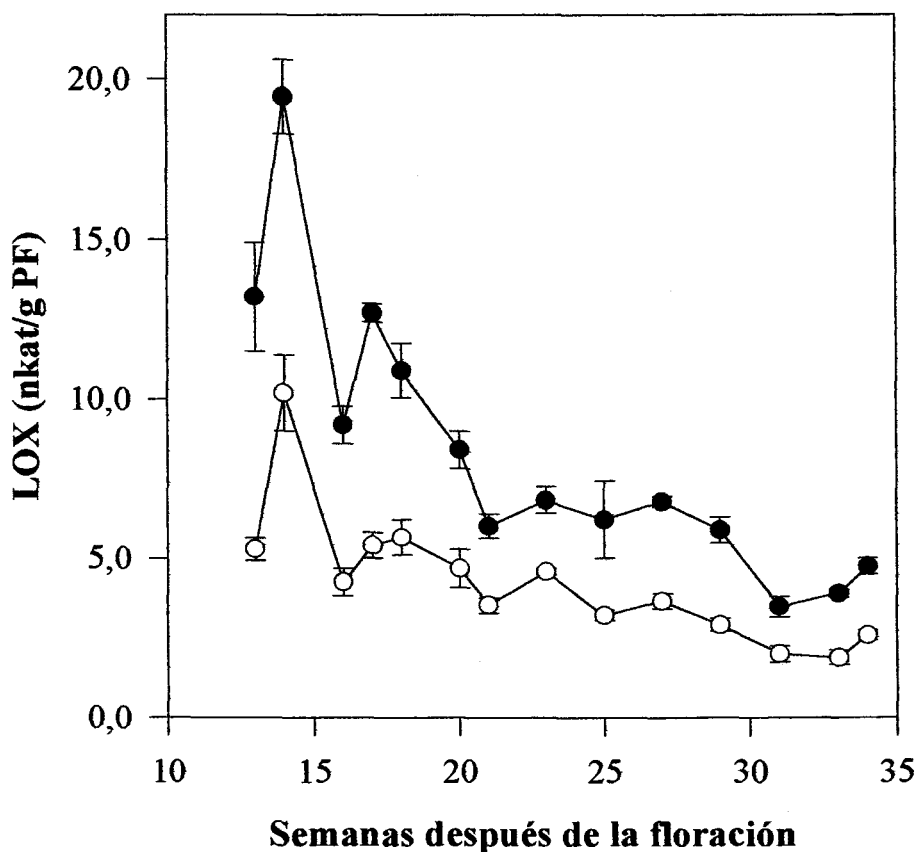
lugar a temperaturas mayores de 25°C en dichos experimentos. Por tanto, la respuesta de la LOX de aceituna a la temperatura no justifica por sí sola los resultados referidos, lo que apunta a que la siguiente enzima en la ruta, la HPL, juega un papel crucial en el aspecto del comportamiento de esta ruta respecto a la temperatura.

### 3.2.9. Cambios en la actividad lipoxigenasa durante el desarrollo de los frutos.

El perfil de actividad LOX durante los diferentes estadios de desarrollo de distintos órganos vegetales ha sido investigado en diversas especies con el objeto de realizar un acercamiento al rol fisiológico de la enzima (Hildebrand y Hymowitz, 1983; Vernoooy-Gerritsen *et al.*, 1983, Kindl, 1997). En este sentido se han registrado altas actividades LOX en tejidos inmaduros en desarrollo, estableciéndose una cierta correlación entre la actividad LOX y la velocidad de crecimiento del órgano estudiado (Ohta *et al.*, 1986; Matsui *et al.*, 1988). Así mismo, por analogía con la LOX animal, también se ha relacionado a esta enzima con los procesos degradativos propios de la senescencia, aunque no se hayan reportado pruebas directas de esta teoría (Siedow, 1991).

Por otra parte, estudios de la composición de volátiles en aceites preparados a partir de aceitunas con diferente grado de maduración mostraron un descenso general de la concentración de los mismos a medida que fueron utilizados frutos más maduros. Este descenso se hizo especialmente patente en los aldehídos C<sub>6</sub> mayoritarios, el hexanal, 3(Z)-hexenal y 2(E)-hexenal, cuyas concentraciones descendieron a más de la mitad durante el período de estudio (Aparicio y Morales, 1998; Olías *et al.*, 1980).

El desarrollo de la aceituna es un proceso que abarca entre siete y ocho meses desde la fecundación a la senescencia, siendo uno de los más largos dentro de las especies de frutos explotadas comercialmente. En el presente trabajo el estado de maduración se definió en función de las semanas después de la floración (SDF), tomándose como semana cero aquella en que la mitad de las flores hubieron eclosionado. Se ha observado que en la variedad Picual la acumulación de triacilglicérols comienza unas 12-13 SDF, coincidiendo con la lignificación del endocarpo, y se prolonga hasta las 25-30 SDF, fecha en la que comienza a producirse el cambio de color de los frutos (envero), el cual pasa a negro



**Figura 3.11.** Cambios en la actividad LOX a lo largo del desarrollo del fruto de aceituna. La actividad fue medida usando tanto ácido linoleico (-O-) como ácido linolénico (-●-). Las medidas de actividad se realizaron por triplicado.

intenso cuatro o cinco semanas más tarde (Sánchez, 1994).

Los cambios en la actividad LOX durante el desarrollo de los frutos se estudiaron a lo largo de un intervalo de tiempo que abarcó desde 11 hasta 34 SDF. Dichas medidas se realizaron usando tanto ácido linoleico como ácido linolénico como sustratos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.11, donde puede apreciarse que la actividad LOX de la aceituna fue máxima unas 13 SDF, lo que coincide con el endurecimiento del hueso y el inicio de la acumulación de aceite, disminuyendo a continuación con el desarrollo



y maduración de los frutos hasta hacerse mínima entre 33 y 34 SDF. Perfiles de actividad LOX semejantes han sido reportados para otros frutos como el tomate o el pimiento (Bowsher *et al.*, 1992; Matsui *et al.*, 1997; Riley *et al.*, 1996), los cuales muestran sus máximos niveles de actividad LOX en los primeros estadios de desarrollo, bajando a continuación a lo largo del período de maduración. Por otra parte, el perfil de actividad expuesto podría explicar el descenso en la concentración de volátiles que se describe para aceites elaborados con aceitunas de mayor grado de maduración Aparicio y Morales (1998), aun a falta de discutir el perfil de la siguiente enzima en la ruta, la HPL, lo que se llevará acabo en esta misma tesis (Apartado 3.3.8.).

### **3.3. HIDROPERÓXIDO LIASA.**

La HPL cataliza la lisis de los hidroperóxidos producidos por la LOX, para generar dos fragmentos carbonílicos, un aldehído volátil y un oxoácido no volátil, siendo de esta manera la primera enzima de la ruta de la LOX cuyos productos son componentes del aroma. Los aldehídos producidos por esta enzima se hallan presentes en los perfiles de volátiles de diversas especies de frutos, por lo que desde la década de los 70, cuando fue descrita por vez primera, ha sido caracterizada para gran número de ellos (Phillips y Galliard, 1978; Kim y Grosh, 1981; Riley *et al.*, 1996).

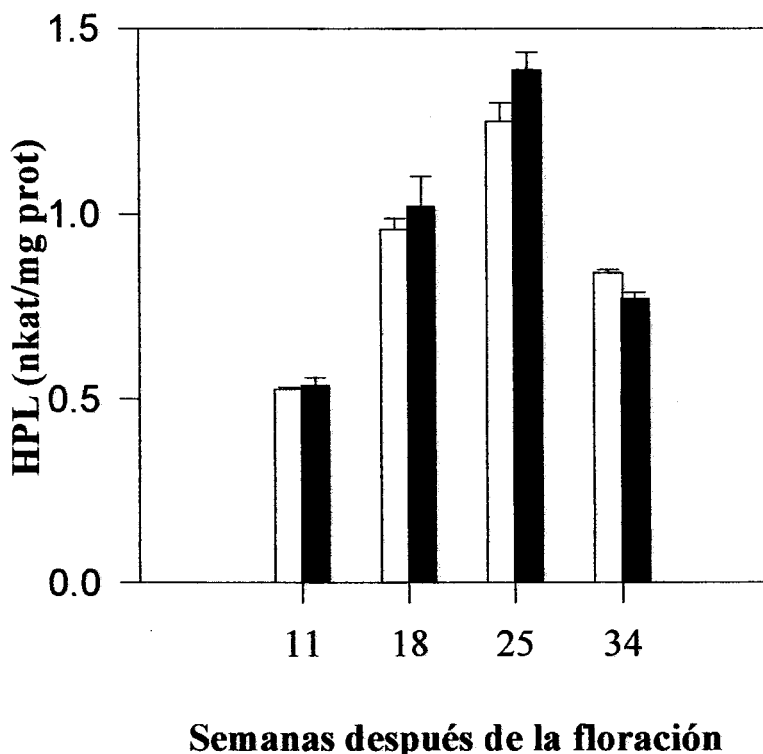
En el aroma del aceite de oliva virgen los aldehídos de seis átomos de carbono son los compuestos mayoritarios, dando cuenta de más del 80 % del total de los volátiles en todos los trabajos publicados recientemente (Morales *et al.*, 1995; Ranalli y De Mattia, 1997). Dichos aldehídos son productos típicos de la HPL (hexanal, 3(Z)-hexenal), o derivados directos de los mismos por isomerización (2(E)-hexenal), de forma que en función de los perfiles de volátiles publicados, la HPL parece ser una enzima crucial en el ámbito de la síntesis del aroma del aceite de oliva virgen. En el presente trabajo se caracterizó la actividad HPL de la pulpa de aceituna, como parte fundamental dentro del estudio bioquímico de los mecanismos de producción de volátiles en dicha especie.

### 3.3.1. Actividad hidropéroxido liasa en extractos crudos.

La HPL de aceituna, al igual que las descritas para otras especies vegetales, es una enzima unida a membrana, de forma que para su estudio se adoptó el protocolo de extracción y fraccionamiento ya referido para la LOX, con la sola diferencia de que las fracciones membranosas activas (40 K y 150 K), fueron solubilizadas añadiendo detergente (Tritón X-100) en el tampón de resuspensión (ver Apartado 2.6.1.). Sin esta adición la HPL no pudo ser detectada *in vitro*, como ya ha sido reportado para otras fuentes en trabajos anteriores (Wardale *et al.*, 1978; Vick, 1993).

Como se describe en el Apartado 2.8.2. existen fundamentalmente dos métodos de ensayo de actividad HPL: el análisis del hexanal o 3(Z)-hexenal liberado en el medio de reacción (Oliás *et al.*, 1990; Shibata *et al.*, 1995); o la medida de la pérdida de absorbancia a 234 nm producida por la destrucción del dieno conjugado del hidropéroxido empleado como sustrato, (Kim y Grosh, 1981; Schreier y Lorenz, 1982; Shibata *et al.*, 1995). El primer método es específico para la HPL, aunque conlleva un procedimiento experimental largo y costoso en términos de tiempo. El segundo procedimiento es sencillo y sensiblemente más rápido que el primero, aunque la actividad resultante puede verse falseada por la presencia de otras enzimas consumidoras de hidropéroxidos, como la hidropéroxido dehidratasa. A la hora de la elección de un método de ensayo apropiado, se llevaron a cabo medidas de actividad en fracciones solubilizadas de membranas de aceituna usando ambos procedimientos. Como se observa en la Figura 3.12, las actividades resultantes fueron, salvando el margen de error experimental, esencialmente las mismas para las cuatro preparaciones ensayadas por ambos métodos. Estos resultados, junto con la ausencia de cetoles en los experimentos de marcaje con ácido linoleico radiactivo indican que la actividad hidropéroxido dehidratasa no interfiere significativamente en el ensayo de la HPL, por lo que el método espectrofotométrico, más rápido y sencillo, fue el adoptado para la determinación de esta enzima.

Las actividades HPL oscilaron durante la temporada entre 0,5 y 4 nkat/mg prot en las fracciones de 40 y 150 K cuando fueron medidas con ácido 13-ZE-hidropéroxilinoleico. En términos de actividad total en el fruto las actividades medidas oscilaron entre 2 y 4 nkat/mg prot, equivalentes a entre 10 y 15 nkat/g PF, actividades sensiblemente mayores



**Figura 3.12.** Comparación de los métodos de ensayo de la HPL. Esta enzima fue ensayada midiendo la formación de hexanal (□), así como el descenso de la absorbancia a 234 nm del medio de reacción (■), usando como fuente de enzima las fracciones crudas de microsomas preparadas en diferentes estadios de maduración de los frutos. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

que las determinadas para la LOX (Apartado 3.2.1.), por lo que en principio y en las presentes condiciones de ensayo, sería esta última la enzima que limita la producción de aldehidos volátiles en la aceituna.

### 3.3.2. Localización subcelular de la hidroperóxido liasa.

En trabajos precedentes se ha demostrado que en el caso de hojas verdes esta enzima se encuentra localizada enteramente en los cloroplastos (Hatanaka *et al.*, 1982), y más concretamente en las membranas de envoltura de los mismos junto con otras actividades

metabolizadoras de hidroperóxidos (Bleé y Joyard, 1996). Por otra parte, experimentos realizados con cultivos celulares de hoja de tabaco apuntaron a la existencia de otra forma de HPL presente en orgánulos no fotosintéticos además de la forma cloroplástica (Sekiya *et al.*, 1984). En el caso de frutos la situación no es tan clara, y además de en las membranas cloroplásticas ha sido detectada su presencia en las membranas citoplásmicas, aparato de Golgi y retículo endoplasmático (Wardale *et al.*, 1978).

El procedimiento empleado para el estudio de la localización subcelular de la HPL fue totalmente análogo al utilizado para la LOX (Apartado 3.2.2.), siendo los distintos precipitados resultantes del fraccionamiento de los extractos crudos (3 K, 15 K, 40 K y 150 K) solubilizados en este caso con un tampón que contenía Tritón X-100. La distribución de actividad en cada fracción se muestra en la Tabla 3.9. La mayor parte de la actividad (74 %) fue detectada en las fracciones de mayor densidad, las de 3 K y 15 K, mientras que el resto se repartió entre las fracciones menos densas de 40 y 150 K. Como puede observarse, el nivel de actividad está en buena concordancia con el contenido de clorofila de fracciones ensayadas, lo que sugiere una localización cloroplástica de esta enzima. Estos resultados difieren de los publicados para el fruto de pepino, donde la actividad se encontró

**Tabla 3.9.** Distribución de la HPL entre las diferentes fracciones de membrana aisladas a partir de la pulpa de aceituna. Se emplearon 10 g de pulpa de aceitunas recogidas 26 semanas después de la floración. Las medidas de actividad se realizaron por triplicado, empleándose ácido 13-EZ-hidroperoxilinoico como sustrato.

Fracción	HPL		Proteína (mg)	Clorofila	
	(nkat)	(%)		(mg)	(%)
3K	48 ± 4	42	17,6	0,12	55
15K	37 ± 1	32	20,0	0,07	32
40 K	16 ± 0	14	10,8	0,02	9
150 K	14 ± 1	12	17,0	0,01	4

más ampliamente distribuida entre las distintas fracciones membranosas (Wardale *et al.*, 1978), asemejándose más a la distribución descrita para hojas verdes, donde la actividad se encontraba formando parte de las fracciones particuladas de mayor densidad (Hatanaka *et al.*, 1987).

### 3.3.3. Distribución histológica de la hidroperóxido liasa.

En trabajos previos realizados con frutos inmaduros de pimiento se efectuaron estudios de distribución histológica de la HPL mediante inmunomarcaje (Shibata *et al.*, 1995), que indicaron que la enzima se acumula en la epidermis de estos frutos, reforzando la teoría de un posible rol defensivo de la misma. Estos resultados no se reprodujeron en frutos de pepino (Wardale *et al.*, 1978), aunque en este caso se observó que la distribución de la HPL procedente del epicarpo verde fue notablemente distinta a la del resto de la pulpa, hallándose en dicho tejido una preeminencia de la actividad unida a cloroplastos.

La distribución histológica de la HPL de aceituna se investigó empleando el mismo procedimiento descrito para la LOX (Apartado 3.2.3.), de forma que una vez separados convenientemente el epicarpo del mesocarpo de la pulpa de aceituna se estudió la distribución de la enzima entre las distintas fracciones obtenidas por centrifugación diferencial de extractos crudos preparados a partir de ambos tejidos.

En la Tabla 3.10 se muestra que al igual que en el caso de la LOX la actividad recogida en las preparaciones realizadas a partir de ambos tejidos fue similar, dando cuenta cada uno de aproximadamente la mitad de la actividad total en la pulpa. Por otro lado, la distribución de la actividad a lo largo de las diferentes fracciones membranosas del pericarpo y mesocarpo fue semejante a la obtenida para la pulpa completa en los estudios de localización subcelular (Apartado 3.3.2.), no apreciándose correlación alguna entre el contenido de clorofila y la actividad HPL cuando se compararon las fracciones procedentes de cada tejido. Estos resultados parecen indicar que de forma similar a la LOX, la HPL se haya asociada tanto a cloroplastos como a plastos o proplastos no verdes, confirmando los estudios de Bleé y Joyard (1996) y Blée (1998) sobre la localización de la HPL en estos orgánulos. De este modo, los cloroplastos y plastos de pulpa de aceituna unen a su natural abundancia en ácidos grasos poliinsaturados (sobre todo ácido linolénico esterificado a

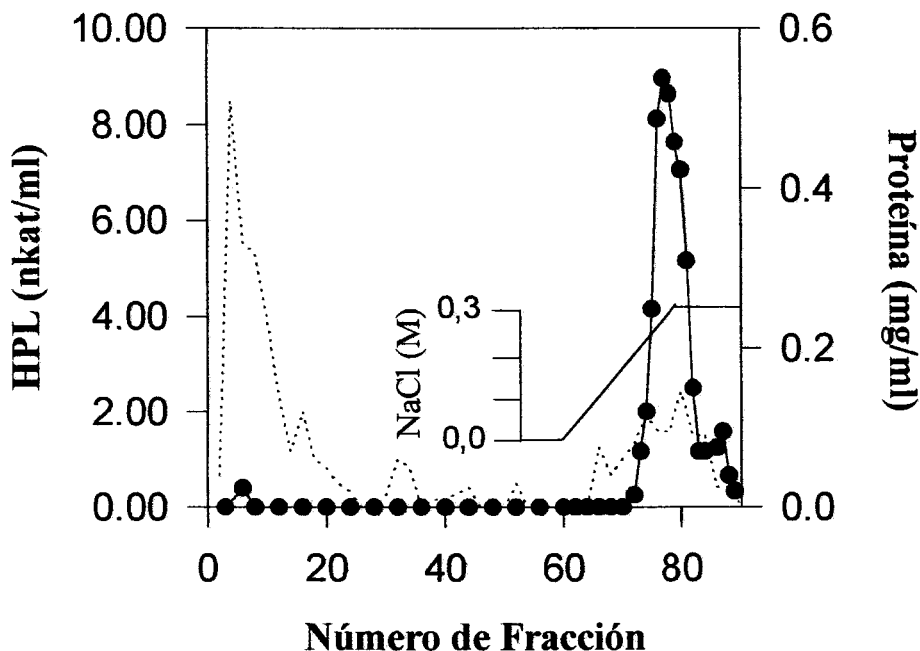
**Tabla 3.10.** Distribución de la HPL entre las fracciones de membrana del epicarpo y mesocarpo de la pulpa de aceituna. Se emplearon unos 5 g de cada tejido, preparados a partir de frutos recolectados 28 semanas después de la floración. Los ensayos se realizaron por triplicado, empleándose ácido 13-EZ-hidroperoxilinoico como sustrato.

Fracción	Epicarpo				Mesocarpo			
	HPL		Clorofila		HPL		Clorofila	
	(nkat)	(%)	(mg)	(%)	(nkat)	(%)	(mg)	(%)
3K	13±1	14,7	0,06	24	9,9±0,2	11,2	0,02	8
15K	16,6±0,8	18,7	0,06	24	13,6±0,1	15,3	0,02	8
40K	9,0±0,2	10,2	0,05	20	8,2±0,2	9,3	0,01	4
150K	8,8±0,1	9,9	0,02	8	9,5±0,4	10,7	0,01	4
<b>Total</b>	<b>47,7</b>	<b>53,5</b>	<b>0,19</b>	<b>76</b>	<b>41,2</b>	<b>46,5</b>	<b>0,06</b>	<b>24</b>

galactolípidos) altas actividades LOX y HPL en sus membranas, lo cual apunta a que la síntesis de aldehidos volátiles en los tejidos de aceituna tiene lugar mayoritariamente en dichos orgánulos, donde la proximidad física de sustratos y enzimas posibilita la rápida y eficaz metabolización de los primeros.

### 3.3.4. Purificación de la hidropéroxido liasa.

Como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 2.9.1), el primer paso que se llevó a cabo dentro del protocolo de purificación de esta enzima fue la separación por centrifugación de la fracción particulada del extracto crudo de aceituna. Dicha fracción, que contenía la mayor parte de la actividad HPL (ver Apartado 3.3.2.), fue seguidamente lavada por homogeneización en un tampón libre de tensioactivo y finalmente solubilizada en un

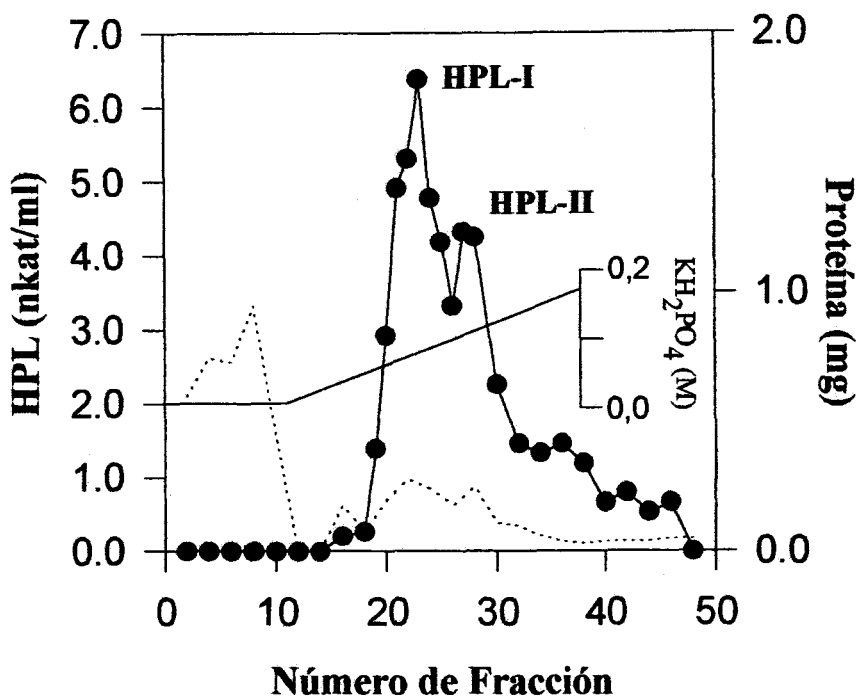


**Figura 3.13.** Perfil de elución de la HPL de pulpa de aceituna cromatografiada sobre DEAE-Sepharosa. En el gráfico se representa la actividad HPL (-●-), y el contenido de proteína de cada fracción (----). Las fracciones tomadas tuvieron un volumen de 11 ml.

tampón conteniendo 0.5 % de Tritón X-100. La suspensión resultante fue centrifugada, constituyendo el sobrenadante la fracción de membranas solubilizadas, que fue sometida a posterior purificación por cromatografía de intercambio iónico e hidroxilapatito. En el paso de aislamiento y solubilización de la fracción particulada se obtuvo un 60% de la actividad HPL inicial, resultando un enriquecimiento de 22 purificaciones, el mayor de los obtenidos en las distintas etapas de purificación empleadas (Tabla 3.11).

#### 3.3.4.1. Purificación por cromatografía de intercambio iónico.

La fracción de membranas solubilizadas descrita en el apartado anterior se cargó en la columna de intercambio iónico, la cual se eluyó a continuación con el mismo tampón empleado para resuspender las membranas (ver Apartado 2.9.1.2.). En estas condiciones



**Figura 3.14.** Perfil de elución de la fracción activa HPL recogida de la columna de intercambio iónico y cromatografiada en una columna de hidroxilapatito. En el gráfico se representa la actividad HPL (-●-), así como el contenido de proteína de cada fracción (----). Las fracciones 1-10 tuvieron un volumen de 10 ml, mientras que el volumen de las restantes fue de 2,5 ml.

la actividad HPL quedó retenida en la columna, siendo seguidamente recuperada mediante un aumento de la fuerza iónica del eluyente, proporcionado por un gradiente de concentración de NaCl desde cero a 0,3 M. Como se muestra en la figura 3.13 casi la totalidad de la actividad se eluyó a una concentración salina de 0,2 M, obteniéndose a continuación un pequeño pico no totalmente resuelto, conteniendo menos del 5 % de la actividad total. El perfil de elución obtenido es muy parecido al descrito por Shibata *et al.* (1995) para la HPL de frutos de pimiento, la cual se eluyó igualmente en un solo pico mayoritario, al que siguió de forma análoga otro minoritario. Posteriores estudios sobre la naturaleza de este último pico mostraron que no correspondía a ninguna forma de HPL.



**Tabla 3.11.** Purificación parcial de HPLs de pulpa de aceituna. La actividad HPL fue medida usando ácido 13-ZEZ-hidroperoxilinolénico (40  $\mu$ M) como sustrato.

Fracción	Proteína (mg)	Volumen (ml)	HPL (nkat/mg prot)	Factor	%
Extracto crudo	4100	500	1,0	1	100
Membranas solubilizadas	96,6	42	24,7	25	58,5
DEAE-Sepharosa	11,1	74	41,7	42	11,3
Hidroxilapatito, HPL-I	0,20	2,5	60,8	61	1,98
Hidroxilapatito, HPL-II	0,18	2,5	58,4	58	1,82

En el presente trabajo no se realizaron mayores averiguaciones acerca de esta actividad.

Las fracciones que componían el pico mayoritario fueron combinadas y destinadas a purificación por cromatografía en hidroxilapatito. La etapa de purificación por cromatografía de intercambio iónico supuso un enriquecimiento equivalente a sólo dos purificaciones (Tabla 3.11), debido principalmente a la pérdida de actividad que tuvo lugar mientras la enzima estuvo unida a la columna.

#### 3.3.4.2. Purificación por cromatografía en hidroxilapatito.

La HPL presente en las fracciones activas resultantes de la etapa anterior se cargó sobre una columna de hidroxilapatito tal y como se describe en el Apartado 2.9.1.3. En estas condiciones la actividad HPL quedó retenida en la columna, siendo eluída a continuación elevando la concentración del tampón utilizado, fosfato potásico, desde 0,025 hasta 0,2 M. El perfil de elución resultante se muestra en la Figura 3.14. Dos picos de actividad muy próximos fueron eluidos, denominándose HPL-I el eluído a una menor concentración de tampón y HPL II al que lo hizo a mayor concentración del mismo. Las fracciones más activas correspondientes a cada pico fueron caracterizadas separadamente. Dichas fracciones fueron purificadas 61 y 58 veces respectivamente respecto al extracto crudo inicial (Tabla 3.11), con un rendimiento aproximado del 2 % respecto a la actividad total de partida. Los resultados obtenidos para la purificación parcial de la HPL de aceituna, en las tres etapas descritas son similares a los reportados para hojas de té (Matsui *et al.*, 1991)

y frutos inmaduros de pimiento (Shibata *et al.*, 1995). Al igual que en aceituna, en estos trabajos también tuvo gran importancia el paso de solubilización de las membranas, encontrándose además una gran semejanza entre los perfiles de elución obtenidos en los mencionados pasos cromatográficos, indicando así que las HPLs de diferentes frutos y hojas verdes tienden a presentar un comportamiento análogo, debido probablemente a una alta similitud estructural entre ellas.

### 3.3.5. Especificidad de substrato de las hidroperóxido liasas de pulpa de aceituna.

La especificidad de substrato de la enzima HPL viene definida por su capacidad para catalizar la lisis de los diferentes isómeros posicionales (13- o 9-) de los hidroperóxidos procedentes del ácido linoleico o linolénico. La preferencia por unos u otros definirá el grado de insaturación, así como la longitud de cadena de los aldehídos volátiles que se producen en la reacción. De esta forma, a partir de los hidroperóxidos del ácido linolénico se generan aldehídos con mayor grado de insaturación (3(Z)-hexenal, 3(Z),6(Z)-nonadienal) que a partir de los del linoleico (hexanal, 3(Z)-nonenal). Por otra parte, a partir de los 13-hidroperóxidos se forman aldehídos de seis átomos de carbono (hexanal, 3(Z)-hexenal) presentes típicamente en el llamado olor verde (Hatanaka, 1993), mientras que a partir de los 9-hidroperóxidos se producen aldehídos de nueve átomos de carbono (3(Z)-nonenal, 3(Z),6(Z)-nonadienal), los cuales dan lugar al típico aroma de frutos como el pepino o la pera (Phillips y Galliard, 1978; Kim y Grosh, 1981).

Todas las HPLs descritas hasta la fecha se han mostrado activas con los hidroperóxidos derivados tanto del ácido linoleico como del linolénico, de forma que generalmente las enzimas aisladas a partir de órganos fotosintéticos como hojas o frutos muestran mayores actividades con los segundos, mientras que las procedentes de órganos no fotosintéticos son más activas con los primeros (Sekiya *et al.*, 1984; Vick, 1993). Por el contrario, las HPLs se caracterizan por presentar especificidad estricta respecto al isómero posicional de hidroperóxido que utilizan como substrato, de forma que las HPLs activas con 13- hidroperóxidos no lo son con los 9- y viceversa. La mayoría de las especies

**Tabla 3.12.** Especificidad de sustrato de las HPLs aisladas a partir de pulpa de aceituna. Cada valor representa la media de tres determinaciones.

Sustrato	HPL-I		HPL-II	
	(nkat/mg prot)	%	(nkat/mg prot)	%
Ácido 13-ZEZ-hidroperoxilínolénico	46 ± 2	100	33 ± 2	100
Ácido 9-EZZ-hidroperoxilínolénico	nd	0	nd	0
Ácido 13-ZE-hidroperoxilínoleico	19 ± 4	42	12 ± 1	38
Ácido 9-EZ-hidroperoxilínoleico	nd	0	nd	0
Ácido 13-EE-hidroperoxilínoleico	nd	0	nd	0

nd: no detectado

vegetales estudiadas poseen HPLs activas con los 13-hidroperóxidos, mientras que solamente una minoría, representada por los frutos anteriormente mencionados, lo son con los 9- hidroperóxidos.

Las enzimas parcialmente purificadas se ensayaron con distintos isómeros de hidroperóxidos preparados por oxidación de los ácidos linoleico o linolénico y purificados por HPLC tal y como se indica en Materiales y Métodos (Apartados 2.4.3.2. y 2.5.2.). En la Tabla 3.12 se observa que las dos enzimas purificadas mostraron un perfil de especificidad muy similar, mostrándose activas únicamente con los 13-ZE-hidroperóxidos y no presentando actividad alguna con los 9-EZ-hidroperóxidos. Estas enzimas tampoco se mostraron activas con el ácido 13-ZZ-hidroperoxilínoleico, demostrándose así que no sólo la posición de la función hidroperóxido sino además la configuración de los dobles enlaces que la flanquean juega un papel importante en la interacción entre la HPL y sus sustratos. Por otra parte, dentro de los 13-hidroperóxidos el que fue más eficazmente escindido por ambas isoformas fue ácido 13-ZEZ-hidroperoxilínolénico, con el cual ambas enzimas se mostraron unas 2,5 veces más activas que con el ácido 13-ZE-hidroperoxilínoleico.

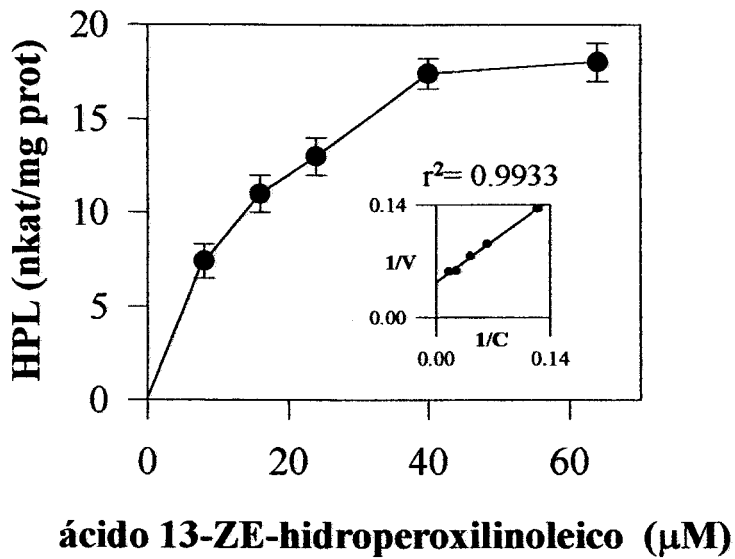
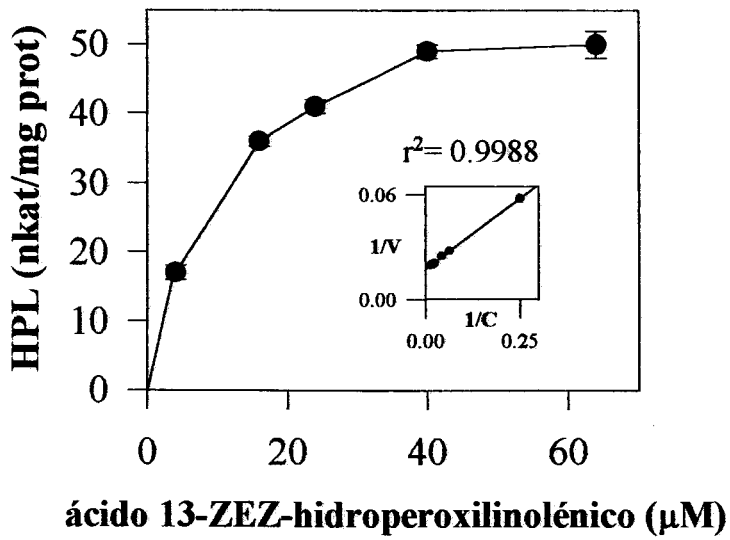
Estos parámetros de especificidad son semejantes a los publicados para las HPLs

de hojas de té y frutos de pimiento, las cuales al igual que las aquí descritas se mostraron específicas para los 13-ZE o 13-ZEZ hidroperóxidos de los ácidos linoleico o linolénico, exhibiendo además preferencia por el ácido 13-ZEZ-hidroperoxilinolénico. La diferencia más significativa entre estas HPLs y la de aceituna se encuentra en que las primeras mostraron una actividad con este último sustrato relativamente más alta, resultando ser unas 10 veces superior a la exhibida con el hidroperóxido derivado del ácido linoleico (Matsui *et al.*, 1991; Shibata *et al.*, 1995).

Estos resultados de especificidad resultan coherentes con los obtenidos en los experimentos de marcaje (Apartado 3.1.1.3), siendo muy importantes a la hora de justificar bioquímicamente la composición de volátiles del aceite de oliva virgen, ya que explican la total ausencia de nonenales y nonadienales en los perfiles de volátiles, así como la abundancia de aldehídos C6 dentro de los mismos. Por otra parte, la preferencia de las HPLs de aceituna por el ácido 13-EZ-hidroperoxilinolénico, junto con la especificidad de la LOX de aceituna para suministrar dicho sustrato (Apartado 3.2.5.), explican por partida doble el predominio de los C6 aldehídos insaturados y compuestos derivados en el aroma del aceite de oliva virgen, donde dan cuenta de más del 80% del total de los volátiles producidos a través de la ruta de la lipoxigenasa (Morales *et al.*, 1995).

### 3.3.6. Parámetros cinéticos de la hidroperóxido liasa.

Para completar el estudio de las HPLs purificadas se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos para sus sustratos fisiológicos, los ácidos 13-ZE-hidroperoxilinoico y 13-ZEZ-hidroperoxilinolénico. Para ambos hidroperóxidos se obtuvieron cinéticas de saturación, que se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten (Figura 3.15). Los parámetros cinéticos resultantes de cada enzima se muestran en la Tabla 3.13. Los valores de  $K_m$  obtenidos se encuentran en el rango micromolar, indicando así una alta afinidad de la enzima por sus sustratos. Ambas enzimas mostraron el mismo valor de  $K_m$  ( $10\mu\text{M}$ ) para el ácido 13-ZEZ-hidroperoxilinolénico, mientras que los valores de  $K_m$  para el ácido 13-ZE-hidroperoxilinoico resultaron ser más altos que los anteriores, además de diferentes para cada isoforma; así, la HPL-I mostró un valor de  $K_m$  de  $17\mu\text{M}$ , mientras que el correspondiente para la HPL-II fue de  $78\mu\text{M}$ . Estos valores están en buena concordancia



**Figura 3.15.** Efecto de la concentración de los substratos ácido 13-ZE-hidroperoxilínoleico y ácido 13-ZEZ-hidroperoxilínolénico sobre la HPL-I. Las representaciones de dobles inversas se muestran en el recuadro interior de cada gráfica.

**Tabla 3.13.** Parámetros cinéticos de las HPLs purificadas a partir de pulpa de aceituna.

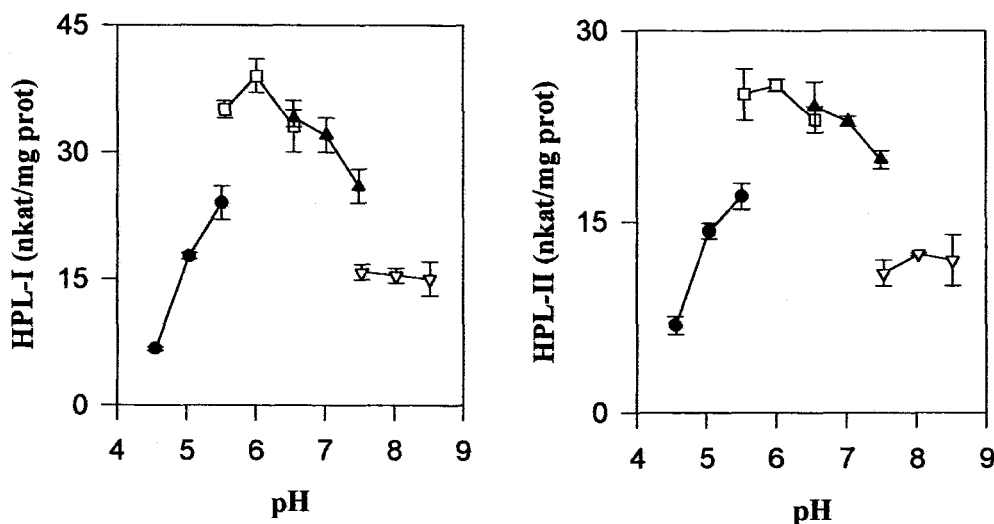
Substrato	HPL-I			HPL-II		
	Km ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (pkat/mg prot)	$R^2$	Km ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (pkat/mg prot)	$R^2$
13-ZEZ-HPLN <sup>1</sup>	9,6	58,0	0,9988	9,7	34,1	0,9838
13-ZE-HPL <sup>2</sup>	17,1	23,1	0,9933	78,3	32,1	0,9999

<sup>1</sup> Ácido 13-ZEZ-hidroperoxilínolénico, <sup>2</sup> Ácido 13-ZE-hidroperóxilínoleico

con los reportados para HPLs de otros frutos las cuales también mostraron valores del orden micromolar (Phillips y Galliard, 1978; Schreier y Lorenz, 1982). Especial paralelismo se encuentra de nuevo con los frutos de pimiento (Shibata *et al.*, 1995), a partir de los cuales también se purificaron dos isoformas de HPL de parámetros cinéticos semejantes a los calculados para las isoformas procedentes de pulpa de aceituna.

### 3.3.7. Curvas de pH de las hidroperóxido liasas de pulpa de aceituna.

Las dos formas de HPL parcialmente purificadas respondieron de manera similar a los cambios de pH. Así, como se muestra en la Figura 3.16., ambas exhibieron un óptimo de actividad a pH 6,0, valor acorde con los resultados obtenidos en los experimentos de marcaje con [1-<sup>14</sup>C]-18:2 (Apartado 3.1.1.2.), y muy similar o idéntico a los reportados para el tomate (Schreier y Lorenz, 1982), pimiento (Shibata *et al.*, 1995) o pera (Kim y Grosh, 1981). Al disminuir el valor de pH se observó un drástico descenso de las actividades, de forma que las mismas representaron tan solo entre un 50 y un 25 % de la actividad a pH óptimo en el intervalo de pH de batido de la pasta de aceituna (4,5-5,0), aunque hay que considerar que gran parte de dicho descenso es debido a la fuerte inactivación que experimentaron estas enzimas al ser ensayadas con el tampón acetato sódico.

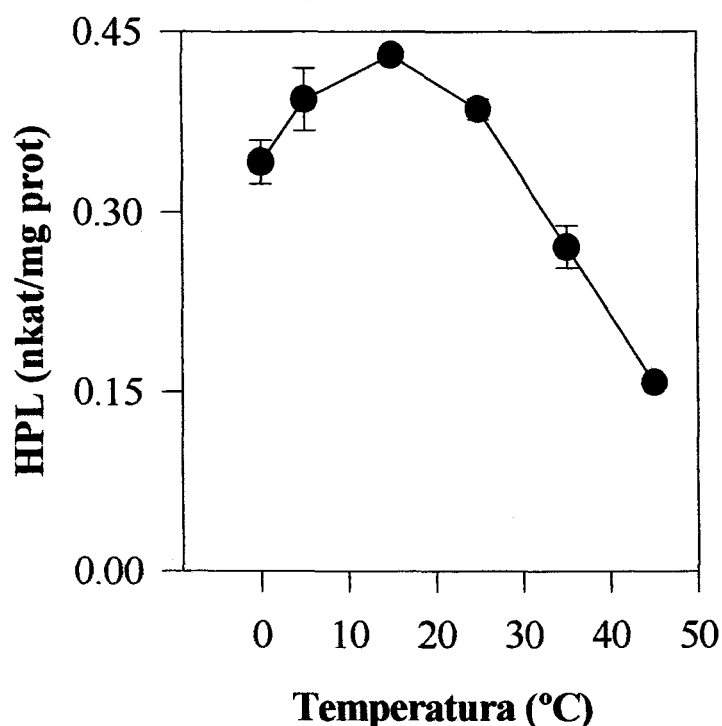


**Figura 3.16.** Curvas de pH de las HPLs parcialmente purificadas a partir de pulpa de aceituna. Cuatro tampones diferentes se utilizaron para abarcar el intervalo de valores de pH señalado, éstos fueron acetato sódico (-●-), MES (-□-), PIPES (-▲-) y TRIS (-▽-). Todos los puntos representan la media de tres determinaciones.

### 3.3.8. Curva de temperatura de la hidroperóxido liasa.

Los resultados obtenidos en el Apartado 3.2.8. señalaban que el incremento de la producción de volátiles a baja temperatura observado en los experimentos de marcaje (Apartados 3.1.1.4. y 3.1.2.3.) no era atribuible a un aumento de actividad LOX, siendo pues de esperar que la siguiente enzima de la ruta, la HPL, sea la responsable de dicho fenómeno.

El comportamiento de esta enzima frente a la temperatura se investigó simulando las condiciones utilizadas en los experimentos de marcaje. De esta forma, se optó por el método de ensayo de punto final basado en la medida de la producción de hexanal (Apartado 2.8.2.2.), empleándose un tiempo de incubación de 30 minutos y el precipitado de 150 K obtenido a partir de aceitunas recolectadas 34 SDF como fuente de enzima. En



**Figura 3.17.** Curva de temperatura de la HPL de pulpa de aceituna. Se emplearon membranas microsómicas preparadas a partir de frutos recolectados 34 SDF como fuente de enzima. El tiempo de incubación empleado fue de 30 minutos para reproducir el tiempo de batido de la pasta de aceitunas. Las medidas de actividad se realizaron por triplicado, empleándose ácido 13-ZE-hidroperoxilinoico como sustrato.

estas condiciones la HPL mostró una curva de actividad frente a la temperatura muy semejante a las obtenidas en los experimentos de marcaje para la formación de hexanal a partir de linoleato (Figura 3.17), mostrando un máximo a 15°C, así como un claro descenso de actividad a temperaturas superiores a 25°C. Por tanto, la estimulación de la síntesis de volátiles observada a baja temperatura es explicable a partir del comportamiento inusual de la HPL de aceituna respecto a dicho parámetro, el cual no había sido descrito hasta la fecha para HPLs de otras fuentes.

Estos resultados sugieren que la disminución de los componentes del flavor que se

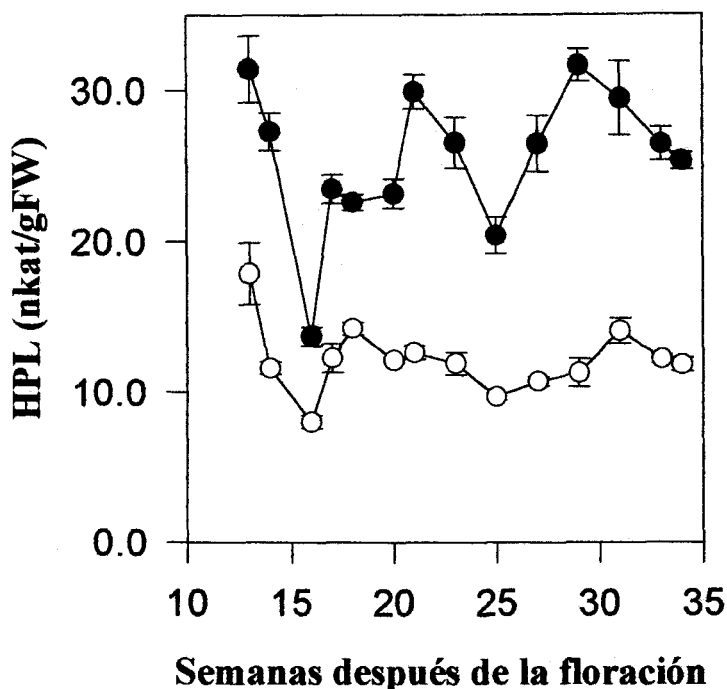


produce en el aceite cuando la pasta de aceituna es batida a más de 25°C se debe principalmente al descenso de actividad HPL que conlleva dicho aumento de temperatura.

Por otra parte, los resultados muestran cómo la investigación a nivel básico de rutas enzimáticas en frutos de aceituna pueden dar una explicación a fenómenos observados a nivel industrial en la extracción del aceite de oliva, abriendo así posibilidades de mejora de dicho producto, bien por optimización de los parámetros de operación en planta, o mediante modificación por ingeniería genética de las correspondientes rutas bioquímicas.

### 3.3.8. Cambios en la actividad hidroperóxido liasa a lo largo del desarrollo de los frutos.

El estudio de la variación en los niveles de actividad HPL a lo largo del período de desarrollo de las aceitunas se llevó a cabo de forma similar a la descrita para la LOX (Apartado 3.2.9.). Se realizaron preparaciones de la enzima de forma periódica durante un intervalo de tiempo de 21 semanas, abarcando desde 13 hasta 34 SDF. La HPL fue ensayada usando tanto ácido 13-ZE-hidroperoxilinoico como ácido 13-ZEZ-hidroperoxilinoico como sustratos. Los resultados (Figura 3.18) muestran que, aunque la desviación típica resultante de los ensayos fue pequeña, se encontró una gran oscilación en las actividades medidas a lo largo de la temporada, la cual podría ser atribuida a que, a diferencia de la LOX, esta enzima no fue ensayada con sustratos comerciales de calidad uniforme, sino con hidroperóxidos preparados en el laboratorio, que al ser compuestos metaestables podrían haber introducido variabilidad en los resultados. Sin embargo, a pesar de esta variabilidad, puede observarse que la actividad HPL no presenta una tendencia clara de variación a lo largo del desarrollo de las aceitunas, manteniendo un nivel de actividad semejante durante todo el periodo de estudio. Por otra parte, cabe también destacar que la especificidad de sustrato de la HPL no mostró cambios considerables a lo largo de todo el desarrollo de las aceitunas. Estos resultados parecen indicar que el descenso en la capacidad de producción de volátiles C6 por parte de la aceituna a lo largo de su desarrollo (Aparicio y Morales, 1998) no cabría ser atribuido a la enzima HPL, ajustándose más al perfil descrito en el presente trabajo para la actividad LOX, la cual, además de ser limitante



**Figura 3.18.** Cambios en la actividad HPL a lo largo del desarrollo de los frutos de aceituna. La actividad fue medida usando tanto ácido 13-EZ-hidroperoxilinoleico (-O-) como ácido 13-ZEZ-hidroperoxilinolenico (-●-). Cada punto representa la media de tres determinaciones.

frente a la HPL en las condiciones de ensayo empleadas, experimenta un claro descenso a lo largo de la mayor parte del desarrollo de los frutos. Así mismo, esta afirmación ha de ser mantenida con cautela, ya que el período de recolección de la aceituna se prolonga más allá del período de estudio abarcado en esta tesis, por lo que no se ha de descartar un descenso de la actividad HPL en estadios de desarrollo posteriores, que contribuya, junto con la caída de actividad LOX, a la disminución de la concentración de volátiles en el aceite. Por otra parte, los perfiles de actividad aquí reportados son similares a los descritos para el tomate, donde al igual que en la aceituna el descenso de las “notas verdes” de su aroma al avanzar el grado de maduración era únicamente atribuible al descenso de la actividad LOX, ya que la actividad HPL en este fruto permanece casi invariable en todos los estadios de

maduración estudiados (Riley *et al.*, 1996). Por el contrario, en frutos de pimiento se detectó un descenso general de ambas actividades durante el desarrollo de los frutos, de forma que los aldehídos de seis átomos presentes en su aroma fueron casi indetectables en las últimas etapas de maduración (Matsui *et al.*, 1997).

### **3.4. ALCOHOL DESHIDROGENASA.**

Los alcoholes volátiles de seis átomos de carbono se hallan formando parte del aroma de diversos productos vegetales (Yamashita *et al.*, 1976). En trabajos previos se ha establecido que estos compuestos provienen de la reducción vía alcohol deshidrogenasa de sus correspondientes aldehídos, generados a partir de ácidos grasos poliinsaturados a través de la ruta de la lipoxigenasa (Tressl y Drawert, 1973; Yamashita *et al.*, 1977).

Los alcoholes C6 son relativamente abundantes dentro del aroma del aceite de oliva virgen, dando cuenta de entre un 30 y un 50% del total de compuestos no carbonílicos presentes en su fracción de volátiles (Morales *et al.*, 1995; Ranalli y De Mattia, 1997), siendo los mayoritarios el hexanol, 2(E)-hexenol y 3(Z)-hexenol o alcohol de hoja. Dichos compuestos proporcionan al aceite notas de olor verde (Hatanaka *et al.*, 1992), y aunque presentan un umbral de percepción relativamente alto, su importancia organoléptica se ve potenciada por su posible contribución a la sensación de sabor amargo (Aparicio y Morales, 1998).

En estudios previos destinados a caracterizar la ADH en la pulpa de aceituna no fue detectada actividad en extractos crudos preparados a partir de ésta, aunque se observó que discos de tejido de dichos frutos fueron capaces de producir la reducción de aldehídos suministrados como sustrato (Olías *et al.*, 1993). En el presente trabajo se estudió la ADH de aceituna a partir de extractos crudos preparados por resuspensión de polvo acetónico de dichos frutos. El uso del polvo acetónico de aceitunas como fuente de enzima supuso la serie de ventajas ya numeradas en el Apartado 3.1, encontrándose además que mientras los extractos crudos preparados a partir de tejido fresco mostraron tan solo baja actividad NAD-ADH, en los extractos de resuspensión de polvo acetónico se detectaron altas actividades tanto NAD-ADH como NADP-ADH. Este comportamiento podría deberse a la presencia en la pulpa de aceituna de algún inhibidor endógeno (Olías *et al.*, 1993)

susceptible de ser arrastrado por la acetona fría, de forma que su ausencia en el polvo acetónico posibilitara la detección *in vitro* de estas enzimas. Las actividades medidas en extractos crudos de resuspensión de polvo acetónico variaron entre 2 y 15 nkat/mg prot para la NADP-ADH, siendo la actividad dependiente de NAD unas 20 veces inferior.

### 3.4.1. Purificación de las alcohol deshidrogenasas.

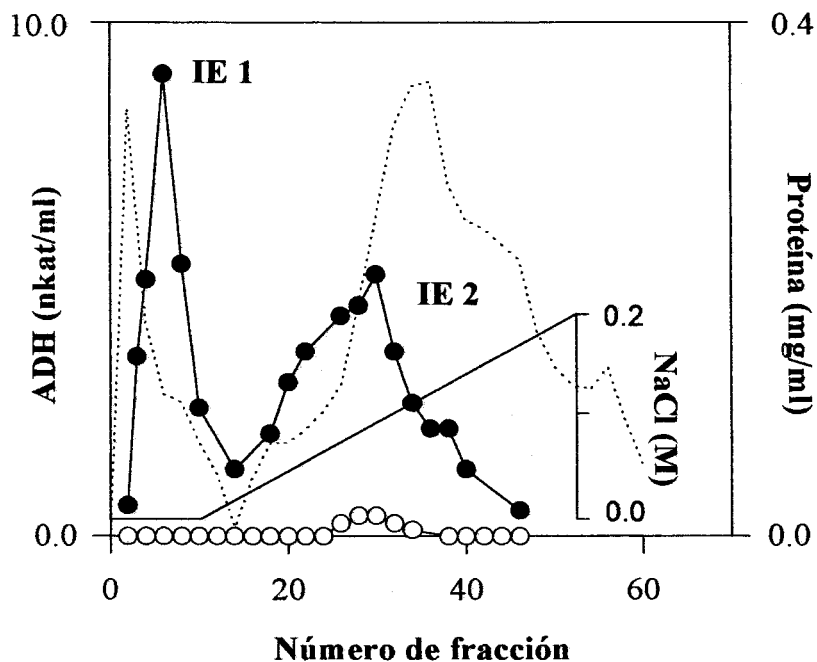
Los extractos preparados a partir de polvo acetónico fueron fraccionados por precipitación con sulfato amónico, tomándose el corte del 30 al 60 % de saturación como fuente de enzima para posteriores etapas de purificación. Dicho corte de proteína contenía el 70 % de la actividad NADP-ADH, y el 40 % de la NAD-ADH totales presentes en el extracto crudo, suponiendo un enriquecimiento de 1,8 purificaciones para la NADP-ADH (Tabla 3.14).

#### 3.4.1.1. Purificación por cromatografía de intercambio iónico.

La actividad ADH presente en el corte de precipitación con sulfato amónico resultante de la etapa anterior fue purificada por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharosa (ver Apartado 2.9.2.2.). Dos picos de actividad se eluyeron de la columna (Figura 3.19), el primero de ellos (IE1), que no se retuvo en la fase de intercambio, exhibió solamente actividad NADP-ADH, dando cuenta de aproximadamente el 40 % de la actividad NADP-ADH total. Un segundo pico de actividad (IE2) fue eluido de la columna aplicando un gradiente de NaCl de 0 a 0,2 M. Este pico contenía el restante 60 % de la actividad NADP-ADH, junto con la totalidad de la actividad NAD-ADH.

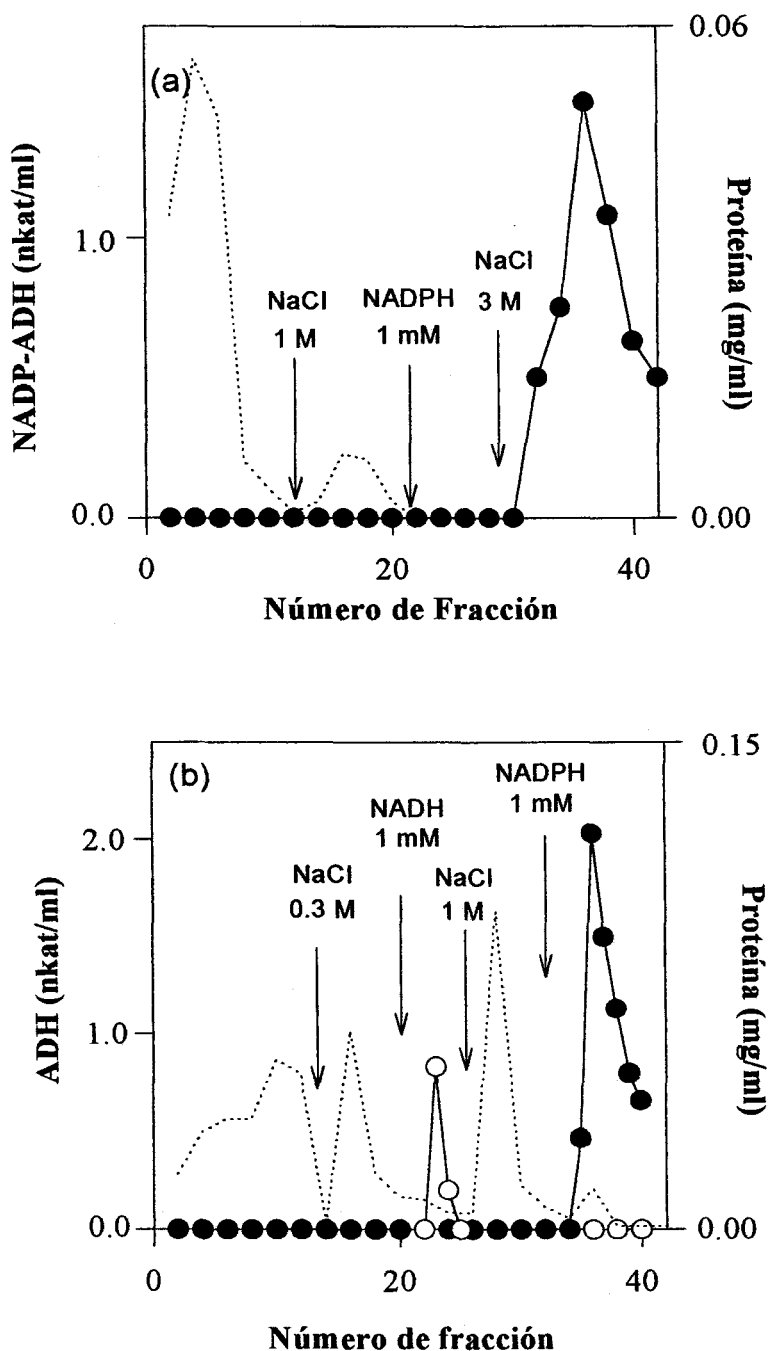
#### 3.4.1.2. Purificación por cromatografía de afinidad.

Las fracciones activas de la etapa anterior fueron sometidas a un nuevo paso de purificación por cromatografía de afinidad en Cibacrom Blue-Sepharosa (Apartado 2.9.2.3.). La actividad NADP-ADH presente en el primer pico eluido de la columna de cromatografía de intercambio iónico (IE1) se unió fuertemente a la columna de afinidad, de forma que no pudo ser eluida aplicando 1 M NaCl o 1 mM del cofactor NADPH. Finalmente la enzima se eluyó introduciendo en columna una concentración de NaCl de 3 M (Figura 3.20a),



**Figura 3.19.** Perfil de elución de las ADHs presentes en la pulpa de aceituna cromatografiadas por intercambio iónico en DEAE-Sepharosa. En el gráfico se representaron la actividad NADP-ADH (-●-), NAD-ADH (-○-) y la concentración de proteína en cada fracción (----).

obteniéndose un enriquecimiento final de 26 purificaciones (Tabla 3.14). Esta enzima fue denominada NADP-ADH I. El segundo pico de actividad (IE2), el cual contenía actividades dependientes tanto de NAD como de NADP fue también cromatografiado en la misma columna de afinidad. Ambas formas quedaron retenidas en la fase estacionaria, no pudiendo ser eluidas por una concentración salina en el tampón de elución de 0,3 M NaCl. A continuación la columna fue eluida con 1mM NADH resultando un pico que contenía la actividad NAD-ADH. Seguidamente la columna fue lavada con tampón 1 M NaCl, eluyéndose un pico de proteína sin actividad ADH. La actividad NADP-ADH unida a columna fue finalmente eluida con una disolución 1 mM de su cofactor NADPH (Figura 3.20b). Esta actividad fue denominada NADP-ADH II. Las enzimas NAD-ADH y NADP-



**Figura 3.20.** Perfiles de elución de las ADHs presentes en las fracciones IE1 (NADP-ADH I) e IE2 (NADP-ADH II y NADP-ADH) cromatografiadas en una columna de afinidad Cibacrom Blue-Sepharosa. (-●-) NADP-ADH, (-O-) NAD-ADH, (-- --) proteína.

**Tabla 3.14.** Separación y purificación parcial de alcohol deshidrogenasas de pulpa de aceituna. La actividad ADH fue medida usando hexanal (10 mM) y el piridín nucleótido indicado (0,2 mM) como substratos.

Fracción	NAD-ADH (nkat/mg prot)	NADP-ADH (nkat/mg prot)
Extracto crudo	0,5	11,6
Corte 30-60% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	19,3
DEAE-Sepharosa-I		50,8
DEAE-Sepharosa-II	3,3	30,0
Cibacrom Blue		
NAD-ADH	294,6	
NADP-ADH I		300,0
NADP-ADH II		336,6

ADH II obtenidas en este último paso fueron purificadas 600 y 30 veces respectivamente respecto a las correspondientes actividades iniciales (Tabla 3.14).

Así pues, tres isoformas de ADH fueron aisladas partir de los frutos de aceituna. Dichas enzimas fueron caracterizadas, con el objeto de establecer la contribución de cada una de ellas al perfil de alcoholes volátiles del aroma del aceite de oliva virgen en función de sus parámetros cinéticos y de especificidad.

### 3.4.2. Parámetros cinéticos de las alcohol deshidrogenasas de aceituna.

Al ser los alcoholes de seis átomos de carbono los más abundantes en el perfil de volátiles del aceite de oliva virgen (Morales *et al.*, 1995), el hexanal fue tomado como sustrato modelo para la determinación de los parámetros cinéticos de las tres ADHs aisladas a partir de la pulpa de aceituna. Las tres enzimas mostraron cinéticas típicas de saturación al ser

**Tabla 3.15.** Parámetros cinéticos de las tres ADHs purificadas a partir de pulpa de aceituna para el aldehído hexanal.

Enzima	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (nkat/mg prot)
NAD-ADH	2,10	320
NADP-ADH I	1,90	280
NADP-ADH II	0,04	740

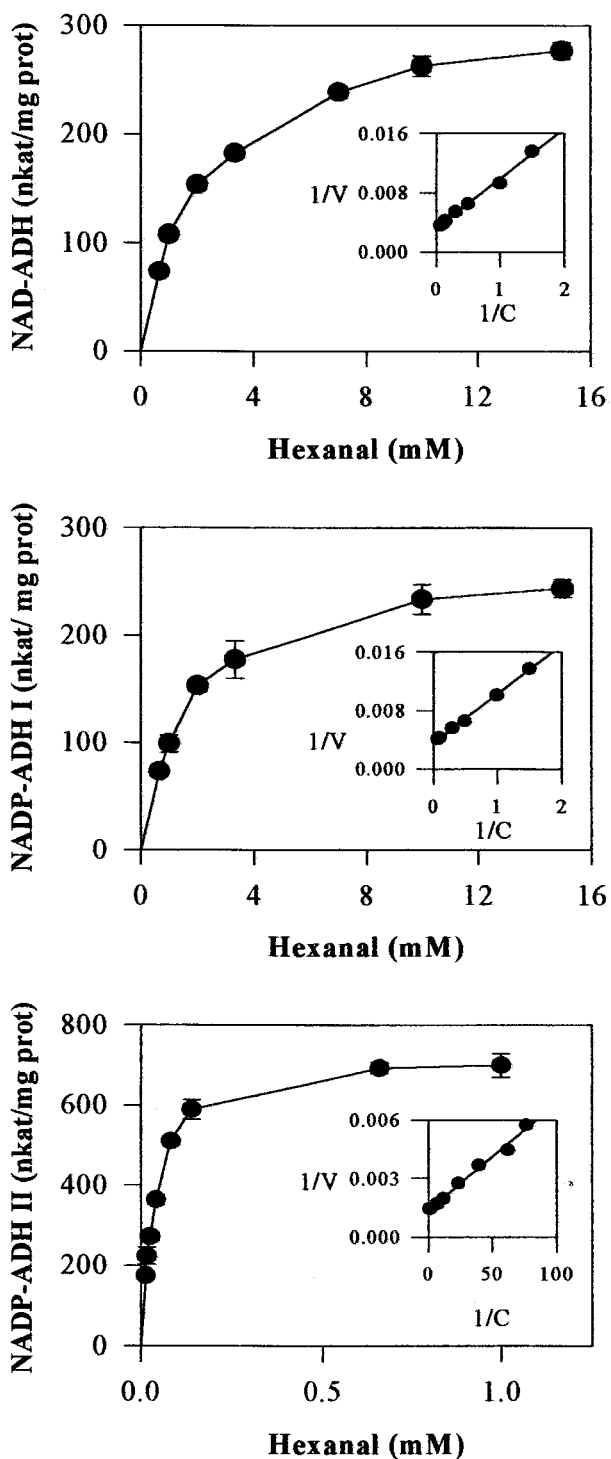
ensayadas a diferentes concentraciones de dicho sustrato (Figura 3.21).

Los parámetros cinéticos para el hexanal de las tres ADHs purificadas se muestran en la Tabla 3.15. De entre ellas, la enzima NADP-ADH II mostró la K<sub>m</sub> más baja para dicho sustrato (K<sub>m</sub> = 40 μM), así como la mayor V<sub>max</sub> (740 nkat/mg prot), sugiriendo que es la isoforma realmente implicada en la generación de alcoholes volátiles durante el proceso de extracción del aceite de oliva virgen. Los parámetros cinéticos de esta enzima para otros sustratos carbonílicos así como para su cofactor, el NADPH, fueron determinados con objeto de llevar a cabo una caracterización más completa de la misma (Tabla 3.16). Así, de entre los sustratos empleados, esta enzima mostró el valor de K<sub>m</sub> más bajo para el aldehído insaturado 2(E)-hexenal (K<sub>m</sub> = 12 μM), el cual como ya se ha señalado anteriormente, es un intermediario de la ruta de la LOX producido a partir de del

**Tabla 3.16.** Parámetros cinéticos de la enzima NADP-ADH II para varios sustratos.

Substrato	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (nkat/mg prot)
Propanal	4,400	190
E-2-hexenal	0,012	520
Nonanal	0,030	560
NADPH	0,006	660





**Figura 3.21.** Influencia de la concentración de hexanal en las tres ADHs parcialmente purificadas a partir de pulpa de aceituna en desarrollo. Cada punto representa la media de tres determinaciones.

ácido linolénico, siendo además el componente volátil más abundante en el aceite de oliva virgen. Por lo demás, la enzima exhibió un bajo valor de  $K_m$  para el aldehído saturado nonanal ( $K_m = 30 \mu\text{M}$ ), el cual no es intermediario de la ruta de la ruta de la LOX, y una  $K_m$  muy alta para el aldehído propanal ( $K_m = 4,4 \text{ mM}$ ). Esta enzima mostró finalmente bajo valor de  $K_m$  para el reductor NADPH. Por otra parte, las otras dos enzimas purificadas, NAD-ADH y NADP-ADH II, mostraron valores de  $K_m$  para el hexanal mucho mayores (1,9 y 2,1 mM respectivamente, Tabla 3.15), mostrándose por lo tanto mucho menos eficaces que la NADP-ADH II para catalizar la reducción de dicho aldehído a bajas concentraciones del mismo.

### 3.4.3. Especificidad de sustrato de las alcohol deshidrogenasas de aceituna.

Para completar la caracterización de las enzimas purificadas, así como para intentar definir su papel en la biosíntesis de alcoholes volátiles, dichas enzimas fueron ensayadas con una gama de aldehídos desde dos a nueve átomos de carbono, entre los cuales se incluyeron intermediarios de la ruta de la LOX procedentes de la degradación de los ácidos linoleico y linolénico, como el hexanal, 2(E)-hexenal, 2(E)-nonenal y 2(E),6(Z)-nonadienal. De esta manera, como se muestra en la Tabla 3.17, la isoforma NADP-ADH II mostró las actividades más altas cuando fue ensayada con aldehídos producidos por la ruta de la LOX, siendo el hexanal el sustrato más eficazmente reducido, indicando de nuevo su participación directa en la biosíntesis de los alcoholes volátiles presentes en el aceite de oliva virgen. La otra enzima dependiente de NADP, la NADP-ADH I, no mostró actividad con aldehídos cortos como el acetaldehído, butanal o propanal, mientras que exhibió la máxima actividad con el aldehído nonanal, el cual no es intermediario de la ruta de la LOX, y actividades altas para otros aldehídos C-9. Este resultado, junto con el de parámetros cinéticos discutidos en el apartado anterior, sugiere que esta enzima no está implicada en la síntesis de los alcoholes de seis átomos de carbono presentes en el aroma del aceite de oliva, sino que, por el contrario, podría estar implicada en la síntesis de los alcoholes de cadena larga que se precisan para la producción de ciertos lípidos estructurales y de recubrimiento. Finalmente, la enzima NAD-ADH mostró las mayores actividades con

**Tabla 3.17.** Especificidad de sustrato de las tres ADHs purificadas a partir de pulpa de aceituna. Las concentraciones de sustrato empleadas fueron de 1 mM para las NADP-ADHs y 10 mM para la NAD-ADH. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Sustrato	NAD-ADH		NADP-ADH I		NADP-ADH II	
	(nkat/mg prot)	%	(nkat/mg prot)	%	(nkat/mg prot)	%
Acetaldehído	138 ± 17	49	nd	0	nd	0
Propanal	262 ± 2	92	nd	0	85 ± 8	12
Butanal	270 ± 2	95	nd	0	130 ± 12	17
Hexanal	280 ± 17	100	178 ± 20	100	730 ± 10	100
E-2-hexenal	58 ± 7	21	103 ± 18	58	500 ± 33	68
Nonanal	75 ± 3	27	778 ± 20	437	590 ± 50	80
E-2-nonanal	88 ± 3	31	345 ± 8	194	295 ± 21	40
E-2-Z-6-nonadienal	55 ± 2	19	305 ± 33	171	512 ± 15	70

aldehídos de cadena corta, mostrándose poco activa con aldehídos de seis o nueve átomos de carbono diferentes al hexanal (Tabla 3.17), por el cual mostró además una baja afinidad (Tabla 3.15), excluyendo así una contribución significativa de esta enzima a la biogénesis de los alcoholes y ésteres volátiles presentes en el aceite de oliva virgen.

Así pues, la NADP-ADH II, al mostrar el menor valor de  $K_m$  para el hexanal (Tabla 3.15) de las tres enzimas purificadas, un bajo valor de  $K_m$  para el 2(E)-hexenal (Tabla 3.16), además de una clara preferencia para utilizar aldehídos de seis ó nueve átomos de carbono (Tabla 3.17), parece ser la enzima realmente implicada en la síntesis de los alcoholes volátiles presentes en el aroma del aceite de oliva virgen. Sin embargo, dentro del patrón de especificidad de esta enzima existe una aparente paradoja, ya que fue muy eficaz a la hora de reducir aldehídos de nueve átomos de carbono, especies que no se hallan presentes entre los volátiles del aceite de oliva virgen, debido a la especificidad estricta de la HPL de la pulpa de aceituna.

Una vez se estableció que la NADP-ADH II es la enzima responsable de la biosíntesis de los alcoholes volátiles del aceite de oliva, se procedió a realizar una caracterización más completa de dicha enzima.

#### 3.4.4. Curva de pH de la NADP-alcohol deshidrogenasa II.

La influencia del pH sobre esta enzima se investigó ensayando la actividad dentro de un intervalo de pH entre 6,0 y 9,5, utilizando los tampones PIPES, TRICINA y CHES a una concentración de 25 mM. La NADP-ADH II mostró un amplio intervalo de actividad en función de dicho parámetro (Figura 3.22), exhibiendo su máxima actividad a un valor de pH de 8,5. De esta forma, el valor óptimo de pH de esta enzima se haya muy alejado del pH de la pasta de aceituna, lo que puede ser la causa de la baja conversión de aldehidos a alcoholes que se registra durante el proceso de extracción del aceite de oliva, que conlleva que los primeros sean los compuestos volátiles que predominan en el producto final.

#### 3.4.5. Evolución de la actividad NADP-alcohol deshidrogenasa II a lo largo del desarrollo de los frutos.

Para determinar las variaciones de actividad NADP-ADH II a lo largo del período de maduración se prepararon polvos acetónicos a partir de aceitunas recolectadas en distintos estados de desarrollo. Dicha actividad fue determinada en extractos crudos, usando hexanal como substrato a una concentración de 1 mM. De esta forma, la actividad medida representa principalmente a la NADP-ADH de menor  $K_m$ , la NADP-ADH II. Como se observa en la Figura 3.23, dicha actividad se incrementó a partir de las 13 SDF, momento en que se produce la lignificación del endocarpo y comienza la biosíntesis y acumulación de triacilgliceroles, alcanzando un máximo a 25 SDF, justo antes del comienzo de la maduración de los mismos, cuando más de la mitad del aceite ha sido sintetizado y los frutos están aun verdes. Después de este punto se observó un descenso de la actividad a lo largo de del proceso de cambio de color de verde a púrpura y finalmente a negro. Estos resultados coinciden con los datos analíticos reportados por (Aparicio y Morales, 1998; Olías, 1980), que muestran cómo el contenido de alcoholes de seis átomos de carbono en el aceite decrece a medida que aumenta el grado de madurez de los frutos empleados para su elaboración. de esta forma el contenido tanto de 3(Z)-hexenol como de E(2)-hexenol descendió a niveles inferiores a la mitad del inicial al pasar de aceitunas verdes a aceitunas

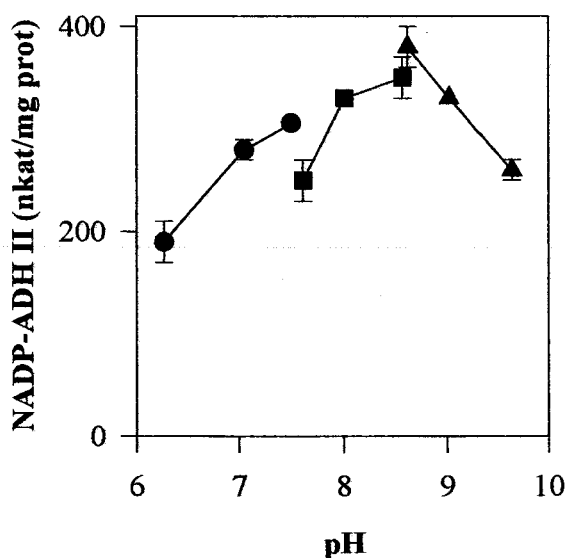


Figura 3.22. Curva de pH de la enzima NADP-ADH II. Se emplearon los tampones PIPES (-●-), TRICINA (-■-) y CHES (-▲-) a una concentración 25 mM para abarcar el intervalo de valores de pH señalado. Cada punto es la media de tres determinaciones.

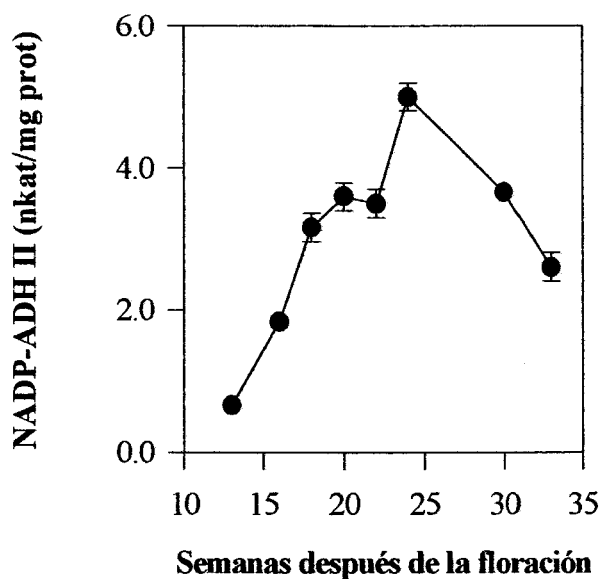


Figura 3.23. Cambios en la actividad NADP-ADH-II durante el desarrollo de los frutos de aceituna. En todos los casos se empleó hexanal como sustrato. Cada punto representa la media de tres determinaciones.

sobremaduras como materia prima. Así mismo, también ha de considerarse que el descenso de la concentración de alcoholes volátiles del aceite debería estar además influenciado por la disminución de la cantidad de sustratos disponibles (aldehidos C6) que se registra al avanzar el estado de maduración de los frutos (Aparicio y Morales, 1998).

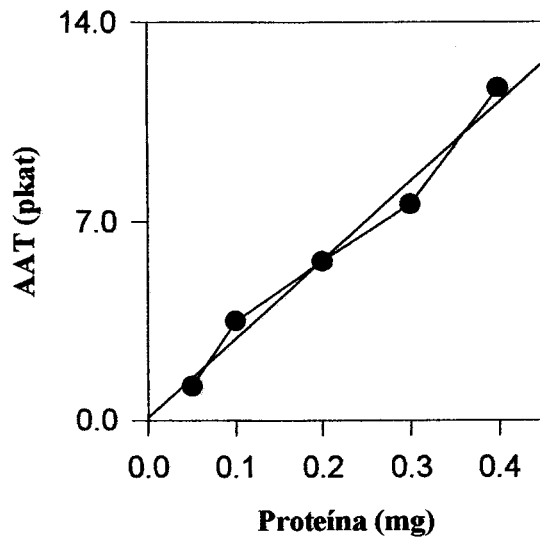
### 3.6. ALCOHOL ACILTRANSFERASA.

Los ésteres son componentes mayoritarios del aroma de muchos frutos de interés comercial como la fresa, el plátano o la manzana (Pérez *et al*, 1992; Tressl y Drawert, 1973; Fellman *et al*, 1993), siendo en muchos casos los principales responsables del flavor que los consumidores les asocian. Estos compuestos se forman a través de la reacción, catalizada por la enzima AAT, entre un tioéster de CoA (generalmente acetil-CoA) y los correspondientes alcoholes volátiles (Harada *et al*, 1985).

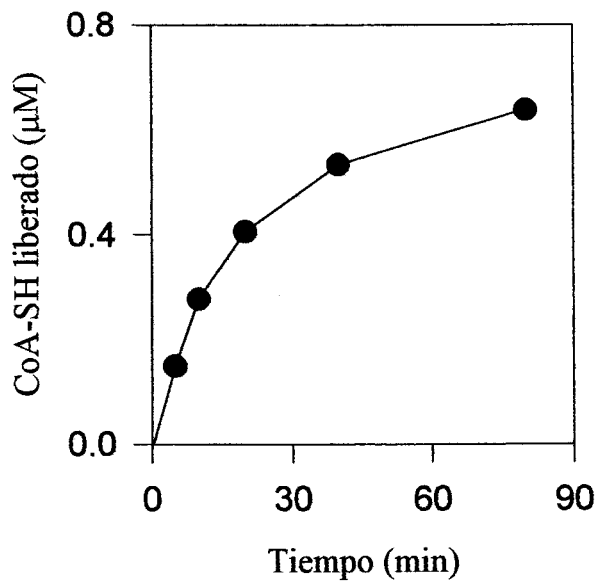
Los ésteres también se hallan presentes en la fracción de volátiles del aceite de oliva virgen, siendo los más abundantes los acetatos de etilo, butilo, y sobre todo de hexilo y 3(Z)-hexenilo, cuya parte alcohólica procede de la degradación de ácidos grasos poliinsaturados a través de la ruta de la lipoxigenasa (Hatanaka *et al*, 1993). Entre las familias de compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen, los ésteres no sobresalen desde un punto de vista cuantitativo, dando cuenta de entre un 1 y un 2% del total de volátiles en dicho aceite (Morales *et al*, 1995). Sin embargo, los importantes atributos que aportan al producto, tales como frutados, verdes y dulces (Aparicio y Morales, 1998) hacen que sea de interés estudiar su formación.

En experimentos previos destinados a caracterizar la AAT en aceituna (Ollas *et al*, 1993) se reportó que discos de tejido de dichos frutos fueron capaces de sintetizar ésteres a partir de ácido acético y diversos alcoholes o aldehidos, implicando así la acción de las enzimas ADH, acetil-CoA sintetasa y alcohol aciltransferasa (AAT). El valor de pH óptimo de producción de ésteres en estas condiciones fue 6,8, mostrando los tejidos estudiados preferencia para usar alcoholes insaturados como sustrato. En el mencionado estudio no fue posible medir la AAT en extractos crudos de aceituna.

En el presente trabajo se midió actividad AAT en cortes de precipitación con sulfato



**Figura 3.24.** Influencia de la concentración de extracto enzimático en el ensayo de la actividad AAT.



**Figura 3.25.** Influencia del tiempo de incubación en el ensayo de actividad AAT.

amónico de las fracciones solubles obtenidas tanto de frutos frescos como de polvo acetónico de aceitunas. La actividad AAT fue recuperada en el corte del 30 al 60 % de saturación, siendo imprescindible, al igual que en el caso de la banana (Harada *et al.*, 1985), la adición de Tritón X-100 a los tampones de molturación o resuspensión para obtener posteriormente fracciones activas. Las actividades medidas se encontraron entre 30 y 90 pkat/mg prot, siendo considerablemente más bajas que las reportadas para otras fuentes como la fresa (Pérez *et al.*, 1993), o el plátano (Harada *et al.*, 1985). Este bajo nivel de actividad explicaría que, a diferencia de los mencionados frutos, los ésteres tengan poca importancia cuantitativa en el aroma de la aceituna o del aceite de oliva virgen, donde predominan alcoholes y aldehidos.

### 3.6.1. Optimación del ensayo de actividad de la alcohol aciltransferasa.

A diferencia de las anteriores enzimas, la AAT no fue ensayada de forma continua, por lo que se hizo necesario investigar el rango lineal de tiempo de reacción y cantidad de extracto enzimático para establecer las condiciones óptimas de ensayo.

#### 3.6.1.1. *Influencia de la cantidad de extracto enzimático.*

La actividad AAT aumentó de forma aproximadamente lineal al ser ensayada con cantidades crecientes de extracto enzimático (Figura 3.24), apreciándose a su vez un aumento paralelo de la absorbancia de los blancos, lo que sugiere la presencia en dicho extracto de acetil-CoA esterasas inespecíficas, que catalizan la liberación de CoASH no dependiente de hexanol. Así, y sobre la base de los resultados obtenidos se decidió emplear una cantidad de extracto equivalente a 200 µg de proteína, la cual suministró un nivel de actividad fácilmente detectable con un blanco de baja absorbancia.

#### 3.6.1.2. *Influencia del tiempo de incubación.*

La influencia del tiempo de incubación se estableció mediante medidas periódicas de la liberación de CoA-SH dependiente de hexanol en el medio de ensayo estándar durante un lapso de 80 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.25, donde se observa que la liberación de CoASH dependiente de hexanol con respecto al tiempo se



ajustó a una curva hiperbólica, cuyo intervalo lineal abarcó aproximadamente los 10 primeros minutos de reacción. Por tanto, el tiempo de incubación en los ensayos subsiguientes se estableció en 10 minutos, período que suministró el máximo incremento de absorbancia dentro del rango lineal de actividad de la enzima AAT.

### 3.6.2. Parámetros cinéticos.

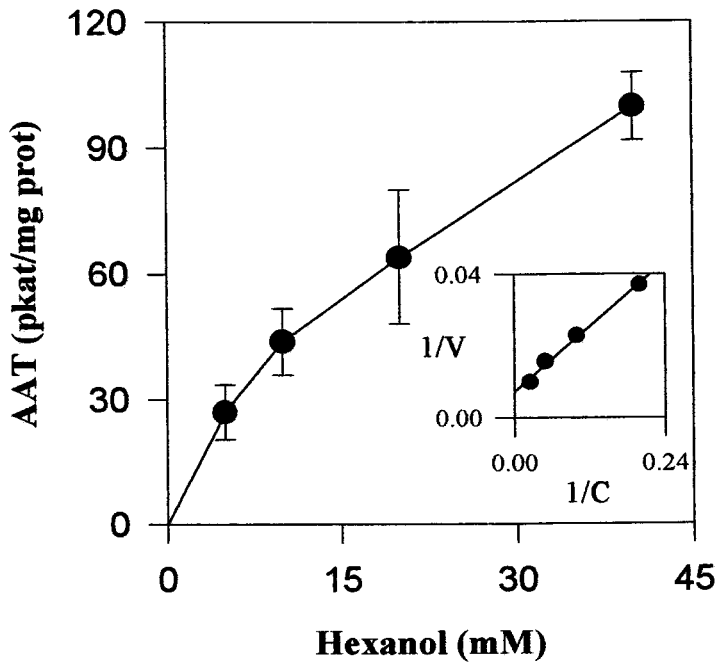
En trabajos anteriores se ha descrito que las AATs procedente de frutos muestran altos valores de  $K_m$  (orden mM) para los alcoholes con los que son activas (Harada *et al.*, 1985, Pérez *et al.*, 1992). En el caso de la AAT de aceituna, la actividad creció al incrementarse la concentración de hexanol en el medio según se observa en la Figura 3.26, obteniéndose una curva que no pudo ser saturada incluso a la concentración que marca el límite de solubilidad del sustrato en medio acuoso (aproximadamente 35 mM), indicando que esta enzima posee baja afinidad por el mismo. La curva resultante se ajustó bien al modelo cinético de Michaelis-Menten ( $r^2=0,9949$ ), resultando un valor de  $K_m$  para el hexanol de 21 mM (Tabla 3.18), valor alto incluso si se compara con los reportados para otros frutos como el plátano o la fresa. Así, el primero de éstos mostró un valor de  $K_m$  de 0,4 mM para el alcohol isoamílico (Harada *et al.*, 1985), mientras que el valor de la segunda para el butanol fue de 3 mM (Pérez *et al.*, 1992).

De forma análoga se estudio la influencia de la concentración de acetil-CoA. En

**Tabla 3.18.** Parámetros cinéticos de la AAT de aceituna para los sustratos hexanol y acetil-CoA.

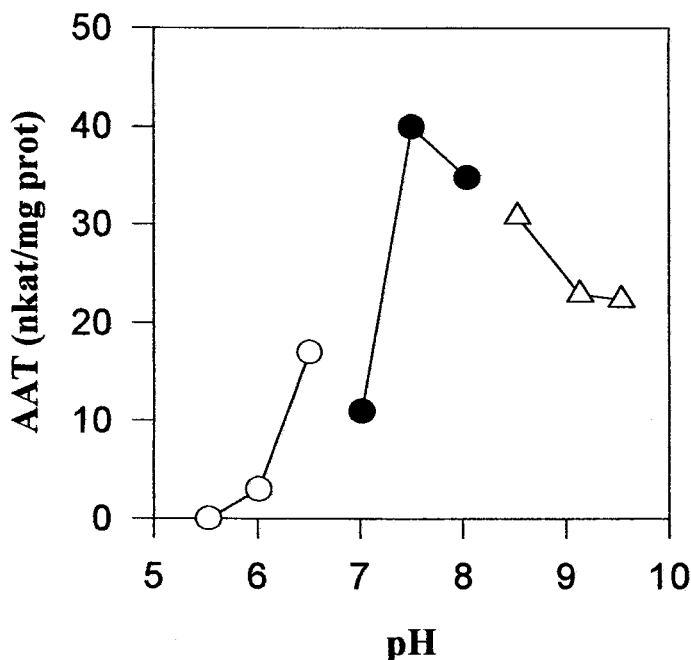
Substrato	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (pkat/mg prot)	$R^2$
Hexanol	21	128	0,9949
Acetil-CoA	2	213	0,9671

Los parámetros cinéticos del acetil-CoA fueron calculados usando hexanol como sustrato a una concentración de 20 mM.



**Figura 3.26** Influencia de la concentración de hexanol en la actividad AAT de aceituna. En el recuadro interior se llevó a cabo la representación de dobles inversas de los mismos resultados. Cada ensayo se realizó por duplicado.

este caso se obtuvo un valor de  $K_m$  de 2 mM, muy superior al reportado para AATs de plátano y fresa, las cuales fueron de 50 y 65  $\mu\text{M}$  respectivamente (Harada *et al.*, 1985; Pérez *et al.*, 1992). De cualquier modo, estos resultados han de ser tomados con cautela, ya que se comparan parámetros cinéticos de enzimas parcialmente purificadas con los de una enzima presente en una fracción cruda, de manera que se ha de esperar que el valor de  $K_m$  que muestra la AAT de aceituna se acerque a los valores mencionados después de sucesivas purificaciones.



**Figura 3.27.** Curva de pH de la AAT de aceituna. Tres tampones diferentes se emplearon para abarcar el intervalo de valores de pH señalado, acetato sódico (-O-), HEPES (-●-) y TRIS (-Δ-).

### 3.6.3. Curva de pH de la alcohol aciltransferasa.

Los valores de pH óptimo publicados para AATs de otras fuentes resultaron por lo general alcalinos, situándose entre 8,0 y 8,5 (Harada *et al.*, 1985; Pérez *et al.*, 1992; Fellman *et al.*, 1993). Estos datos contrastan con el valor de pH óptimo reportado para la formación de ésteres por discos de pulpa de aceituna a partir de acetato y hexanal (Olías *et al.*, 1993), el cual fue ligeramente ácido.

En el presente trabajo se investigó la curva de pH de la enzima AAT presente en extractos de pulpa de aceituna libres de células. Como se muestra en la Figura 3.27, el valor de pH óptimo de esta enzima resultó ser 7,5, valor que se acercó más a los óptimos reportados para otras especies como el plátano o la fresa (Harada *et al.*, 1985; Pérez *et al.*, 1992), que al descrito para discos de tejido de pulpa de aceituna (Olías *et al.*, 1993). Esta diferencia en los valores de pH óptimo entre la AAT medida *in vitro* y la producción de

ésteres resultante de experimentos *in vivo* podría provenir de que en el segundo caso se ponen en juego otras reacciones y procesos, como son la síntesis de los alcoholes y acetyl CoA, así como el transporte de los substratos al interior de las células. Por otra parte, la actividad AAT disminuyó hasta alcanzar el límite de detección *in vitro* a valores ácidos de pH, típicos de la pasta de aceituna, apuntando a que la actividad de esta enzima se encuentra seriamente restringida durante el proceso de elaboración del aceite de oliva, lo que contribuye al bajo contenido en ésteres del producto resultante.

### 3.6.4. Especificidad de substrato de la alcohol acetiltransferasa.

Un parámetro importante a la hora de justificar la composición de ésteres volátiles del aceite de oliva es la capacidad de la enzima AAT para utilizar como substrato diferentes alcoholes. Por ello, la AAT de aceituna fue ensayada con una gama de alcoholes desde uno hasta seis átomos de carbono, entre los que se incluyeron alcoholes ramificados (3-metilbutanol) y alcoholes procedentes de la degradación de ácido linoleico ó linolénico a través de la ruta de la LOX (hexanol, 2(E)-hexenol y 3(Z)-hexenol). Como se muestra en

**Tabla 3.19.** Especificidad de substrato de la AAT de pulpa de aceituna. Las actividades dadas son la media de dos determinaciones

Substrato	AAT (pkat/mg prot)	Actividad relativa (%)
Metanol	nd	0
Etanol	nd	0
Butanol	12±6	16±8
3-Metilbutanol	12±2	16±3
Hexanol	94±20	100±20
3(Z)-Hexenol	80±10	86±10
2(E)-Hexenol	42±2	45±3

nd: no detectado

la Tabla 3.19, la AAT mostró la máxima actividad con los substratos hexanol y 3(Z)-hexenol, actividades menores con el 2(E)-hexenol, butanol y 3-metilbutanol, y nulas para alcoholes más cortos como el etanol o metanol. Este perfil de especificidad es similar al encontrado en la enzima de fresa (Pérez *et al.*, 1993), en el cual el hexanol fue el substrato con el que la enzima mostró una mayor actividad, con la única diferencia de que en este caso los alcoholes insaturados C6 se mostraron como substratos muy pobres. Por otra parte, la especificidad de substrato de la AAT de aceituna da cuenta de la composición de ésteres volátiles del aceite de oliva virgen, en el cual predominan el acetato de hexilo y el acetato de 3(Z)-hexenilo (Morales *et al.*, 1995), ésteres derivados de los alcoholes con los que esta enzima mostró su actividad máxima. Sin embargo, la especificidad de la AAT no explica la biosíntesis del acetato de etilo, volátil comúnmente detectado en la fracción de ésteres del aroma del aceite de oliva virgen, lo que parece indicar que dicho compuesto es sintetizado a través de una ruta alternativa.

## **IV. CONCLUSIONES**

1.- La pulpa de aceituna posee las enzimas necesarias para la degradación de linoleato a través de la ruta de la lipoxigenasa. Los experimentos de marcaje con linoleato radiactivo mostraron que el sistema responsable de dicha degradación posee una clara especificidad para la producción de 13-hidroperóxidos (77%), así como especificidad estricta para la producción de ácido 12-oxo-9(Z)-dodecenoico y hexanal como únicos productos en las fracciones de oxoácidos y aldehidos volátiles. Por otra parte, la metabolización de linoleato marcado a través de la ruta de la lipoxigenasa en pulpa de aceituna se vio influenciada por el pH y la temperatura, produciéndose las máximas incorporaciones en productos de oxidación a pH 6,5 y 15°C.

2.- La actividad lipoxigenasa se concentró en las fracciones particuladas de la pulpa de aceituna, no detectándose niveles significativos de la misma en la fase soluble. Así mismo, esta enzima mostró un pH óptimo de 5,0, siendo dos veces más activa con el ácido linolénico que con el ácido linoleico. La lipoxigenasa de aceituna fue capaz, además, de oxidar a la dilinoleoil-fosfatidilcolina, aunque a una velocidad muy inferior a los correspondientes ácidos grasos no esterificados, resultado que parece indicar que es necesario el concurso de una acil-hidrolasa que suministre a la lipoxigenasa sus substratos específicos, los ácidos grasos poliinsaturados libres. Por otra parte, esta enzima mostró una temperatura óptima de 25 °C, con una clara preferencia para la producción de 13-hidroperóxidos (70-80%) a partir de los ácidos linoleico y linolénico.

3.- La hidropéroxido liasa de aceituna es una enzima unida membrana, que es preciso solubilizar con Tritón X-100 para su ensayo *in vitro*. Esta enzima se haya localizada en las fracciones de membrana de alta densidad de la pulpa de aceituna, siendo su nivel de actividad independiente del tejido (epicarpo o mesocarpo) empleado en la preparación. Este último resultado parece indicar que tal y como ocurre para otras fuentes, la hidropéroxido liasa se haya localizada en las membranas de los cloroplastos y plastos presentes en la pulpa de estos frutos.

Es de interés subrayar que, la hidropéroxido liasa de aceituna mostró su actividad máxima a una temperatura anormalmente baja, 15°C, resultado que explica que ésta sea la temperatura a la que se produce una mayor transformación del precursor en los

experimentos de marcaje.

4.- Dos hidropéroxido liasas de características similares fueron parcialmente purificadas a partir de la pulpa de aceituna por cromatografía de intercambio iónico e hidroxilapatito. Ambas mostraron su máxima actividad a pH 6,0, así como especificidad estricta hacia los 13(S)-ZE(Z)-hidropéroxidos. Por otra parte, estas enzimas se mostraron 2,5 veces más activas con el ácido 13(S)-ZEZ-hidropéroxilinoléico que con su homólogo el ácido 13(S)-ZE-hidropéroxilinoleico, exhibiendo parámetros cinéticos similares para ambos sustratos.

5.- La pulpa de aceituna posee actividad alcohol deshidrogenasa dependiente tanto de NAD como de NADP. Tres isoformas de esta enzima fueron parcialmente purificadas mediante cromatografías de intercambio iónico y afinidad a partir de la fracción soluble de la pulpa de estos frutos, dos de ellas dependientes de NADP, y una dependiente de NAD. Sobre la base de su nivel de actividad, así como su alta afinidad y especificidad hacia los aldehídos de seis átomos de carbono (hexanal y 2(E)-hexenal), se estableció que la isoforma llamada NADP-alcohol deshidrogenasa II es la realmente responsable de la biosíntesis de los alcoholes volátiles presentes en el aceite de oliva virgen. Dicha enzima mostró un pH óptimo de 8,5, con un máximo de actividad a las 25 semanas después de la floración.

6.- La actividad alcohol aciltransferasa fue detectada en preparaciones de la fracción soluble de la pulpa de aceitunas maduras. Esta enzima mostró un pH óptimo de 7,5, y baja afinidad por los sustratos hexanol y acetil-CoA. De entre los distintos sustratos con los que fue ensayada, la alcohol aciltransferasa de aceituna mostró su máxima actividad con los alcoholes de seis átomos de carbono hexanol y 3(Z)-hexenol, exhibiendo actividades más bajas con los de cadena más corta butanol y 3-metilbutanol, y nulas con el etanol y metanol.

7.- La regioespecificidad de la lipoxigenasa de pulpa de aceituna para producir mayoritariamente 13(S)-hidropéroxidos, junto con la especificidad estricta de la hidropéroxido liasa de dicha fuente para catalizar la lisis de los mismos, son la causa de que los aldehídos de seis átomos de carbono sean los principales componentes del aroma del aceite de oliva virgen. Por otra parte, la especificidad de sustrato de ambas enzimas,



explica la preponderancia de los hexenales sobre el hexanal dentro de la fracción de volátiles de dicho aceite.

8.- La especificidad de sustrato de las enzimas NADP-alcohol deshidrogenasa y alcohol aciltransferasa de la pulpa de aceituna da cuenta de la composición de alcoholes y ésteres volátiles del aceite de oliva virgen. Así, la primera mostró alta especificidad por el hexanal y el 2(E)-hexenal, mientras que la segunda lo hizo por el hexanol y el 3(Z)-hexenol. Como consecuencia, el hexanol, el 2(E)-hexenol, el acetato de hexilo y el acetato de 3-hexenilo son las especies predominantes en las fracciones de alcoholes y ésteres que forman parte del aroma del aceite de oliva virgen.

9.- La anómala curva de temperatura que mostró la enzima hidropéroxido liasa hace que la biosíntesis de volátiles por parte de la pulpa de aceituna se estimule a bajas temperaturas, mostrando su óptimo a 15°C, y se inhiba a temperaturas mayores de 25°C. Este fenómeno puede ser la causa de que una alta temperatura de batido durante el proceso de elaboración del aceite de oliva virgen produzca una pérdida de flavor en el producto final como consecuencia de la inhibición de la ruta de la ruta bioquímica productora de volátiles.

10.- La disminución de la concentración de aldehidos volátiles que se registra al emplear aceitunas de mayor grado de maduración como materia prima para la elaboración de aceite de oliva virgen, puede deberse a la disminución de la actividad lipoxigenasa que se produce a lo largo del desarrollo de estos frutos. Paralelamente, la disminución del contenido de alcoholes es atribuible además al descenso de la actividad NADP-alcohol deshidrogenasa II que se produce durante el proceso de senescencia de la aceituna.

11.- Sobre la base de los resultados obtenidos se infiere que los componentes mayoritarios del aroma del aceite de oliva (aldehidos, alcoholes y ésteres de alcoholes de seis átomos de carbono) son sintetizados a partir de ácidos grasos poliinsaturados a través de la ruta de la lipoxigenasa. Por tanto, la composición de la fracción de volátiles que confiere al aceite su característico aroma está fuertemente condicionada por las propiedades y nivel de actividad de las enzimas que forman parte de dicha ruta.

## **V. REFERENCIAS**

- Alba, J. (1997). Elaboración de aceite de oliva virgen. En: *El Cultivo del Olivo*. (Barranco, D., Fernández-Escobar, D. y Rallo, L. ed.), pp 509-539. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- André, T. E. y Hou, K.-W. (1932). The presence of a lipoid oxidase in soybean. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* **194**: 645-647.
- Andrianarison, R.-H., Beneyout, J.L. y Tixier, M (1989). An enzymatic conversion of lipoxygenase products by a hydroperoxide lyase in blue green algae (*Oscillatoria sp.*). *Plant Physiology* **91**: 1280-1287.
- Angerosa, F. (1998). Comunicación presentada durante la 4ª Reunión anual del proyecto AIR3-CT94-1967, Chania, Grecia..
- Aparicio, R. y Morales, M.T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 1116-1122.
- Axelrod, B. (1974). Lipoxygenases. *Advanced Chemical Series* **136**: 324-348.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M., Laaskso, S. (1981). Lipoxygenase from soybeans. En: *Methods in Enzymology*, Vol. 71. (Lowenstein, J.M. ed.), pp 441-451. Academic Press, New York.
- Bafor, M., Jonsson, L, Stobart, A. K. y Szymne, S. (1991). Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor bean endosperm. *Biochemical Journal* **280**: 507-514.
- Bafor, M., Jonsson, L, Stobart, A. K. y Szymne, S. (1993). Biosynthesis of vernoleate (*cis*-12-epoxyoctadeca-*cis*-9-enoate) in microsomal preparations from developing endosperm of *Euphorbia lagascae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **303**: 145-151.
- Bate, N.J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J.M.C., Thompson, J.E.y Rothstein, S.J. (1998). Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide

- lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiology* **117**: 1393-1400.
- Bell, E. y Mullet, J.E. (1993). Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* **103**: 1133-1137.
- Bell, E., Creelman, R.A. y Mullet, J.E. (1995) A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **92**: 8675-8679.
- Blée, E. (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research* **37**: 33-72.
- Blée, E. y Joyard, J. (1996). Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiology* **110**: 445-454.
- Blée, E. y Schuber, F. (1993). Biosynthesis of cutin monomers: involvement of a lipoxygenase / peroxygenase pathway. *The Plant Journal* **4**: 113-123.
- Bonnet, J.-L. y Crouzet, J. (1977) Lipoxygenase from tomato fruit: partial purification and study of some properties. *Journal of Food Science* **42**: 625-628.
- Bowsher, C. G., Ferrie, B. J. M., Ghosh, S., Todd, J., Thomson, J. E. y Rothstein, S. J. (1992). Purification and partial characterization of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. *Plant Physiology* **100**: 1802-1807.
- Boyes, S., Perera, C. y Young, H. (1992). Kiwi fruit lipoxygenase: preparation and characteristics. *Journal of Food Science* **57**: 1390-1394.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Bruinsma, J. (1961). A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochimica et Biophysica Acta* **52**: 576-578.

- Burns, D. D., Galliard, T. y Harwood, J. L. (1977). Catabolism of sulphoquinovosyl diacylglycerol by an enzyme preparation from *Phaseolus multiflorus*. *Phytochemistry* **16**: 651-654.
- Burns, D. D., Galliard, T. y Harwood, J. L. (1980). Properties of acyl hydrolase enzymes from *Phaseolus multiflorus* leaves. *Phytochemistry* **19**: 2281-2285.
- Chan, H. W. S. (1973). Soybean lipoxygenase. Iron-containing dioxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **327**: 32-35.
- Cohen, B.-S., Grossman, S., Pinsky, A. y Klein, B. P. (1984). Chlorophyll inhibition of lipoxygenase in growing pea plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **32**: 516-519.
- Creelman, R. A., Bell, E. y Mullet, J. E. (1992). Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* **99**: 1258-1260.
- Croft, K. P. C., Jüttner, F. y Slusarenko, A. J. (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *Plant Physiology* **101**: 13-24.
- Davies, D. D., Patil, K. D., Ugochukwu, E. N. y Towers, G. H. N. (1973). Aliphatic alcohol dehydrogenase from potato tubers. *Phytochemistry* **12**: 523-530.
- Davies, D. D., Patil, K. D., Ugochukwu, E. N. y Towers, G. H. N. (1973b). Aromatic alcohol dehydrogenase from potato tubers. *Phytochemistry* **12**: 531-536.
- Dirinck, P., Schereyen, L. y Schamp, N. M. (1977). Aroma quality evaluation of tomatoes, apples and strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**: 759-763.
- Dohi, T., Anamura, S., Shirakawa, M., Okamoto, H. y Tsujimoto, A. (1991). Inhibition of lipoxygenase by phenolic compounds. *Japanese Journal of Pharmacology* **55**: 547-550.

- Douce, R., Joyard, J., Block, M. y Dorne, A.J. (1990). Glycolipid analyses and synthesis in plastids. En: *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 4. (Harwood, J.L. y Bowyer, J.R. ed.) pp 71-105. Academic Press, Londres.
- Douillard, R. y Bergeron, E. (1978). Lipoxygenase activity of wheat shoot chloroplasts. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* **286**: 753-755.
- Drawert, F., Heimann, W., Emberger, R. y Tressl, R. (1966). Biogenesis of aroma compounds in plant and fruit. II. Enzymic formation of 2-hexen-1-al, hexanal, and their precursors. *Annals of Chemistry* **694**: 200-208.
- Droillard, M.-J., Rouet-Mayer, M.-A., Bureau, J.-M. y Lauriere, C. (1993). Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp. *Plant Physiology* **103**: 1211-1219.
- Dulley, J. R. y Grieve, P. A. (1975). Simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Analytical Biochemistry* **64**: 136-141.
- Ealing, P. M. (1994). Lipoxygenase activity in ripening tomato fruit pericarp tissue. *Phytochemistry* **36** : 547-552.
- Eskin, N. A. M., Grossman, S. y Pinsky, A. (1977). Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality. *Critical Review of Food Science and Nutrition* **9**: 1-41.
- Farmer, E. E. y Ryan, C. A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**: 129-134.
- Fauconnier, M. L. y Marlier, M. (1996). Purification of soybean lipoxygenase isoenzyme-1 and characterization of its inhibition by 13-hydroperoxides. *Grasas y Aceites* **47**: 242-246.

- Fellman, J.K., Mattinson, D.S., Bostick, B.C., Mattheis, J.P. y Patterson, M.E. (1993). Ester biosynthesis in "Rome" apples subjected to low-oxygen atmospheres. *Postharvest Biology and Technology* **3**: 201-214.
- Ferrie, B.J., Beaudoin, N., Burkhart, W., Bowsher y C.G., Rothstein, S. (1994). The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their diferencial expression during fruit ripening. *Plant Physiology* **106**: 109-118.
- Feussner, I. y Kindl, H. (1994). Particulate and soluble lipoxygenase isoenzymes. Comparison of molecular and enzymatic properties. *Planta* **194**: 22-28.
- Feussner, I., Hause, B., Nellen, A., Wasternack, C. y Kindl, H. (1996). Lipid-body lipoxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxygenase forms. *Planta* **198**: 288-293.
- Feussner, I., Kindl, H. y Kuehn, H. (1995). Oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* **92**: 11849-11853
- Fleming, H. P., Cobb, J. L., Etchells, J. L. y Bell, T. A. (1968). The formation of carbonyl compounds in cucumbers. *Journal of Food Science* **33**: 572-576.
- Funk, M. O., Andre, J. C. y Otsuki, T. (1987). Oxidation of trans polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase reveals steric features of the catalytic mechanism. *Biochemistry* **26**: 6880-6884.
- Galpin, J.R. y Allen, J.C. (1977) The influence of micelle formation on lipoxygenase kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta* **488**: 392-401.
- Galliard, T. y Chan, H. W. S. (1980). Lipoxygenases. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 4. (Stumpf, P. K. ed.), pp 131-161. Academic Press, New York.
- Galliard, T. y Phillips, D. R. (1971). Lipoxygenase from potato tubers. *Biochemical Journal* **124**: 431-438.

- Galliard, T. y Phillips, D. R. (1976). The enzymic cleavage of linoleic acid to C9 carbonyl fragments in extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and the possible role of lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **431**: 278-287.
- Galliard, T., Matthew, J. A., Fishwick, M. J. y Wright, J. (1976). The enzymic degradation of lipids resulting from physical disruption of cucumber fruit. *Phytochemistry* **15**: 1647-1650.
- Galliard, T., Phillips, D. R. y Reynolds, J. (1976b). The formation of *cis*-3-nonenal, *trans*-2-nonenal and hexanal from linoleic acid hydroperoxide isomers by a hydroperoxide cleavage enzyme system in cucumber fruits. *Biochimica et Biophysica Acta* **441**: 181-192.
- Gardner, H. W. (1989). Soybean lipoxygenase-1 enzymatically forms both 9(S)- and 13(S)- hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1001**: 274-281.
- Gardner, H. W. (1989b). How the lipoxygenase pathway affects the organoleptic properties of fresh fruits and vegetables. En: *Flavour Chemistry of Lipid Foods*. (Min, D. B. y Smouse, T. H. ed.), pp 98-112. American Oil Chemists Society, Champaign.
- Gardner, H. W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1084**: 221-239.
- Garssen, G. J., Vliegthart, J. F. G. y Bolding, J. (1971). An anaerobic reaction between lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxides. *Biochemical Journal* **122**: 327-332.
- Garssen, G. J., Vliegthart, J. F. G. y Bolding, J. (1972). The origin structures of dimeric fatty acids from the anaerobic reaction between soya-bean lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxide. *Biochemical Journal* **130**: 435-442.
- Grossman, S., Trop, M., Avtalion, R. y Pinsky, A. (1971). Egg plant lipoxygenase: isolation and partial characterization. *Lipids* **7**: 467-473.



- Hara, A. y Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry* **90**: 420-426.
- Harada, M., Ueda y. y Iwata, T. (1985). Purification and some properties of alcohol acetyltransferase from banana fruit. *Plant and Cell Physiology* **26**: 1067-1074.
- Hatanaka, A. (1993). The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry* **34**: 1201-1218.
- Hatanaka, A. y Harada, M. (1973). Formation of *cis*-3-hexenal, *trans*-2-hexenal and *cis*-3-hexenol in macerated *Thea sinensis* leaves. *Phytochemistry* **12**: 2341-2346.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T. y Sekiya, J. (1976). Biosynthesis of *trans*-2-hexenal in chloroplasts from *Thea sinensis*. *Phytochemistry* **15**: 1125-1126.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T. y Sekiya, J. (1976b). Seasonal variations in *trans*-2-hexenal and linolenic acid in homogenates of *Thea sinensis* leaves. *Phytochemistry* **15**: 1889-1891.
- Hatanaka, A., Sekiya, J. y Kajiwara, T. (1978). Distribution of an enzyme system producing *cis*-3-hexenal and *n*-hexenal from linolenic and linoleic acid in some plants. *Phytochemistry* **17**: 869-872.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T. y Koda, T. (1979). Specificity of enzyme system producing C<sub>6</sub>-aldehyde in tea chloroplasts. *Agricultural and Biological Chemistry* **43**: 2115-2117.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T., Sekiya, J. y Inouye, S. (1982). Solubilization and properties of the enzyme-cleaving 13-hydroperoxylinolenic acid in tea leaves. *Phytochemistry* **21**: 13-17.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T. y Sekiya, J. (1987). Biosynthetic pathway for C<sub>6</sub>-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chemistry and Physics of Lipids* **44**: 341-361.

- Hatanaka, A., Kajiwara, T., Matsui, K. y Matsunaga, T. (1989). Non-enzymatic isomerization of 12-hydroxy-3(Z)-dodecenal to the 2(E)-isomer after enzymatic cleavage of 13-hydroperoxylinoleil alcohol in tea chloroplasts. *Zeitschrift für Naturforschung* **44**: 161-164.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T., Horino, H. y Inokuchi, K. (1992). Odor-structure relationships in n-hexenols and n-hexenals. *Zeitschrift für Naturforschung* **47**: 183-189.
- Heitz, T., Bergey, D.R., Ryan, C.A. (1997) A gene encoding a chloroplastic-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* **114**: 1085-1093.
- Henderson, J. y Osborne, D. J. (1991). Lipase activity in ripening and mature fruit of the oil palm. Stability *in vivo* and *in vitro*. *Phytochemistry* **30**: 1073-1078.
- Hilbers, M. P., Kerkhoff, B., Finazzi-Agrò, A., Veldink, G. A. y Vliegenthart, J. F. G. (1995). Heterogeneity and developmental changes of lipoxygenases in etiolated lentil seedlings. *Plant Science* **111**: 169-180.
- Hildebrand, D. (1989). Lipoxygenases. *Physiologia Plantarum* **76**: 249-253.
- Hildebrand, D. y Hymowitz, T. (1983). Lipoxygenase activities in developing and germinating soybean seeds with and without lipoxygenase-1. *Botanic Gazette* **144**: 212-216.
- Hirayama, O., Matsuda, H., Takeda, H., Maenaka, K. y Takatsuka, H. (1975). Purification and properties of a lipid acyl-hydrolase from potato tubers. *Biochimica et Biophysica Acta* **384**: 127-137.
- Holtman, W. L., Van Duijn, G., Van Mechelen, J. R., Sedee, N. J. A., Douma, A. C., and Schmitt, N. (1997). Expression and substrate specificity of lipoxygenase isoenzymes of germinating barley. En: *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plants Lipids*. (Williams, J. P., Khan, M. U. y Lem, N. W. ed.), pp 284-286. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Huang, A. H. C. (1987). Lipases. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 9. (Stumpf, P. K. ed.), pp 91-119. Academic Press, New York.
- Jang, M. J. I., Cho y. y Lee, S. K. (1995). Characteristics and localization of lipoxygenase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit. *Han'guk Nonghwa Hakhoechi* **38**: 414-421.
- Jensen, A.B., Poca, E., Rigaud, M., Freyssinet, G. y Pagès, M. (1997). Molecular characterization of L2 lipoxygenase from maize embryos. *Plant Molecular Biology* **33**: 605-614.
- Jiang, Z.-Y., Woollard, A. C. S. y Wolff, S. P. (1991). Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26**: 853-856.
- Kim, I.-S. y Grosch, W. (1979). Partial purification of a lipoxygenase from apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **27**: 243-246.
- Kim, I.-S. y Grosch, W. (1981). Partial purification and properties of an hydroperoxide lyase from fruits of pear. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **29**: 1220-1225.
- Kindl, H. (1997). The oxygen-dependent modification of triacylglycerols and phospholipids, the different way of initiating lipid body mobilization. *Zeitschrift für Naturforschung* **52**: 1-8.
- Kiritsakis, A.K. (1994). El aceite de oliva. A. Madrid Vicente Ediciones, Madrid.
- Kondo y., Kawai y., Hayashi, T., Ohnishi, M., Miyazawa, T., Itoh, S. y Mizutani, J. (1993). Lipoxygenase in soybean seedlings catalyzes the oxygenation of phospholipid and such activity changes after treatment with fungal elicitor. *Biochimica et Biophysica Acta* **1170**: 301-306.
- Kondo y., Hashidoko y. y Mizutani, J. (1995). An enzymatic formation of 13-oxo-trideca-9,11-dienoic acid from 13-hydroperoxylinolenic acid by a homolytic hydroperoxide

- lyase in elicitor-treated soybean cotyledons. *Biochimica et Biophysica Acta* **1255**: 9-15.
- Langston, P. J., Pace, N. C. y Hart, G. E. (1980). Wheat alcohol dehydrogenase isoenzymes purification, characterization, and gene expression. *Plant Physiology* **65**: 518-522.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Fohling phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
- Macku, C. y Jennings, W. G. (1987). Production of volatiles by ripening banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35**: 845-848.
- Mancha, M. (1974). Fosfolípidos y glicolípidos de la pulpa de aceitunas maduras. *Grasas y Aceites* **25**: 159-164.
- Matsui, K., Kajiwara, T., Hayashi, K. y Hatanaka, A. (1988). Tissue specific heterogeneity of lipoxygenase in cucumber seedlings. *Agricultural and Biological Chemistry* **52**: 3219-3221.
- Matsui, K. y Kajiwara, T. (1995). Cucumber cotyledon lipoxygenase oxygenizes trilinolein at the lipid/water interface. *Lipids* **30**: 733-738.
- Matsui, K., Shibata y., Kajiwara, T. y Hatanaka, A. (1989). Separation of 13- and 9-hydroperoxide lyase activities in cotyledons of cucumber seedlings. *Zeitschrift für Naturforschung* **44**: 883-885.
- Matsui, K., Toyota, H., Kajiwara, T., Kakuno, T. y Hatanaka, A. (1991). Fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves. *Phytochemistry* **30**: 2109-2113.
- Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T. y Kajiwara, T. (1996). Bell peper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Letters* **394**: 21-24.

- Matsui, K., Shibata y., Tateba, H., Hatanaka, A. y Kajiwara, T. (1997). Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **61**: 199-201.
- Mauricio, J. C., Moreno, J. J., Valero, E. M., Zea, L., Medina, M. y Ortega, J. M. (1993). Ester formation and specific activities of *in vitro* alcohol acetyltransferase and esterase by *Sacharomyces cerevisiae* during grape must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**: 2086-2091.
- Minetoki, T., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Fujii, T. y Hamachi, M. (1993). The purification, properties and internal peptide sequences of alcohol acetyltransferase isolated from *Sacharomyces cerevisiae* Kyokai N° 7. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **57**: 2094-2098.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galan, M. y Garrido-Fernandez, J. (1993). Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. *Phytochemistry* **32**: 1103-1108.
- Mitchell, W. C. y Jelenkovic, G. (1995). Characterizing NAD- and NADP-dependent alcohol dehydrogenase enzymes of strawberries. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **120**: 789-801.
- Morales, M. T., Aparicio, R. y Rios, J. J. (1994). Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *Journal of Chromatography* **668**: 455-462.
- Morales, M. T., Alonso, M. V., Rios, J. J. y Aparicio, R. (1995). Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 2925-2931.
- Myers, M. J., Issenberg, P. y Wick, E. L. (1970). L-leucine as a precursor of isoamyl alcohol and isoamyl acetate, volatile aroma constituents of banana fruit discs. *Phytochemistry* **9** : 1693-1700.

- Nugteren, D. H. (1975). Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. *Biochimica et Biophysica Acta* **380** : 299-307.
- Ohta, H., Ida, S., Mikami, B. y Morita y. (1986). Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. *Plant and Cell Physiology* **27**: 911-918.
- Olías, J. M., Gutierrez, F., Dobarganes, M. C. y Gutierrez, R. (1980). Componentes volátiles en el aroma del aceite de oliva. IV. Su evolución e influencia en el aroma durante el proceso de maduración de los frutos en las variedades picual y hojiblanca. *Grasas y Aceites* **31**: 391-402.
- Olías, J. M., Ríos, J. J., Valle, M., Zamora, R., Sanz, C. y Axelrod, B. (1990). Fatty acid hydroperoxide lyase in germinating soybean seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**: 624-630.
- Olías, J. M., Pérez, A. G., Ríos, J. J. y Sanz, L. C. (1993). Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the "green" odour notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41** : 2368-2373.
- Parthier, B. (1991). Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and and few hypotheses on their actions. *Botanica Acta* **104**: 446-454.
- Peng y.-L., Shirano y., Ohta, H., Hibino, T., Tanaka, K., Shibata, D. (1994). A novel lipoxygenase from rice: primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 3755-3761.
- Pérez, A. G., Ríos, J. J., Sanz, C. y Olías, J. M. (1992). Aroma components and free amino acids in strawberry variety Chandler during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**: 2232-2235.
- Pérez, A. G., Sanz, C. y Olías, J. M. (1993). Partial purification and some properties of alcohol acyltransferase from strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**: 1462-1466.

- Phillips, D. R. y Galliard, T. (1978). Flavor biosynthesis. Partial purification and properties of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from fruits of cucumber. *Phytochemistry* **17**: 355-358.
- Phillips, D. R., Matthew, J. A., Reynolds, J. y Fenwick, G. R. (1979). Partial purification and properties of a *cis*-:*trans*-2-enal isomerase from cucumber fruit. *Phytochemistry* **18**: 401-404.
- Piazza, G. J. y Nuñez, A. (1995). Oxidation of acylglycerols and phosphoglycerides by soybean lipoxygenase. *Journal of the American Oil Chemists Society* **72**: 463-466.
- Piazza, G. J., Foglia, T. A. y Nuñez, A. (1996). Soybean lipoxygenase-promoted oxidation of free and esterified linoleic acid in presence of deoxycholate. *Journal of the American Oil Chemists Society* **73**: 1045-1049.
- Pinsky, A., Grossman, S. y Trop, M. (1971). Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables. *Journal of Food Science* **36**: 571-572.
- Privett, O. S., Nickell, C., Lundberg, W. O. y Boyer, P. D. (1955). Products of the lipoxidase-catalyzed oxidation of sodium linoleate. *Journal of the American Oil Chemists Society* **32**: 505-511.
- Ramadoss, C. S., Pistorius, E. K. y Axelrod, B. (1978). Coupled oxidation of carotene by lipoxygenase requires two isoenzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **190**: 549-552.
- Ranalli, A. y De Mattia, G. (1997). Characterization of olive oil produced with a new enzyme processing aid. *Journal of the American Oil Chemists Society* **74**: 1105-1113.
- Richard-Forget, F., Gaillard, F., Hugues, M., Jean-Marc, T., Boivin, P. y Nicolas, J. (1995). Inhibition of horse bean and germinated barley lipoxygenases by some phenolic compounds. *Journal of Food Science* **60**: 1325-1329.

- Riley, J. C. M., Willemot, C. y Thomson, J. E. (1996). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* **7**: 97-107.
- Robinson, D. S., Zecai, W., Domoney, C. y Casey, R. (1995). Lipoxygenase and the quality of foods. *Food Chemistry* **54**: 33-43.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Pérez, A.G., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S. y Sánchez-Serrano, J.J. (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 21012-21019.
- Roza, M. y Francke, A. (1973). Soybean lipoxygenase. Iron-containing enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* **327**: 24-31.
- Sachs, M. M., Freeling, M. y Okimoto, R. (1980). The anaerobic proteins in maize. *Cell* **20**: 761-767.
- Salch y. P., Grove, M. J., Takamura, H. y Gardner, H. W. (1995). Characterization of a C-5,13-cleaving enzyme of 13(S)-hydroperoxide of linolenic acid by soybean seed. *Plant Physiology* **108**: 1211-1218.
- Sánchez, J. (1994). Lipid photosynthesis in olive fruit. *Progress in Lipid Research* **33**: 97-104.
- Sánchez, J. y Harwood, J.L. (1992). Fatty acid synthesis in soluble fractions from olive (*Olea europaea*) fruits. *Journal of Plant Physiology* **140**: 402-408.
- Sanz, C., Pérez, A. G., Rios, J. J. y Olías, J. M. (1992). Physico-chemical properties of chickpea lipoxygenases. *Phytochemistry* **31**: 3381-3384.
- Scarpati, M. L., Lo Scalzo, R. y Vita, G. (1993). *Olea europaea* volatiles attractive and repellent to the olive fruit fly. *Journal of Chemical Ecology* **19**: 881-891.



- Schewe, T., Halangk, W., Hiebsch, C. y Rapoport, S. M. (1975). A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *Advances in Enzimology and Molecular Biology* **58**: 191-272.
- Schlenk, H. y Gellerman, J. L. (1960). Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. *Analytical Biochemistry* **32**: 1412-1414.
- Schreier, P. y Lorenz, G. (1982). Separation, partial purification and characterization of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from apple and tomato fruits. *Zeitschrift für Naturforschung* **37**: 165-173.
- Sekiya, J., Kajiwara, T., Munechita, K. y Hatanaka, A. (1983). Distribution of lipoxygenase and hydroperoxide lyase in the leaves of various plant species. *Phytochemistry* **22**: 1867-1869.
- Sekiya, J., Tanigawa, S., Kajiwara, T. y Hatanaka, A. (1984). Fatty acid hydroperoxide lyase in tobacco cells cultured in vitro. *Phytochemistry* **23**: 2439-2443.
- Seo, S., Sano, H. y Ohashi y. (1997) Jasmonic acid in wound signal transduction pathways. *Physiologia Plantarum* **101**: 740-745.
- Shibata, D., Steczko, J., Dixon, J. E., Hermodson, M. yazdanparast, R. y Axelrod, B. (1987). Primary structure of soybean lipoxygenase-1. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 10080-10085.
- Shibata, D., Steczko, J., Dixon, J. E., Andrews, P. C., Hermodson, M. y Axelrod, B. (1988). Primary structure of soybean lipoxygenase 2. *The Journal of Biological Chemistry* **263**: 6816-6821.
- Shibata, D., Slusarenko, A., Casey, R., Hildebrand, D. y Bell, E. (1994). Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**: S41-S42.
- Shibata Y., Matsui, K., Kajiwara, T. y Hatanaka, A. (1995). Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruit. *Plant and Cell Physiology* **36**: 147-156.

- Shibata Y., Matsui, K., Kajiwara, T. y Hatanaka, A. (1995b). Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **207**: 438-443.
- Siedow, J. N. (1991). Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 145-188.
- Smith, J., Linforth, R. y Tucker, G. A. (1997). Soluble lipoxygenase isoforms from tomato fruit. *Phytochemistry* **45**: 453-458.
- Song, W. C. y Brash, A. R. (1991). Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Science* **253**: 781-784.
- Stallings, W. C., Kroa, B. A., Carroll, R. T., Metzger, A. L. y Funk, M. O. (1990). Crystallization and preliminary X-ray characterization of a soybean seed lipoxygenase. *Journal of Molecular Biology* **211**: 685-687.
- Steczko, J., Muchmore, C. R., Smith, J. L. y Axelrod, B. (1990). Crystallization and preliminary X-ray investigation of lipoxygenase-1 from soybean. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 11352-11354.
- Sumner, J. B. y Sumner, R. J. (1940). The coupled oxidation of carotene and fat by carotene oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **134**: 531-533.
- Tappel, A.L. (1962) Lipoxidase. En: *Methods in Enzymology*, Vol. V. (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. ed.), pp 539-542. Academic Press, New York.
- Theorell, H., Holman, R. T. y Akeson, A. (1947). Crystalline lipoxidase. *Acta Chemica Scandinavica* **1**: 571-576.
- Tihanyi, K., Talbot, B., Brzezinski, R. y Thirion, J.-P. (1988). Purification and characterization of alcohol dehydrogenase from soybean. *Phytochemistry* **28**: 1335-1338.

- Todd, J. F., Paliyah, G. y Thomson, J. E. (1990). Characteristics of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. *Plant Physiology* **94**: 1225-1232.
- Tressl, R. y Drawert, F. (1973). Biogenesis of banana volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **21**: 560-565.
- Ueda y y Ogata, K (1977). Coenzyme A-dependent esterification of alcohols and acids in separated cells of banana pulp and its homogenate. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **24**: 624-630.
- Veldink, G. A., Vliegthart, J. F. G. y Bolding, J. (1977). Plant lipoxygenases. *Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids* **15**: 131-166.
- Vernooy-Guerritsen, M., Bos, A. L. M., Veldink, G. A. y Vliegthart, J. F. G. (1983). Localization of lipoxygenases 1 and 2 in germinating soybean by an indirect immunofluorescence technique. *Plant Physiology* **73**: 262-267.
- Vick, B. A. (1993). Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway. En: *Lipid Metabolism in Plants*. (Moore, T. S. J. ed.), pp 167-191. CNR, Boca Raton.
- Vick, B. A. y Zimmerman, D. C. (1976). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings. *Plant Physiology* **57**: 780-788.
- Vick, B. A. and Zimmerman, D. C. (1987). Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. En: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 9. (Stumpf, P. K. ed.), pp 53-90. Academic Press, New York.
- Vick, B. A. y Zimmerman, D. C. (1989). Methabolism of fatty acid hydroperoxides by *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiology* **90**: 125-132.
- Vioque, E. (1969). The determination of the geometrical configuration of epoxides. *Journal of Chromatography* **39**: 235-237.
- Vioque, E. y Maza, M. P. (1973). Glicolípidos de la aceituna. *Grasas y Aceites* **24**: 226-235.

*Biosíntesis del Aroma del Aceite de Oliva*

- Wardale, D. A. y Galliard, T. (1977). Further studies on the subcellular localization of lipid-degrading enzymes. *Phytochemistry* **16**: 333-338.
- Wardale, D. A. y Lambert, E. A. (1980). Lipoxygenase from cucumber fruit: localization and properties. *Phytochemistry* **19**: 1013-1016.
- Wardale, D. A., Lambert, E. A. y Galliard, T. (1978). Localization of fatty acid hydroperoxide cleavage activity in membranes of cucumber fruits. *Phytochemistry* **17**: 205-212.
- Yamakawa y., Goto, S. y Yokotsuda, I. (1978). Fractionation and some properties of acetic-ester synthesizing enzyme from *Cladosporium cladosporioides*. *Agricultural and Biological Chemistry* **42**: 269-274.
- Yamashita, I., Nemoto y. y Yoshikawa, S. (1976). Formation of volatile alcohols and esters from aldehydes in strawberries. *Phytochemistry* **15**: 1633-1637.
- Yamashita, I., Iino, K., Nemoto y. y Yoshikawa, S. (1977). Studies on flavor development in strawberries. 4. Biosynthesis of volatile alcohols and esters from aldehyde during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**: 1165-1168.
- Yoon, S. y Klein, B. P. (1979). Some properties of pea lipoxygenase isoenzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **27**: 955-962.
- Yoshioka, K. y Hashimoto, N. (1981). Ester formation by alcohol acyltransferase from brewer's yeast. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**: 2183-2190.
- Zamora, R., Ollas, J.M., Mesías, J.L. (1987). Purification and characterization of tomato lipoxygenase. *Phytochemistry* **26**: 345-347.
- Zimmerman, D. C. y Coudron, C. A. (1979). Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-dodecanoic acid. *Plant Physiology* **63**: 536-541.

*Loguero, S. Salas, Abigail*  
*Rub. de la lipoxygenase en acetona: contribución a la biosíntesis del aroma del aceite de oliva*

16 Marzo 1999

El Vocal: *[Signature]*  
El Vocal: *[Signature]*  
El Vocal: *[Signature]*

*[Signature]*  
*[Signature]*  
*[Signature]*



\* 5 0 1 1 6 8 3 5 4 \*

FQU IT/717