ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2006, 2 (47), 29 - 45

BARBARA M. BARANIAK, URSZULA SZYMANOWSKA

LIPOOKSYGENAZA W ŻYWNOŚCI POCHODZENIA ROŚLINNEGO

S t r e s z c z e n i e

Lipooksygenaza (EC. 1.13.11.12, linoleinian : tlen oksydoreduktaza) jest dioksygenazą zawierającą żelazo, która katalizuje utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i estrów o układzie cis,cis-1,4-pentadienu. Głównymi produktami reakcji są sprzężone nienasycone kwasy tłuszczowe i wodoronadtlenki. Generowane przez lipooksygenazę wodoronadtlenki stanowią substraty działania kolejnych enzymów, takich jak: liazy, izomerazy wodoronadtlenkowe, peroksygenazy czy tlenowe syntetazy allenylowe. Początkowe produkty działania lipooksygenazy mogą być degradowane do różnych związków, włączając aldehydy, ketony, alkohole i charakterystyczne związki zapachowe. Lipooksygenazy (LOX) mogą również katalizować proces współutleniania karotenoidów, łącznie z β-karotenem, co powoduje straty niezbędnych składników odżywczych i powstawanie niekorzystnego aromatu. Lipooksygenazy identyfikowano w różnych organach roślinnych. Białka roślinnych LOX składają się z pojedynczego łańcucha o masie molekularnej około $75–100 \cdot 10^3$ Da. Fizjologiczne znaczenie lipooksygenaz roślinnych nie jest w pełni wyjaśnione, pomimo istnienia dowodów wskazujących na ich znaczenie w reakcji odpowiedzi na zranienia i inne stresy (np. susza czy atak szkodników-patogenów), ponieważ lipooksygenazy są obecne w biosyntetycznym szlaku powstawania regulatorów, takich jak kwas abscysynowy czy jasmonian metylu. Działanie lipooksygenaz jest pierwszym etapem w procesie powstawania licznych związków barwnych i aromatów. Zainteresowanie lipooksygenazami ze strony technologów żywności wynika z ich zdolności wytwarzania wolnych rodników i nadtlenków, które biorą udział w procesie utleniania witamin, barwników, związków fenolowych i białek.

Słowa kluczowe: budowa lipooksygenazy, mechanizm działania, produkty utleniania kwasów tłuszczowych

Wstęp

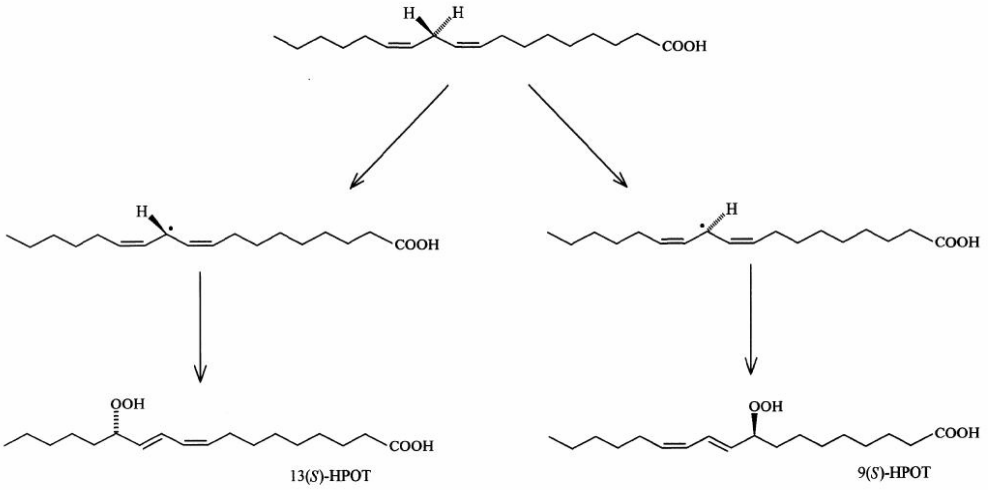
Lipooksygenaza (LOX, EC. 1.13.11.12) jest enzymem z klasy oksydoreduktaz, występującym powszechnie we wszystkich organizmach roślinnych i zwierzęcych [11, 28, 29, 30, 34, 35, 45, 57, 61, 70, 73, 84, 89, 96]. Lipooksygenazy należą do podklasy dioksygenaz, enzymów które katalizują reakcję utleniania wolnych lub zestryfikowanych polienowych kwasów nienasyconych do wodoronadtlenków (rys. 1).

Prof. dr hab. B M. Baraniak, mgr U. Szymanowska, Katedra Biochemii i Chemii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii, Akademia Rolnicza, ul. Skromna 8, 20-950 Lublin, e-mail: barbara.baraniak@ar.lublin.pl

Roślinne lipooksygenazy badane są od kilkudziesięciu lat – w literaturze najwięcej prac dotyczy lipooksygenazy występującej w nasionach soi [8, 19, 26, 44, 50, 71], ale charakteryzowane są również występujące w ziemniakach [72, 77], grochu [12, 18, 65], oliwkach [94], fasoli [97,98], łubinie [60, 99], pomidorach [33, 76, 79, 82], ogórkach [90], oberżynie [54, 59], dyni [42], słoneczniku [42, 67], brokułach [4, 86] i innych roślinach [7, 38, 39, 62, 80]. W niniejszej pracy dokonano przeglądu budowy i działania poznanych lipooksygenaz pochodzenia roślinnego.

Budowa roślinnych lipooksygenaz

W 1947 r. Theorell i wsp. [81] wyizolowali homogenny enzym z nasion soi i wykazali obecność grupy prostetycznej lub jonu metalu. Ponad 25 lat późnej, w 1973 r. badania Chan [17] potwierdziły występowanie jonu żelaza. Obecnie wiadomo, że lipooksygenazy zbudowane są z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie od $75\text{-}100 \cdot 10^3$ Da, pofałdowanego w taki sposób, że mają one krótką domenę N-końcową β-cylindryczną i dłuższą domenę helikalną otaczającą pojedynczy atom niehemowego żelaza.



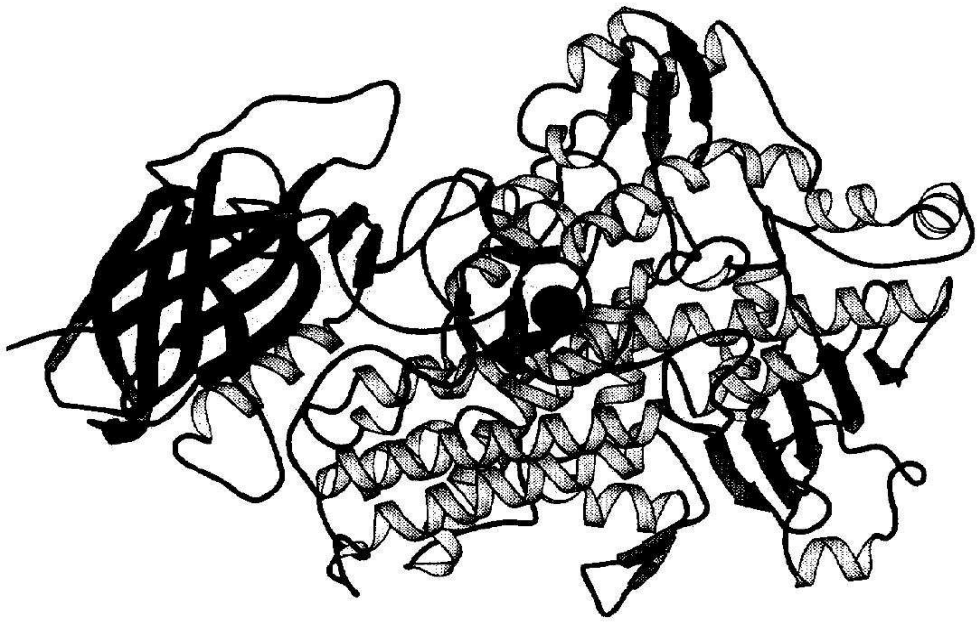
Rys. 1. Utlenianie kwasu linolowego do 9- i 13- hydroksynadtlenków pod wpływem katalitycznego oddziaływania lipooksygenazy (LOX).
Fig. 1. Catalytic lipoxygenase (LOX) effect on oxygenation of linoleic acid into 9- and 13- hydroperoxides.
Źródło: / Source: [32]. Przedruk za pozwoleniem Elsevier / Reprinted with permission from Elsevier

W nasionach soi lipooksygenazy występują w formach trzech izoenzymów LOX-1, LOX-2 i LOX-3, różniących się specyficznością substratową, optimum pH, punktem izoelektrycznym i stabilnością termiczną. Podzielone są na dwie grupy: do pierwszej zalicza się te lipooksygenazy, które, tak jak LOX-1, są aktywne w środowisku alkalicznym o pH ok. 9,0, a produktami ich działania są głównie 13-hydroksynadtlenki, druga grupa izoenzymów, tak jak LOX-2 i LOX-3, jest

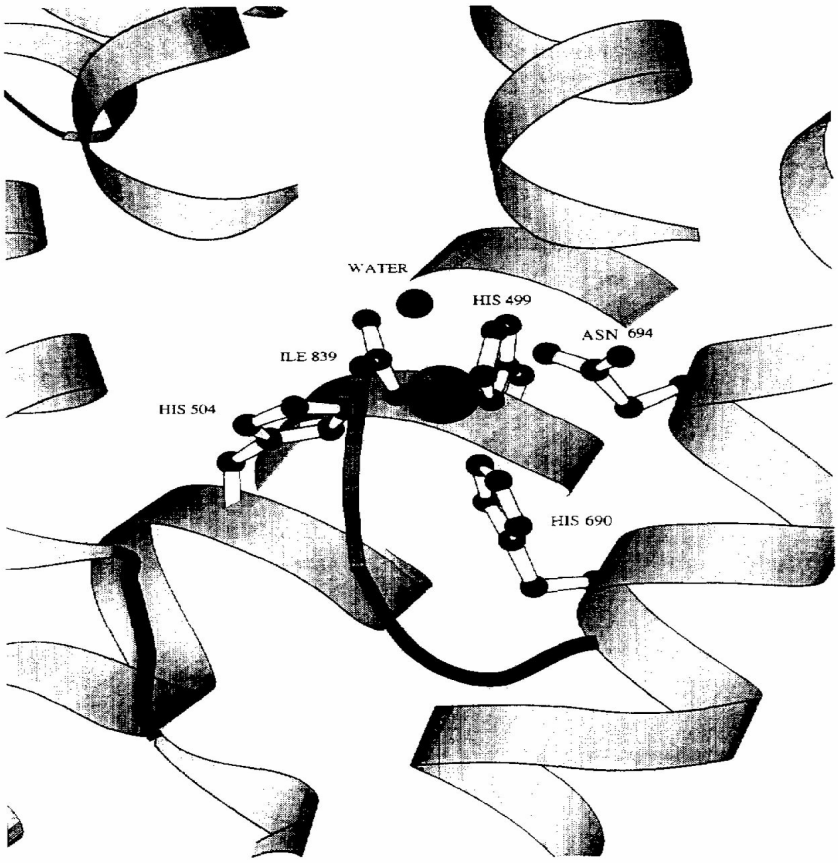
najaktywniejsza w środowisku obojętnym (pH ok.7,0), a produktami ich działania są równe ilości 9- i 13-hydroksynadtlenków [48, 50].

Niemniej jednak to lipooksygenaza-1 z nasion soi, oznaczana często w literaturze jako SBL1, SLO-1, jest najczęściej stosowanym, najlepszym modelem w badaniach nad budową i działaniem innych lipooksygenaz. Wynika to z faktu, że może być relatywnie łatwo wyizolowana i oczyszczona w stosunkowo dużych ilościach i jest wystarczająco stabilna. Dodatkowo kodujące ją DNA może być klonowane i sekwencjonowane, a białko może być syntetyzowane przez bakterie. Strukturę lipooksygenazy-1 badano metodami spektroskopowymi, magnetycznymi, dyfrakcji promieniowania X, które pozwoliły na ustalenie jej trzeciorzędowej struktury [10, 22, 24, 28, 46, 47, 56, 63, 71, 78, 87, 91, 85].

Trzeciorzędową strukturę lipooksygenazy-1 z nasion soi, wg Shibata i Axelord [70], przedstawiono na rys. 2., a szczegółowy obraz centrum aktywnego tego enzymu na rys. 3.



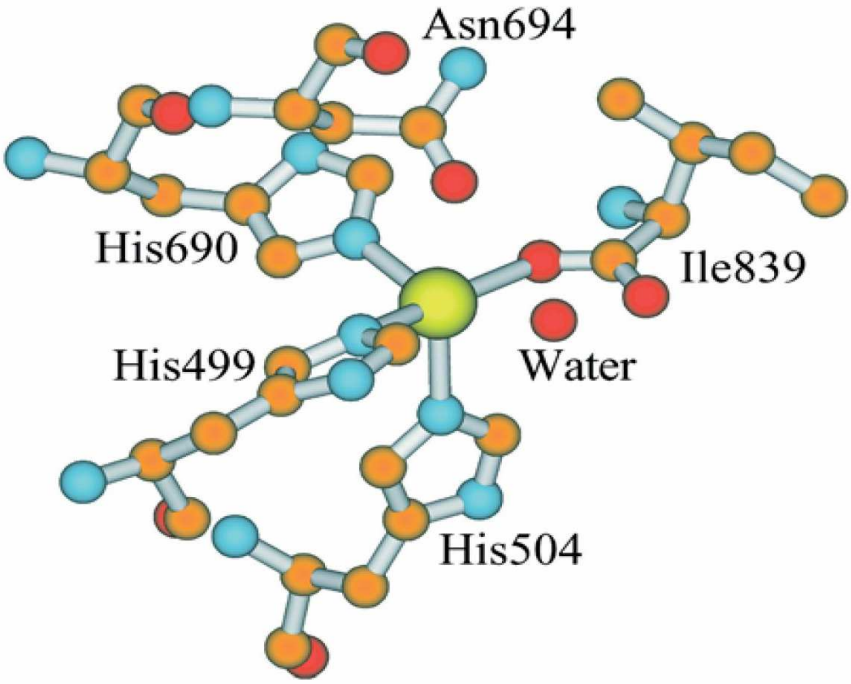
Rys. 2. Model lipooksygenazy L-1 z soi (kula obrazuje atom żelaza)
Fig. 2. Model of soybean lipoxygenase L-1 (the ball represents the iron atom)
Źródło: / Source: [70]. Przedruk za pozwoleniem Elsevier / Reprinted with permission from Elsevier



Rys. 3. Szczegółowy obraz centrum aktywnego lipooksygenazy L-1 z soi.
Fig. 3. Detailed view of the active center of soybean lipoxygenase L-1.
Źródło: / Source: [70]. Przedruk za pozwoleniem Elsevier / Reprinted with permission from Elsevier

Masa cząsteczkowa enzymu wynosi $95 \cdot 10^3$ Da, a zbudowany jest on z 839 reszt aminokwasowych, zorganizowanych w dwie domeny: domena I zawierająca 146 reszt i N-końcowy aminokwas i domena II zbudowana z 693 reszt i z C-końcowym aminokwasem. Udział struktury helikalnej stanowi 38,0%, natomiast β-harmonijki 13,9% [52, 63]. Domena I zbudowana jest z ośmiu antyrównoległych łańcuchów, których hydrofobowe reszty, najczęściej aromatyczne, upakowane są wewnątrz cylindra. Główną domeną białka enzymatycznego jest domena II, zbudowana z 23 heliks i dwóch antyrównoległych β-harmonijek, ułożonych płasko na powierzchni po przeciwnej stronie domeny. Siedemnaście łańcuchów heliksalnych ułożonych względem siebie równolegle lub antyrównolegle otacza centralny heliks, zbudowany z 43 reszt aminokwasowych. W przeciwieństwie do innych domen o podobnych rozmiarach, centralny heliks nie jest hydrofobowy. W centrum domeny znajduje się

atom żelaza. Żelazo jest skoordynowane z pięcioma endogennymi ligandami i z jednym egzogennym.



Rys. 4. Centrum aktywne lipooksygenazy L-1 i lipooksygenazy L-2 z nasion soi.
Fig. 4. The active center of lipoxygenase L-1 and lipoxygenase L-2 from soybean.
Źródło: / Source: [58]. Przedruk za pozwoleniem Springer Sciences and Business Media / Reprinted with permission from Springer Sciences and Business Media

Endogennymi ligandami enzymów z nasion soi (rys. 4), zarówno formy LOX-1, jak i LOX-2 są trzy histydyny: His 499, His 504 i His 690, przy czym dwa wiązania żelazo-azot (z His 504 i His 690) tworzą z płaszczyzną pierścienia imidazolowego kąt 120°, natomiast trzecie wiązanie z His 499 tworzy kąt 33,0° z pierścieniem imidazolowym, co sugeruje hybrydyzację sp^3 atomu azotu [63]. Czwarte miejsce koordynacyjne żelaza jest związane z tlenem z grupy karboksylowej izoleucyny 839, piąte, leżące naprzeciwko związania His 504, zajmuje Asn 694 związana poprzez tlen i jest to wiązanie zdecydowanie dłuższe od pozostałych. Szóste miejsce koordynacyjne, położone naprzeciw His 690 jest miejscem wiązania cząsteczki wody, która ma kluczowe znaczenie dla aktywności katalitycznej enzymu. Enzym zawierający żelazo na drugim stopniu utlenienia stanowi nieaktywną formę, ulega natomiast aktywacji po przejściu w Fe^{+3} pod wpływem tlenu. W tej aktywnej formie woda jest związana z Fe^{+3} w postaci grup hydroksylowych.

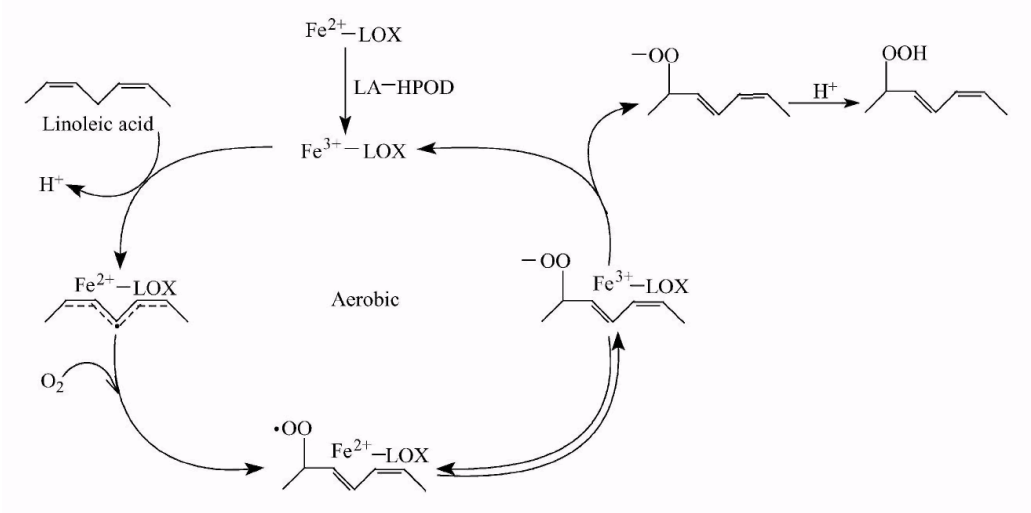
Lipooksygenaza-3 wykazuje duże podobieństwo do lipooksygenazy-1 – w 72% ma taką samą sekwencję jak lipooksygenaza-1. Zbudowana jest z 857 aminokwasów, a jej masa cząsteczkowa wynosi $97 \cdot 10^3$ Da.

Główne różnice pomiędzy LOX-1 i LOX-3 polegają na tym, że LOX-3 ma trzy wgłębienia (podczas gdy LOX-1 dwa), a w centrum katalitycznym znajduje się His 518, His 523, His 709, Ile 857 i Asn 713 [75].

Działanie lipooksygenaz

Proces katalizowany przez lipooksygenazy przebiega w trzech zasadniczych etapach [32]:

1) stereospecyficzne oderwanie wodoru od grupy metylenowej położonej pomiędzy podwójnymi wiązaniami i utworzenie rodnika kwasu tłuszczowego,
2) rekombinacja rodników w skoniugowane dieny,
3) sterospecyficzne przyłączenie cząsteczki tlenu i utworzenie rodników nadtlenkowych.



Rys. 5. Schemat aerobowego utleniania kwasu linolowego przez lipooksygenazę.
Fig. 5. Aerobic oxidation scheme of linoleic acid by lipoxygenase.
Źródło: / Source: [14]. Przedruk za pozwoleniem Elsevier / Reprinted from permission from Elsevier

Pierwszy etap limituje szybkość całego procesu katalizy. Wszystkie znane roślinne lipooksygenazy atakują centrum prochiralne C-11 kwasu linolowego lub linolenowego (rys. 5). W etapie drugim rodniki ulegają izomeryzacji do rodników allilowych, w zależności od specyficzności lipooksygenazy. W mechanizmie działania lipooksygenaz istotnym elementem jest nieodwracalny, kanałowy transfer wodoru [14, 41, 55, 74, 83], który przebiega w dwóch nierozdzielnych etapach: pierwszy to przejście wodoru z substratu do enzymu, w drugim etapie elektron z wodoru

transferowany jest do jonu żelaza trójwartościowego, który po jego przyłączeniu przechodzi na drugi stopień utlenienia.

Nomenklatura roślinnych lipooksygenaz

Nomenklaturę lipooksygenaz występujących u ssaków utworzono, uwzględniając specyficzność ich oddziaływań w stosunku do czterech podwójnych wiązań kwasu arachidonowego, występujących w różnym położeniu (Δ6,9,12,15 lub ω5,8,11,14) – wyróżniane są 5-, 8-, 9-, 11-, 12- i 15-LOX, dodatkowo większość z nich wykazuje stereospecyficzność i znane są lipooksygenazy działające na to samo wiązanie, ale z odmienną stereospecyficznością. Jednak większość zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych lipooksygenaz to S-lipooksygenazy, które włączają selektywnie tlen do pośrednich rodników mających konfiguracje S. Niektórzy autorzy proponują nomenklaturę roślinnych lipooksygenaz analogiczną do lipooksygenaz zwierzęcych – wówczas LOX-1 nosiłaby nazwę arachidonowa 15-lipooksygenaza. Z uwagi na fakt, że w roślinach występuje również kwas arachidonowy, stosowanie takiego nazewnictwa może powodować pewną niejednoznaczność. Proponowana przez Shabata i wsp. [70] klasyfikacja genów roślinnych lipooksygenaz dzieli je na dwie kategorie uwzględniające bardziej strukturę kodowanych białek niż ich właściwości enzymatyczne.

Zgodnie z rekomendacją Komisji do Spraw Nomenklatury Genów Roślinnych Międzynarodowego Towarzystwa Biologii Molekularnej Roślin pierwsza rodzina genów nazwana jest *Lox1* a druga *Lox2*. Większość poznanych lipooksygenaz roślinnych należy do grupy pierwszej.

Nomenklatura lipooksygenaz roślinnych uwzględnia również ich podobieństwo do dwóch izomerów lipooksygenazy z nasion soi: L-1 i L-2 i wyodrębnieniu dwóch grup „typu 1" i „typu 2". Izomery te różnią się optimum pH działania, natomiast mają zbliżoną sekwencję aminokwasów. Coraz częściej stosowane jest nazewnictwo związane z produktami ich specyficzności substratowej 9- lub 13-hydroksynadtlenków.

Liczne dane literaturowe dowodzą, że różnorodne stresy, jakim może podlegać roślina – deficyt wody, temperatura (zarówno niska, jak i wysoka), promieniowanie ultrafioletowe, uszkodzenia mechaniczne, infekcje czy działanie ozonu – aktywują działanie lipooksygenaz, jak również indukują ekspresję ich genów. Są więc specyficznymi metabolitami wtórnymi, powstającymi w roślinach w odpowiedzi na stresy [6, 32, 51].

Produkty działania lipooksygenazy: hydroksynadtlenki i hydroksypochodne kwasu linolowego i linolenowego charakteryzują się specyficzną aktywnością: antybakteryjną, antygrzybową czy inhibicyjną w stosunku do wybranych enzymów, również w organizmach zwierzęcych. Dowiedziono, że 13(S) hydroksynadtlenki kwasu linolenowego aktywują syntezę inhibitorów proteaz w uszkodzonych roślinach, natomiast izomery 9(S)- są toksyczne dla patogenów roślinnych, podobnie jak kwas

9(S)- i 13(S)- hydroksylinolowy. Ta ostatnia pochodna indukuje cyklazę adenylanową w ludzkich płytkach i komórkach śródbłonowych, hamuje agregację płytek krwi, moduluje degranulację ludzkich leukocytów, cechujących się różnokształtnością jąder komórkowych [20, 23, 32, 49, 62].

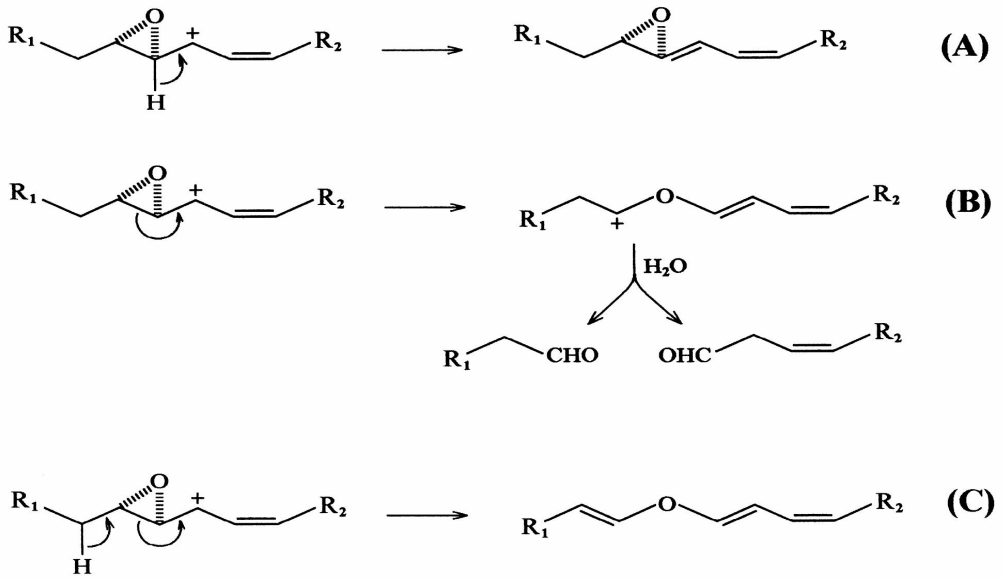
Tabela 1

Rekombinowane roślinne lipooksygenazy produkowane przez *Escherischia coli* i drożdże.
Recombinant plant lipoxygenases produced by *Escherischia coli* and yeast.

Źródło Source	Nazwa izoenzymu Designation	Aktywność Activity	EMBL	Proponowana nazwa New designation
Nasiona soi Soybean seed	LOX-1	13	J02795	Soja 13 LOX Soybean 13 LOX
Nasiona soi Soybean seed	LOX-3	9/13	X06928	Soja 9/13 LOX Soybean 9/13 LOX
Nasiona grochu Pea seed	LOX-3	9/13	X07807	Groch 9/13 LOX Pea 9/13 LOX
Nasiona grochu Pea seed	LOX-2	13/9	X17061	Groch 13/9 LOX Pea 13/9 LOX
Nasiona jęczmienia Barley seed	LOX-2	13/9	U56406	Jęczmień 13/9 LOX Barley 13/9 LOX
Bulwa ziemniaka Potato tuber	T8	9	X95513	Ziemniak 9 LOX Potato 9 LOX
Bulwa ziemniaka Potato tuber	L1	9/13	AF039651	Ziemniak 9/13 LOX Potato 9/13 LOX
Bulwa ziemniaka Potato tuber	LOX1:St:2	13/9	Y18548	Ziemniak 13/9 LOX Potato 13/9 LOX
Liść ziemniaka Potato leaf	H1	13	X96405	Ziemniak 13 LOX1 Poatao 13 LOX1
Liść ziemniaka Potato Leaf	H3	13	X96406	Ziemniak 13 LOX2 Potato 13 LOX2

Źródło: / Source: [16]

Pierwotne produkty utleniania powstające w reakcjach katalizowanych przez lipooksygenazy są substratami działania kolejnych enzymów, takich jak: liazy, izomerazy i dehydrogenazy hydronadtlenków czy peroksygenazy, które przekształcają je w aldehydy, ketony, estry. Produkty utleniania noszą nazwę „oksytłuszczów" lub „oktadekanoidów". Przypuszcza się, że kluczową rolę w enzymatycznym przekształcaniu hydroksynadtlenków kwasów tłuszczowych odgrywa przemiana, jakiej ulega pośredni kation epoksyallilowy [30, 32].



Rys. 6. Proponowany mechanizm reakcji AOS (oksysyntaza allenylowa) (A), HPL (hydroperoksy-liaza) (B) i DES (syntaza eteru diwinylowego) (C), włączając wspólny pośredni kation epoksyallilowy.
Fig. 6. The proposed mechanisms of AOS (allene oxide synhase) (A), HPL (hydroperoxide lyase) (B), DES (divinyl ether synthase) (C), including the common epoxyallyl cation intermediate.
Źródło: / Source: [32]. Przedruk za pozwoleniem Elsevier / Reprinted with permission from Elsevier.

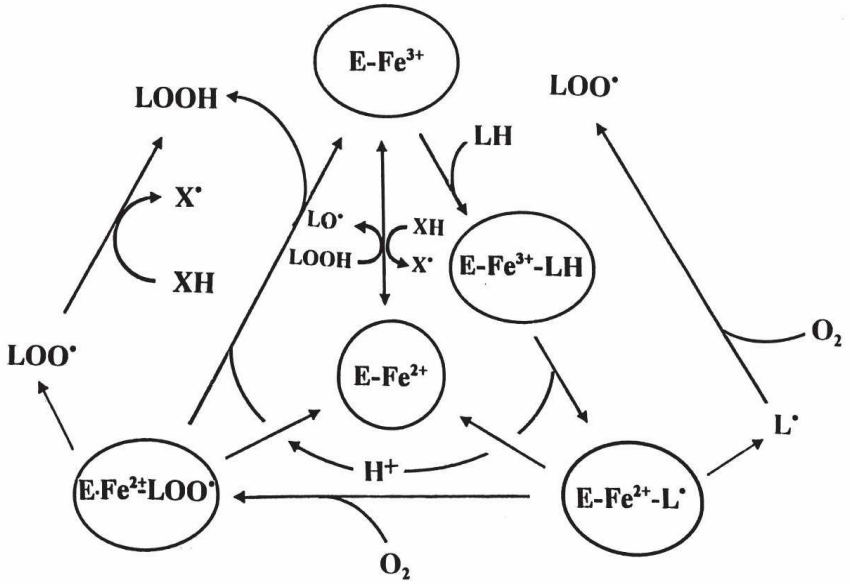
Rola roślinnych lipooksygenaz

Pośrednie produkty powstałe w wyniku działania lipooksygenazy mogą ulegać cyklizacji w wyniku działania cyklooksygenazy allenylowej (AOC – allene oxide cyclase) i ten szlak przemian prowadzi do powstania w roślinach kwasu jasmonowego i jego pochodnych, pełniących funkcję hormonów roślinnych [16, 32].

Stwierdzono istotną rolę lipooksygenaz w przemianach metabolicznych ksenobiotyków. Ksenobiotyki, takie jak: 4-aminobifenyl, 2-aminofluoren (aminofluoren), 1,2-dimetylohydrazyna, benzydyna i jej pochodne, akryloamidy mogą być deaktywowane drogą reakcji utleniania, odsiarczania, dearylacji, dealkilacji czy sulfooksydacji. Lipooksygenazy działają w tym procesie jako ko-oksydanty [36, 43, 53, 64, 68].

Ważna jest rola lipooksygenaz w procesie kiełkowania nasion. Feusner i wsp. [25], uwzględniając również wyniki badań innych uczonych, proponują nowy model mechanizmu uruchamiania zapasowych lipidów w nasionach roślin oleistych. Według tego modelu, LOX katalizuje utlenianie nienasyconych kwasów związanych estrowo w tłuszczach i proces ten poprzedza ich lipolizę. Uwolnione pod wpływem działania lipaz hydronadtlenki kwasów tłuszczowych są redukowane do hydroksypochodnych,

które po aktywacji acetylo-CoA ulegają dalszym przemianom katabolicznym w procesie β-oksydacji.



Rys. 7. Schematyczne przedstawienie diutleniania kwasów tłuszczowych (LH) i współutleniania ksenobiotyków (XH) przez lipooksygenazę (E).
Fig. 7. Schematic representation of dioxygenation of fatty acids (LH) and co-oxidation of xenobiotic (XH) by lipoxygenase (E).
Źródło: / Source: [43]. Przedruk za pozwoleniem Birkhäuser Verlag. / Reprinted with permission from Birkhäuser Verlag.

Lipooksygenazy biorą też udział w utlenianiu endobiotyków, takich jak witamina C i E, natomiast adrenalina, noradrenalina czy N-acetylodopamina przekształcane są przy współudziale tych enzymów w odpowiednie barwniki melaninowe [9, 40, 43, 95]. Powstawanie wolnych rodników w wyniku działania lipooksygenaz na nienasycone kwasy tłuszczowe jest jednym z istotnych powodów zainteresowania tymi enzymami ze strony technologów żywności z uwagi na fakt, że reagują one z innymi składnikami żywności – witaminami, pigmentami, białkami czy fenolami, obniżając jakość artykułów spożywczych. Z drugiej strony wywierają korzystne działanie ze względu na rolę, jaką odgrywają w procesie powstawania lotnych związków o charakterystycznym smaku i zapachu w żywności, zarówno świeżej, jak i przetworzanej, włączając grzyby, pomidory, ogórki, melony, banany, świeże i mrożone warzywa oraz produkty otrzymywane z nasion roślin strączkowych. Za powstawanie związków zapachowych odpowiedzialne są wtórne produkty utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych, a wśród nich krótkołańcuchowe alkohole i aldehydy, 6-węglowe związki nazywane „zielonymi" aromatami, n-heksanal, heksenal czy heksenol. Z wymienionych

związków n-heksanal uważany jest za ważny związek pogarszający jakość produktów z soi, natomiast 2-E-heksenal jest głównym związkiem nadającym aromat owocom pomidorów. Z kolei dziewięciowęglowe aldehydy i alkohole są odpowiedzialne za aromat ogórków [2, 3, 7].

Obok korzystnych walorów smakowo-zapachowych końcowe produkty utleniania są również odpowiedzialne za powstawanie lotnych związków nadających trawiasto-fasolowy lub zjełczały zapach w przechowywanych produktach z zielonego grochu, zielonej fasoli, soi czy kukurydzy [13, 16, 66, 88].

Główne zastosowanie lipooksygenaz w technologii żywności to wykorzystanie w procesie wybielania mąki pszennej, które polega na utlenianiu karotenoidów poprzez produkty powstałe z wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w wyniku działania tych enzymów. Stosowany jest dodatek mąki sojowej, w której obecne są trzy izomery lipooksygenazy, badana jest przydatność lipooksygenazy z ziemniaka, jak również rekombinowanych enzymów, przede wszystkim lipooksygenazy-3 z nasion grochu. Ten izoenzym charakteryzuje dobra stabilność termiczna, wysoka aktywność, przewaga 9-hydronadtlenków w procesach utleniania oraz udział w procesie współutleniania β-karotenu. Pożądana żółta barwa makaronu związana jest z obecnością karotenoidów, zwłaszcza luteiny, w semolinie pszenicy twardej, ale pod wpływem działania endogennych oksydaz, w tym lipooksygenaz, następują straty tego barwnika w trakcie procesu technologicznego. Lipooksygenazy stosowane są również do ulepszenia właściwości reologicznych ciasta chlebowego w trakcie pieczenia, prawdopodobnie poprzez współutlenienie grup tiolowych białek pszenicy. Możliwość katalizowania reakcji współutleniania karotenoidów i chlorofili przez lipooksygenazy i powodowana tym procesem utrata barwy jest swoistym wskaźnikiem obniżenia jakości warzyw (zielonej fasoli szparagowej czy grochu), owoców i produktów ich przetworzenia, szczególnie tych, w których karotenoidy są ważnym naturalnym barwnikiem. Istotna jest również utrata ich właściwości przeciwutleniających, ponieważ karotenoidy są naturalnymi składnikami żywności mającymi zdolność neutralizowania wolnych rodników, a więc niezwykle ważnymi nutraceutykami. Proponowane jest również wykorzystanie poziomu aktywności lipooksygenazy jako swoistego wskaźnika do określania wystarczającego działania temperatury w procesie blanszowania zielonej fasoli i grochu [5, 12, 15, 16, 27, 31, 37, 69, 92, 93, 95]. Rozważane są możliwości wykorzystania lipooksygenaz roślinnych jako biokatalizatorów w procesie produkcji związków aromatycznych, dostępnych w większych ilościach i w niższej cenie, np. z wytłoków jabłkowych [1].

Podsumowanie

Lipooksygenaza, enzym katalizujący utlenianie wiązań nienasyconych w kwasach tłuszczowych, występuje w różnych organach roślin, a szczególnie w nasionach roślin strączkowych. Produkty jej działania ulegają dalszym przemianom enzymatycznym

i mogą być prekursorami związków fizjologicznie aktywnych. Działanie lipooksygenazy indukuje zarówno pozytywne, jak i negatywne zmiany jakości żywności pochodzenia roślinnego. Aktywność tego enzymu może stanowić użyteczny specyficzny wskaźnik kontroli w procesach przetwarzania i przechowywania żywności.

Literatura

[1] Almosnino A. M., Bensoussan M., Belin J. M.: Unsaturated fatty acid bioconversion by apple pomace enzyme system. Factors influencing the production of aroma compounds. Food Chem., 1996, **55,** 327-332.

[2] Aziz S., Wu Z., Robinson D. S.: Potato lipoxygenase catalysed co-oxidation of β-carotene. Food Chem., 1999, **64**, 227-230.

[3] Bahçeci K. S., Serpen A., Gökmen V., Acar J.: Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. J. Food Eng., 2005, **66**, 187-192.

[4] Baraniak B., Krzepiłko A.: Inhibition of broccoli lipoxygenase by some phenolic compounds. Pol. J. Food. Nutr. Sci., 2004, **13/54**, 339-342.

[5] Barret D. M., Theerakulkait C.: Quality indicators in blanched, frozen, stored vegetables. Food Technol., 1995, **49**, 64-65.

[6] Bell E., Mullet J.E.: Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. Mol. Gen. Genet., 1991, **230**, 456-462.

[7] Bhirud P.R., Sosulski F.W., Sosulski K.: Optimizing assay and extraction of lipoxygenase in wheat germ. J. Food Sci., 1993, **58**, 1090-1098.

[8] Bild G.S., Ramadoss C.S., Axelrod B.: Effect of substrate polarity on the activity of soybean lipoxygenase isoenzymes. Lipids, 1977, **12**, 732-735.

[9] Blarzino C., Mosca L., Foppoli C., Coccia R., Demarco C., Rosei M.A.: Lipoxygenase/H_2O_2 – catalyzed oxidation of dihydroxyindoles: synthesis of melanin pigments and study of their antioxidant properties. Free Rad. Biol. Med., 1999, **26**, 446- 453.

[10] Boyington J.C., Gaffney B.J., Amzel L.M.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of soybean lipoxygenase-1, a non-heme iron-containing dioxygenase. J. Biol. Chem., 1990, **265**, 12771-12773.

[11] Brash A.R.: Lipoxygenase: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. J. Biol. Chem., 1999, **274**, 23679-23682.

[12] Busto M. D., Owusu Apenten R. K., Robinson D. S., Wu Z., Casey R., Hughes R. K.: Kinetics of thermal inactivation of pea seed lipoxygenases and the effect of additives on their thermostability. Food Chem., 1999, **65**, 323-329

[13] Buttery R. G., Teranishi R., Ling L. C.: Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. Agric. Food Chem., 1987, **54**, 33-43.

[14] Cai K., Fang Y., Xia Y., Su Y.: Effect of exogenous iron on aerobic catalytic mechanism of soybean lipoxygenase. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2004, **32**, 21-26.

[15] Casey R.: Lipoxygenases and breadmaking. In Proceedings of the First European Symposium on Enzymes and Grain Processing, Angelino S. A. G. F., Hamer R. J., van Hartingsfeld H., Heidekamp F., van der Lugt J. P. eds., TNO, Zeist, The Nederlands, 1997, pp. 188-194.

[16] Casey R., West S. I., Hardy D., Robinson D. S., Wu Z., Hughes R. K.: New frontiers in food enzymology: recombinant lipoxygenases. Trends Food Sci.Technol., 1999, **10**, 297-302.

[17] Chan H.W.S.: Soya-bean lipoxygenase an iron-containing dioxygenase. Biochim. Biophys. Acta, 1973, **327**, 32-35.

[18] Chen A.O. Whitaker J.R.: Purification and characterization of a lipoxygenase from immature English peas. J. Agric. Food Chem., 1986, **34**, 203-211.

[19] Christopher J.P., Pistorius E.K., Axeelrod B.: Isolation of a third isoenzyme of soybean lipoxygenase. Biochim. Biophys. Acta, 1970, **12**, 54-62.

[20] Croft K.P.C., Jüttner F., Slusarenko A.J.: Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* L. Leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. Plant Physiol., 1993, **101**, 13-24.

[21] Dahuja A., Madan T. R.: Off-flavour development in soybeans: comparative role of some antioxidants and related enzymes. J. Sci. Food Agric., 2004, **84**, 547-550.

[22] Dunhan W.R., Caroll R.T., Thompson J.F., Sands R.H., Funk M.O.jr.: The initial characterization of the iron environment in lipoxygenase by Mössbauer spectroscopy. Eur. J. Biochem., 1990, **190**, 611-617.

[23] Farmer E.E., Ryan C.A.: Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. Plant Cell, 1992, **4**, 129-134.

[24] Feiters M.C., Boelens H., Veldnik G.A., Vliegenthart J.F.G., Navaratnam S., Allen J.C., Nolting H.F., Hermes C.: X-ray absorption spectroscopic studies on iron in soybean lipoxygenase. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas., 1990, **109**, 133-146.

[25] Feussner I., Kühn H., Wasternack C.: Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. Trends Plant Sci., 2001, **6** (6), 268-273.

[26] Fornaroli S., Petrussa E., Braidot E., Vianello A., Macrì F.: Purification of a plasma membrane-bound lipoxygenase from soybean cotyledons. Plant Sci., 1999, **145**, 1-10.

[27] Frazier P. J., Leagh – Dugmore F. A., Daniels N. W. R., Russel Eggitt P. W., Cuppock J. B. M.: The efect of lipoxygenase action on the mechanical develpoment of weat flour doughs. J. Sci. Food Agric., 1973, **24**, 421-443.

[28] Funk C.D.: The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice. Biochim. Biocphys. Acta, 1996, **1304**, 65-84.

[29] Funk C.D., Furci L., Fritz-Gerald G.A.: Molecular cloning, primary structure and expression of the human plateled/erythroleukemia cell 12-lipoxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, **87**, 5638-5642.

[30] Gardner H.W.: Recent investigation into the lipoxygenase patway of plants. Biochim. Biophys. Acta. 1991, **1084**, 221-239.

[31] Gökmen V., Bahçeci K. S., Serpen A., Acar J.: Study of lipoxygenase and peroxidase as blanching indicator enzymes in peas:change of enzyme activity,ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. LWT, 2005, **38**, 903-908.

[32] Grechkin A.: Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. Prog. Lipid Res., 1998, **37 (5),** 317-352.

[33] Griffiths A., Prestage S., Linforth R., Zhang J., Taylor A., Grierson D.: Fruit-specific lipoxygenase suppression in antisense-transgenic tomatoes. Postharvest Biol. Technol., 1999, **17**, 163-173.

[34] Hildebrand D.F.: Lipoxygenases. Physiol. Plant. 1989, **76**, 249-253.

[35] Hildebrand D.F., Hamilton-Kemp T.R., Legg C.S., Bookjans G.: Plant lipoxygenases: occurrence, properties and possible functions. Current Topics Plant Biochem. Physiol., 1988, **7**, 201-219.

[36] Hover C., Kulkarni A.P.: Lipoxygenase-mediated hydrogen peroxide-dependent N-demethylation of N,N'-dimethylaniline and related compounds. Chem.-Biol. Interact., 2000, **124**, 191-203.

[37] Hughes R. K., Wu Z., Robinson D. S., Hardy D., West S. I., Fairhurst S. A., Casey R.: Characterisation of authentic recombinant pea-seed lipoxygenases with distinct properties and reaction mechanisms. Biochem. J., 1998, **333**, 33-43.

[38] Hugues M., Boivin P., Gauillard F., Nicolas J., Thiry J.M., Richard Forget F.: Two lipoxygenases from germinated barley – heat and killing stability. J. Food Sci., 1994, **59**, 885-889.
[39] Ismah G.K.: ATPase, peroxidase and lipoxygenase activity during post-harvest deterioration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root tubers. Int. Biodet. Biodeg., 2004, **54**, 319-323.
[40] Kalyanaraman B., Darley-Usmar V.M., Wood J., Joseph J., Parthasarathy S.: Synergistic interaction between the probucol phenoxyl radical and ascorbic acid in inhibiting of low density lipoprotein. J. Biol. Chem., 1992, **267**, 6789-6795.
[41] Kim J., Zang., Costas M., Harrison R. G., Wilkinson E. C., Que Jr L.: A nonheme iron (II) complex that models the redox cycle of lipoxygenase. J. Biol. Inorg. Chem., 2001, **6**, 275-284.
[42] Kubicka E., Jędrychowski L. Activity and stability of lipoxygenase from sunflower and pumpkin seeds in relation to extraction mixtures used. Pol. J. Food Nutr. Sci., 1998, **7/28**, 423-429.
[43] Kulkarni A.P.: Lipoxygenase – a versatile biocatalyst for biotransformation of endobiotics and xenobiotics. Cell. Mol. Life Sci., 2001, **58**, 1805-1825.
[44] Kumar V., Rani A., Tindwani C., Jain M.: Lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activities in soybean as influenced by growing location. Food Chem, 2003, **83**, 79-83.
[45] Kühn H., Borngraber S. Mammalian 15-lipoxygenases: enzymatic properties and biological implications. Adv. Exp. Med. Biol., 1999, **447**. 5-28.
[46] Kühn H.: Structural basis for the positional specificity of lipoxygenases. Prostaglandins Other Lipid Mediat., 2000, **62**, 255-270.
[47] Kühn H., Schwartz K., Borngräber S., Kuben R. J.: How do lipoxygenases control the sterepochemistry of fatty acid oxygenation. International Congress Series, 2002, **1233**, 291-296.
[48] Kumar V., Rani A., Tindwani C., Jain M.: Lipoxygenase isozymes and tripsin inhibitor activities in soybean sa influenced by growing location. Food Chem., 2003, **83**, 79-83.
[49] Matsui K., Nishioka M., Ikeyoshi M., Matsumara Y., Mori T., Kajiwara T.: Cucumber root lipoxygenase can act on acyl groups in phosphatidylcholine. Biochim. Biophys. Acta, 1998, **1390**, 8-20.
[50] Márczy J. S., Simon M. L., Mózsik L., Szajáni B.: Comparative study on the lipoxygenase activities of soybean cultivars. J. Agric. Food Chem., 1995, **43**, 313-315.
[51] Melan M.A., Dong X., Endara M.E., Davis K.R., Ausbel F.M., Peterman T.K.: An *Arabidospis thaliana* lipoxygenase gene is induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. Plant Physiol., 1993, **101**, 441-450.
[52] Minor W., Steczko J., Stec B., Otinowski Z., Bolin J.T., Walter R., Axelrod B.: Crystal structure of soybean lipoxygenase L1 at 1.4Å resolution. Biochemistry, 1996, **35**, 10687-10701.
[53] Naidu A.K., Naidu A.K., Kulkarni A.P.: Role of lipoxygenase in xenobiotic oxidation: parathion metabolism catalyzed by highly purifed soybean lipoxygenase. Pestic. Biochem. Physiol., 1991, **41**, 150-158.
[54] Nakayama T., Takeura Y., Ueda T.: Visible spectrophotometric assay, purification, and molecular properties of a lipoxygenese from eggplant (*Solanum melongena* linne) fruits. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, **214**, 1067-1072.
[55] Nanda S., Yadav J. S.: Lipoxygenase biocatalysis; a sourvey of assymetric oxygenation. J. Mol. Cat. B: Enzym., 2003, **26**, 3-28.
[56] Navaratnam S., Feiters M.C., Al-Hakim M., Allen J.C., Veldnik G.A., Vliegenthart J.F.G.: Iron enviroment in soybean lipoxygenase-1. Biochem. Biophys. Acta., 1988, **956**, 70-76.
[57] Nelson M.J., Seitz S.P.: The structure and function of lipoxygenase. Curr. Opin. Struct. Biol., 1994, **4**, 878-884.
[58] Lehnert N., Solomon E.I.: Density-functional investigation on the mechanism of H-atom abstraction by lipoxygenase. J. Biol. Inorg. Chem., 2003, **8**, 294-305.

[59] López-Nicolás J.M., Pérez-Gilabert M., Gracía-Carmona F.: Eggplant lopoxygenase (*Solanum melogena*): product characterization and effect of physicochemical properties of linoleic acid on the enzymatic activity. J. Agric. Food Chem., 2001, **49**, 433-438.

[60] Olias J.M., Valle M.: Lipoxygenase from lupin seed: purification and characterization. J. Sci. Food Agric., 1988, **45**, 165-174.

[61] Oliw E.W.: Plant and fungal lipoxygenases. Prostaglandins Other Lipid Mediat., 2002, **68-69**, 313-323.

[62] Peng Y.L., Shirano Y., Ohta H., Hibino T., Tanaka K., Shibata D.: A novel lipoxygenase from rice. Primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. J. Biol. Chem., 1994, **269**, 3755-3761.

[63] Prigge S. T., Boyington J. C., Faig M., Doctor K. S., Gaffney B. J., Amzel L. M.: Structure and mechanism of lipoxygenases. Biochimie, 1997, **79**, 629-636.

[64] Rajadhyaksha A., Reddy V., Hover C., Kulkarni A.P.: N-demethylation of phenothiazines by lipoxygenase from soybean and human term placenta in the presence of hydrogen peroxide. Terat. Care. Mutat., 1999, **19**, 211-222.

[65] Regdel D., Schewe T., Rapoport S.M.: Enzymic properties of the lipoxygenase from pea seeds. Biomed. Biochim. Acta, 1985, **44**, 1411-1428.

[66] Robinson D. S., Wu Z., Domoney C., Casey R.: Lipoxygenases and a quality of foods. Food Chem., 1995, **54**, 33-43.

[67] Rodríguez-Rosales M.P., Kerkeb L., Ferrol N., Donaire J.P.: Lipoxygenase activity and lipid composition of cotyledons and oil bodies of two sunflower hybrids. Plant Physiol. Biochem., 1998, **36**, 285-291.

[68] Roy P., Kulkarni A.P.: Cooxidation of acrylonitrile by soybean lipoxygenase and partially purified human lung lipoxygenase. Xenobiotica, 1999, **29**, 511-531.

[69] Sheu S. C., Chen A. O.: Lipoxygenase as blanching index for frozen vegetable soybeans. J. Food. Sci., 1991, **56 (2)**, 448-451.

[70] Shibata D., Axelord B.: Plant lipoxygenases. J. Lipid Mediat. Cell Signal., 1995, **12**, 213-228.

[71] Shibata D., Steczko J., Dixon J.E., Hermodson M., Yazdanparst R., Axerold B.: Primary structure of soybean lipoxygenase-1. J. Biol. Chem., 1987, **262**, 10080-10085.

[72] Shimizu T., Honda Z.I., Miki I., Seyama Y., Izumi T., Radmark O., Samuelsson B.: Potato arachidonate 5-lipoxygenase. Puryfication, characterization and preparation of 5(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. Methods in Enzymology, 1990, **187**, 296-306.

[73] Silverman E., Drazen J.M.: The biology of lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. Proc. Assoc. Am. Physicians, 1999, **111**, 525-536.

[74] Skrzypczak-Jankun E., Bross R.A., Carroll R.T., Dunham W.R., Funk M.O.Jr.: Three-dimensional structure of a purple lipoxygenase. J. Am. Chem. Soc., 2001, **123**, 10814-10820.

[75] Skrzypczak-Jankun E., Zhou K., Jankun J.: Inhibition of lipoxygenase by (-)-epigallocatechin gallate: X-ray analysis at 2.1Å reveals degradation of EGCG and shows soybean LOX-3 complex with EGC instead. Inter. J. Mol. Med., 2003, **12**, 415-422.

[76] Smith J., Linforth R., Tucker G.A.: Soluble lipoxygenase isoforms from tomato fruit. Phytochemistry, 1997, **45**, 453-458.

[77] Sok D.E., Kim M.R.: Coversion of α-linolenic acid to dihydro(pero)xyoctadecatrienoic acid isomers by soybean and potato lipoxygenases. J. Agric. Food Chem., 1994, **42**, 2703-2708.

[78] Steczko J., Muchmore C.R., Smith J., Axelrod B.: Crystallization and preliminary X-ray investigation of lipoxygenase-1 from soybeans. J. Biol. Chem., 1990, **265**, 11352-11354.

[79] Suurmeijer C.N.S.P., Pérez-Gilbert M., van der Hijden H.T.W.M., Veldnik G.A., Vliegenhart J.F.G.: Purification, product characterization and kinetic properties of soluble tomato lipoxygenase. Plant Physiol. Biochem., 1998, **36**, 657-663.

[80] Theerakulkait C., Barrett D. M.: Lipoxygenase in sweet corn germ: Isolation and phytochemical properties. J. Food Sci., 1995, **5**, 1029-1032.

[81] Theorell H., Holman R.T., Akeson A.: Crystalline lipoxydase. Acta Chem. Scand., 1947, **1**, 571-576.

[82] Todd J.F., Paliyath G., Thompson J.E.: Characteristic of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. Plant Physiol., 1990, **94**, 1225-1232.

[83] Tomchick D.R., Phan P., Cymbrowski M. Minor W., Holman T.R.: Structural and functional characterization of second-coordinationsphere mutants of soybean lipoxygenase-1. Biochemistry, 2001, **40**, 7509-7517.

[84] Ueda N., Susuki H., Yamamoto S.: Mammalian lipoxygenases: structure, function and evolutionary aspects. In Eicosanoids and Related Compounds in Plants and Animals, Rowley A. F., Kühn K., Schewe T. eds, Portland Press, 1998, pp. 47-67.

[85] Zhang Y., Gebhard M.S., Solomon E.I.: Spectroscopic studies of non-heme ferric active site in soybean lipoxygenase: Magnetic circular dichroism as a probe of electronic and geometric structure. Ligand-field origin of zero field splitting. J. Am. Chem. Soc., 1991, **113**, 5162-51-75.

[86] Zhuang H., Barth M.M., Hilderband D.F.: Packing influenced total chlorophyll, soluble protein, fatty acid composition and lipoxygenase activity in broccoli florets. J. Food Sci., 1994, **59**, 1171-1174.

[87] Van der Heijdt L.M., Feiters M.C., Navarantam S., Nolting H.F., Hermes C., Velding H.J., Vliegenthart J.F.G.: X-ray absorptin spectroscopy of soybean lipoxygenase L-1. Biochemistry, 1992, **207**, 793-802.

[88] Velasco P. J., Lim M. H., Pangborn R. M., Whitaker J. R.: Enzymes responsible for off-flavour and off-aroma in blancheds and frozen stored vegetables. Appl. Biochem. Biotechnol., 1989, **11**, 118-127.

[89] Veldnik G.A., Hilbers M.P., Nieuwenhuzen W.F., Vliegenthart J.F.G.: Plant lipoxygenase: structure and mechanism. In: Eicosanoids and Related Compounds in Plants and Animals – ed. A.F. Rowley, K. Kühn, T. Schewe. Portland Press, 1998, pp. 69-95.

[90] Wardale D.A., Lambert E.A.: Lipoxygenase from cucumber fruit: localization and properties. Phytochemistry, 1980, **19**, 1013-1016.

[91] Whittaker J.W., Solomon E.I.: Spectroscopic studies on ferrous non-heme iron active sites: Magnetic circular dichroism of monomolecular Fe sites on superoxide dismutase and lipoxygenase. J. Am. Chem. Soc., 1988, **110**, 5329-5339.

[92] Whitehead I.M., Muller B.L., Dean C.: Industrial use of soybean lipoxygenase for the production of natural green note flavor compounds. Cereal Foods World, **40**, 193-197.

[93] Wiliams D. C., Lim M. H., Chen A. O., Pangborn R. M., Whitaker J. R.: Blanching of vegetables for freezing – which is indicator enzyme to choose. Food Technol., 1986, **40**, 130-140.

[94] Williams M., Salas J.J., Sanchez J., Harwood J.L.: Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). Phytochemistry, 2000, **53**, 13-19.

[95] Wu Z., Robinson D. S., Hughes R. K., Casey R., Hardy D., West S.: Co-oxidation of β-carotene catalysed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. J. Agric. Food Chem., 1999, **47**, 4899-4906.

[96] Yamamoto S.: Mammalian lipoxygenases: molecular structure and function. Biochim. Biophys. Acta, 1992, **1128**, 117-131.

[97] Yamenicioğlu A., Özkan M., Velioğlu S., Cameroğlu B.: Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from fresh pinto beans (*Phaseolus vulgaris*). Z Lebensm Unters Forsch A, 1998, **206**, 294-296.

[98] Yoon S., Klein B.P.: Some properties of pea lipoxygenase isoenzymes. J. Agric. Food Chem., 1979, **27**, 955-962.

[99] Yoshie-Stark Y., Wäsche A.: Characteristics of crude lipoxygenase from commercially de-oiled lupin flakes for different types of lupins *Lupinus albus, Lupinus angustifolius*). Food Chem., 2004, **88**, 287-292.

LIPOXYGENASE IN FOOD OF PLANT ORIGIN

S u m m a r y

Lipoxygenase (EC 1.13.11.12, linoleate:oxygen oxidoreductase) is an iron-containing dioxygenase which catalyses the oxidation of polyunsaturated fatty acids and esters containing cis,cis-1,4-pentadiene system. The main reaction products are conjugated unsaturated fatty acids and hydroperoxides. The hydroperoxides generated by lipoxygenase are substrates for hydroperoxide lyase, hydroperoxide isomerase, peroxygenase and allene oxide synthase. The initial products of lipoxygenase activity may be degraded to variety of products, including several aldehydes, ketones and alcohols and characteristic aroma compounds. Lipoxygenases (LOX) may also catalyse the co-oxidation of carotenoids, including β-carotene, resulting in the loss of essential nutrients and the development of off-flavours. Lipoxygenase has been found in various organs of plants. Plant LOX proteins consist of a single polypeptide chain with a molecular mass about 75–100 kDa. The physiological role of lipoxygenase in plants is not certain, although there is considerable evidence indicating its involvement in wounding and other stress responses (drought and pest/pathogen attack) because lipoxygenases are believed to be on the biosynthetic pathways to the plants regulators abscisic acid and methyl jasmonate. Lipoxygenase activity is also the first step in the pathway leading to the formation of a number of flavour and aroma compounds. Lipoxygenases are of interest to food scientists because of their ability to form free radicals and peroxides which can be involved in indirect oxidation of vitamins, colours, phenolic and proteins.

Key words: structure of lipoxygenase, activity mechanisms, products of fatty acids oxygenation