

# Revue bibliographique : les lipoxygénases du soja

Marie-Laure Fauconnier, Michel Marlier

Unité de Chimie générale et organique. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

Reçu le 4 avril 1996, accepté le 10 octobre 1996.

Dans cet article de synthèse, les auteurs font le point sur les connaissances actuelles dans le domaine des lipoxygénases du soja. Une attention particulière est portée à la compréhension des mécanismes réactionnels (substrats, inhibiteurs, site actif, etc.). Le rôle physiologique ainsi que l'utilisation de cet enzyme dans les industries agroalimentaires et en biotechnologie sont également abordés. **Mots-clés.** Lipoxygénase, soja, *Glycine max* L., acide gras polyinsaturé, acide linoléique, acide linoléique, mécanisme de réaction.

**A review : soybean lipoxygenases.** In this review, the authors take stock of the current knowledge in the area of soybean lipoxygenases. They focus on the comprehension of reactional mechanisms (substrates, inhibitors, active site, etc.). Physiological functions and uses of the enzyme in the food industry and in biotechnology are also considered.

**Keywords.** Lipoxygenase, soybean, *Glycine max* L., polyunsaturated fatty acid, linolenic acid, linoleic acid, reaction mechanism.

## INTRODUCTION

La lipoxygénase (EC : 1.13.11.12) est une dioxygénase intramoléculaire qui catalyse l'oxygénation d'acides gras polyinsaturés contenant une structure (Z)-1,(Z)-4-pentadiénique pour former des hydroperoxydes conjugués (Figure 1).

L'enzyme est largement distribué dans les plantes supérieures (Siedow, 1991 ; Fauconnier *et al.*, 1995) mais a également été observé dans une bryophyte (Matsui *et al.*, 1991), dans des algues (Zimmerman, Vick, 1973 ; Benytout *et al.*, 1989), dans des champignons (Hamberg, 1986 ; Satoh *et al.*, 1976), dans la levure de boulangerie (Shechter, Grossman, 1983). La lipoxygénase est aussi présente au sein du règne animal ; elle a ainsi été décrite dans un corail (Bundy *et al.*, 1986) ainsi que dans un poisson (German, Kinsella, 1986). Chez les mammifères, dont l'homme, elle participe à l'oxydation de l'acide arachido-

rique et donne lieu à la synthèse de lipoxines et de leukotriènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Schewe *et al.*, 1986).

Les lipoxygénases végétales ont fait et font l'objet de très nombreuses publications, mais leur rôle physiologique exact reste à élucider. Parmi les lipoxygénases, celles du soja (*Glycine max* (L.) Merr.) ont été particulièrement étudiées, c'est sur ces enzymes que se focalise la présente synthèse bibliographique. Les publications suivantes traitant des lipoxygénases végétales sont spécialement recommandées : Axelrod *et al.*, 1981 ; Chism, 1985 ; Hatanaka *et al.*, 1987 ; Hildebrand, 1989 ; Whitaker, 1991 ; Siedow, 1991 ; Gardner, 1991 ; Sanz *et al.*, 1992 ; Hatanaka, 1993 ; Vick, 1993 ; Vick, Zimmerman, 1993 ; Nelson, Seitz, 1994 ; Martini, Iacazio, 1995.

## HISTORIQUE

Cette classe d'enzymes a été signalée pour la première fois dans les graines de soja en 1932 par André et Hou qui la dénommèrent lipoxydase. En 1940, Sumner et Sumner mettent en évidence que l'activité "carotène oxydase" était due au même enzyme que celui décrit par André et Hou et l'appelèrent alors lipoxygénase. L'enzyme a été purifiée pour la première fois en 1943 par Balls et ses collaborateurs alors que Theorell et son équipe la cristallisaient en 1947.

## DÉFINITION GÉNÉRALE

Les lipoxygénases du soja sont des dioxygénases intramoléculaires monomériques d'une masse moléculaire voisine

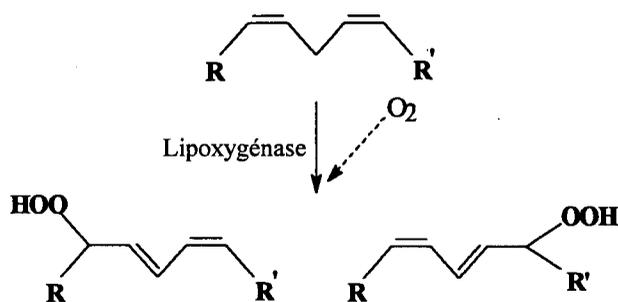


Figure 1. Formation d'hydroperoxydes à partir d'acide linoléique — Hydroperoxide formation from linoleic acid.

de 95 000 daltons possédant un atome de fer non hémique par molécule d'enzyme. Elles catalysent la formation d'hydroperoxydes diéniques conjugués à partir d'acides gras polyinsaturés présentant une structure (Z)-1,(Z)-4-pentadiénique (Chan, 1973 ; Pistorius, Axelrod, 1974 ; Siedow, 1991 ; Martini, Iacazio, 1995).

## LA VOIE DE LA LIPOXYGÉNASE

La **figure 2** présente le système enzymatique de dégradation des acides gras insaturés (Hildebrand, 1989 ; Hatana-ka, 1993 ; Fukushima, 1994).

Selon ce schéma, les triglycérides sont hydrolysés par une lipase en acides gras libres. Les acides linoléique et linolénique sont oxydés par la lipoxygénase en 9- et 13-hydroperoxydes. L'hydroperoxyde lyase clive alors ces hydroperoxydes en aldéhydes et oxoacides. Les 9-hydroperoxydes de l'acide linoléique et linolénique fournissent respectivement le *cis*-3-nonénal et le *cis*-3, *cis*-6-nonadiénal associé à l'acide 9-oxo-nonanoïque. Le clivage des 13-hydroperoxydes de ces deux même acides conduit à l'hexanal et au *cis*-3-hexénal accompagné de l'acide 12-oxo-dodécénoïque. Le *cis*-3-nonénal et le *cis*-3-hexénal subissent une isomérisation lorsque les facteurs physiques du milieu (pH, température) le permettent ou encore par l'intermédiaire d'une isomérase. Chacun des aldéhydes

formés est susceptible d'être réduit en son alcool par une oxydoréductase.

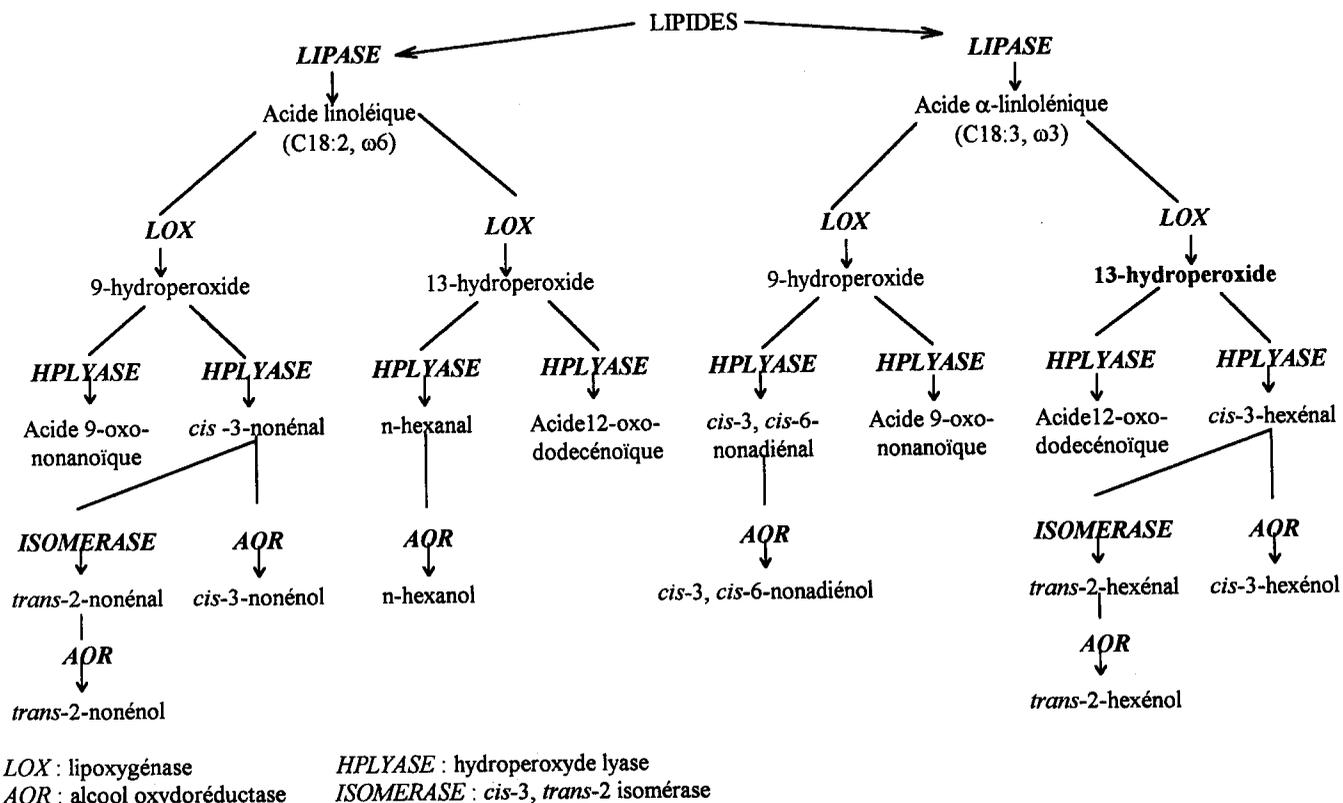
Nous retenons particulièrement de ce schéma le *trans*-2-hexénal et le *cis*-3-hexénol, respectivement appelés aldéhyde et alcool de feuille. Ces deux derniers composés sont très recherchés par les aromaticiens.

## DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

De nombreuses méthodes ont été décrites pour quantifier l'activité lipoxygénase dans des extraits végétaux. Ces tests sont basés sur les principes suivants :

- mesure de la consommation d'oxygène ;
- mesure de la cooxydation des pigments ;
- suivi de la réaction par chimiluminescence ;
- suivi de la réaction par polarographie ;
- utilisation d'anticorps (test ELISA) ;
- détermination colorimétrique des hydroperoxydes ;
- mesure de la formation de diènes conjugués.

La mesure de la consommation d'oxygène au moyen d'un oxymètre (électrode à oxygène) est une méthode couramment utilisée. Elle présente une bonne sensibilité et les solutions troubles ne provoquent pas d'interférences. Le seul problème pouvant se poser est l'utilisation de l'oxygène par d'autres réactions. Cette technique est peu



**Figure 2.** Système enzymatique de dégradation des acides gras polyinsaturés — *Enzymatic system of polyunsaturated fatty acids degradation.*

adaptée à des séries importantes d'échantillons (Mitsuda *et al.*, 1967).

Les mesures basées sur la cooxydation des pigments sont à proscrire car les différents isoenzymes ne présentent pas le même comportement vis-à-vis de ce substrat et la réaction n'est pas stœchiométrique (Sumner, Sumner, 1940).

Le suivi de la réaction par chemiluminescence permet d'obtenir une grande sensibilité et les interférences sont rares. La méthode est basée sur le principe suivant : les hydroperoxydes produits dans le milieu de réaction réagissent avec le cytochrome *c* et forment des radicaux oxygénés qui oxydent le luminol ajouté au mélange réactionnel. Le luminol est excité et génère une chimiluminescence proportionnelle à l'activité enzymatique (Kondo *et al.*, 1994).

La méthode polarographique utilise une électrode de travail à goutte de mercure, une électrode de référence saturée au calomel tandis que l'électrode auxiliaire est en platine. Les hydroperoxydes produits par la réaction enzymatique sont réduits à 0 V par rapport à l'électrode de référence au calomel. Ce courant de réduction est directement proportionnel à la concentration en hydroperoxyde. L'oxygène étant réduit à des potentiels plus négatifs, il ne gêne pas la mesure. Le test ne peut être réalisé directement dans le milieu réactionnel car le mercure inhibe l'enzyme. Un dispositif utilisant une pompe péristaltique permet cependant de réaliser la lecture de l'activité en continu. Cette technique n'est pas la plus simple à mettre en oeuvre mais elle permet de travailler dans des milieux troubles ou de réaliser des essais d'inhibition avec des composés présentant une absorbance importante dans l'UV (Daniel *et al.*, 1994).

L'utilisation d'anticorps (test ELISA) permet de détecter l'enzyme lui-même et non son activité. Cette technique est fréquemment utilisée lors de la sélection de variétés car elle est adaptée à de très petites quantités de matériel et présente l'avantage de distinguer les différents isoenzymes. La méthode est sensible, rapide et adaptée à la mesure de nombreux échantillons. Elle est cependant délicate à mettre au point car elle nécessite la purification préalable des isoenzymes à tester (Yabuuchi *et al.*, 1982).

Les déterminations colorimétriques sont généralement fastidieuses, peu précises et qui plus est, non adaptées à des mesures en continu. Elles sont basées sur l'obtention d'une coloration lorsqu'un réactif est ajouté aux hydroperoxydes. Récemment, Suda et son équipe (1995) ont mis au point des tests visuels rapides permettant de détecter la présence ou l'absence de différents isoenzymes du soja (isoenzymes 1, 2, 3). Ces tests ne mesurent pas à proprement parler l'activité enzymatique mais sont utiles lors de la recherche de variétés présentant l'une ou l'autre mutation quant à la synthèse de un ou plusieurs isoenzymes (Koch *et al.*, 1958 ; Hammond *et al.*, 1992 ; Suda *et al.*, 1995).

Finalement, c'est la mesure dans l'UV à 234 nm basée sur l'apparition d'un diène conjugué lors de la formation de l'hydroperoxyde qui est de loin la plus utilisée. La technique décrite par Surrey (1964) consiste à prélever une aliquote du milieu réactionnel à des temps donnés et à la diluer dans l'éthanol afin de réaliser la mesure UV. Ce protocole peut être facilement adapté à des mesures en continu en réalisant le test directement dans la cellule de mesure. On obtient de cette façon une méthode de mesure en continu simple, rapide, répétable, peu coûteuse et ne nécessitant que de petites quantités de matériel végétal.

## RÔLE PHYSIOLOGIQUE

Les rôles physiologiques assignés aux lipoxygénases peuvent se définir selon quatre axes (Siedow, 1991) :

- croissance et développement ;
- synthèse de régulateurs ;
- phénomène de sénescence ;
- réponse à une blessure ou à un agent pathogène.

On a pu mettre en évidence que l'activité lipoxygénase augmentait fortement peu de temps après la germination de graines et lors du développement des jeunes plantules. Il a également été démontré que l'activité lipoxygénase était plus importante dans de jeunes feuilles en croissance que dans des feuilles ayant atteint leur taille maximale. Il n'y a pas à l'heure actuelle d'explication de ce phénomène. (Kubacka-Zebalska, Kacperska-Palacz, 1980 ; Hildebrand, Hymowitz, 1983 ; Altschuler *et al.*, 1989 ; Park, Polacco, 1989).

Les 13-hydroperoxydes de l'acide linoléique et linoléique sont des précurseurs pour la synthèse par voie enzymatique de la traumatine (acide 12-oxo-*trans*-10-dodécénoïque), composé qui induit la division cellulaire et la formation de cals (Zimmerman, Coudron, 1979). Par réaction non enzymatique, la traumatine peut être convertie en acide traumatique. Tant la traumatine que l'acide traumatique sont libérés par la plante lorsqu'elle est sujette à un stress tel que découpage, broyage (Hatanaka *et al.*, 1992), blessure (Siedow, 1991), infection (Croft *et al.*, 1993). En fait, la multiplication et l'élongation des cellules induites par cette hormone permettent la formation d'une callosité qui fait obstacle à l'entrée de pathogènes.

Le 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique peut également être le précurseur de l'acide jasmonique (Vick, Zimmerman, 1983 ; Siedow, 1991 ; Ehret *et al.*, 1994 ; Geerts *et al.*, 1994 ; Nellen *et al.*, 1995), composé qui présente des propriétés de sénescence analogues à celles de l'acide abscissique (Hildebrand, 1989). Il cause l'inhibition de la croissance et stimule l'accumulation de protéines de réserve (Gardner, 1991 ; Boyington *et al.*, 1993a). Cependant, le rôle et les propriétés de l'acide jasmonique ne sont pas aussi évidents puisqu'on l'a également identifié dans des tissus jeunes et en pleine croissance. Récemment, certains auteurs ont rapporté que l'acide jasmonique était

impliqué dans la réponse d'une plante à une blessure (Geerts *et al.*, 1994 ; Creelman *et al.*, 1992) ou à une attaque de la part d'un pathogène (Saravitz, Siedow, 1995 ; Farmer, Ryan, 1992).

## LES ISOENZYMES DE LA GRAINE DU SOJA

### Caractéristiques générales

Jusqu'en 1970, la lipoxigénase du soja était considérée comme une entité simple. Christopher et ses collaborateurs (1970, 1972) montrèrent que l'activité enzymatique était due à la présence de quatre isoenzymes distincts. Ces derniers furent dénommés lipoxigénase 1, 2, 3a et 3b. Il est rapidement apparu que les lipoxigénases 3a et 3b étaient similaires, les différences ne provenant que d'une modification post-traductionnelle et non d'une expression génétique différente. En 1992, Kato et son équipe isolèrent trois nouveaux isoenzymes (isoenzyme 4, 5, 6) à partir de graines germées. Des données précises ne sont disponibles que pour les isoenzymes 1, 2 et 3, (Lox-1, Lox-2, Lox-3), les trois autres ayant été peu étudiés (**Tableau 1**).

La Lox-1 se différencie facilement des autres isoenzymes sur base de son pH optimum (9–9,5 au lieu de 6,0–7,0). D'autre part, elle produit majoritairement des 13-hydroperoxydes (97,5 % à pH 9) mais un abaissement de pH induit une augmentation des 9-hydroperoxydes produits (25 % à pH 6,0).

Les lipoxigénases sont fréquemment classées en deux groupes (lipoxigénases I et lipoxigénases II) sur base de leur pH optimum et des produits formés : les lipoxigénases I ont un pH optimum de 9 et produisent majoritairement des 13-OOH ; les lipoxigénases II possèdent un pH optimum de 7 et produisent un mélange équimolaire de 9- et 13-OOH.

Il est à noter que d'autres isoenzymes que les six précités ont été mis en évidence dans d'autres parties de la plante que dans les graines. Ainsi, Park et Polacco (1989) ont montré que lors de la germination, l'axe racinaire et son prolongement dans l'hypocotyle contenaient trois à quatre isoenzymes différents de ceux des graines avec un point isoélectrique inférieur.

**Tableau 1.** Caractéristiques des isoenzymes 1, 2 et 3 du soja (Scheller *et al.*, 1994 ; Siedow, 1991) — *Characteristics of soybean isoenzymes 1, 2 and 3.*

Caractéristique	Lox-1	Lox-2	Lox-3
Masse moléculaire	94 480	96 200	96 400
Point isoélectrique	5,68	6,25	6,15
pH optimal	9,0–9,5	6,0–7,0	6,0–7,0
Km (acide linoléique)	12 µM	16 µM	340 µM
Spécificité (13 OOH / 9 OOH)	2,5 / 97,5	50 / 50	50 / 50

L'équipe de Grayburn (1991) a identifié trois groupes de lipoxigénases dans les feuilles du soja ; l'un est différent de ceux rencontrés dans l'axe racinaire. Chacun de ces groupes contient plusieurs isoenzymes.

Saravitz et Siedow (1995) ont séparé sur base de leur point isoélectrique (pI) deux groupes de lipoxigénases et ceci toujours dans les feuilles. Le premier groupe (pI neutre : 6,8 à 7,2) comprend six isoenzymes, le deuxième (pI acide : 4,7 à 5,6) en contient huit. Deux de ces isoenzymes sont également rencontrés au niveau de l'axe racinaire.

### La purification des isoenzymes du soja

La purification des isoenzymes de la lipoxigénase du soja a été décrite par plusieurs auteurs. Dans de nombreux cas, les purifications conduisent soit à la séparation de la lipoxigénase des autres protéines, soit à la séparation des isoenzymes mais sans mention de pureté électrophorétique. Les meilleurs résultats ont été obtenus par combinaison de techniques chromatographiques, la séparation des isoenzymes eux-mêmes étant obtenue par chromatographie échangeuse d'ions (Christopher *et al.*, 1972 ; Finazzi-Agro *et al.*, 1973 ; Axelrod *et al.*, 1981 ; Funk *et al.*, 1985 ; Kuninori *et al.*, 1992 ; Shkarina *et al.*, 1992 ; Nishiyama *et al.*, 1993 ; Fauconnier, Marlier, 1996).

### Les substrats de la lipoxigénase

L'acide arachidonique est le substrat naturel des lipoxigénases animales tandis que les acides linoléique et linoléinique sont ceux des lipoxigénases végétales (Macri *et al.*, 1994 ; Nelson, Seitz, 1994).

Bien que par définition, la lipoxigénase agisse sur le système (Z)-1,(Z)-4-pentadiénique, Funk *et al.* (1987) ont démontré que les isomères Z, E et E, Z pouvaient servir de substrat. En outre, la Lox-1 accepte également comme substrat des composés ne présentant pas ce système 1,4-pentadiénique tel l'acide furanoïque (Boyer *et al.*, 1979) ou l'ester méthylique de l'acide 2-céto-10-dodécénoïque (Kuhn *et al.*, 1991).

En plus des acides gras libres, d'autres substrats lipidiques peuvent être oxydés. Ainsi, selon Gardner (1991), les phospholipides contenant les acides gras adéquats peuvent être utilisés comme substrat. La cinétique enzymatique se trouve cependant affectée par ce changement de substrat : la réaction est plus lente et moins efficace.

Hatanaka (1993) a étudié la spécificité d'action de la Lox-1 vis-à-vis de divers substrats naturels et non naturels qu'ils classent en trois groupes :

- groupe A : acides diénoïques du C-14 au C-24, le résidu acyle est fixe ;
- groupe B : acides triénoïques du C-14 au C-24, le résidu acyle est fixe ;

– groupe C : acides diénoïques du C-14 au C-24, la partie carboxylique est fixe.

À l'examen des résultats (Figure 3) on peut observer, pour le groupe A, une augmentation de l'activité spécifique du C-14 au C-20 puis une chute rapide de celle-ci. Les mêmes observations ont été réalisées pour les substrats appartenant au groupe B. En ce qui concerne le groupe C, seul le C-18 est utilisé par la Lox-1. Ceci indique que l'enzyme est strict quant à la conformation de la zone hydrophobe du substrat ; il accepte, par contre, une modification de la longueur de la chaîne hydrocarbonée se trouvant à l'extrémité carboxylique de la molécule.

**Régiospécificité de la réaction enzymatique**

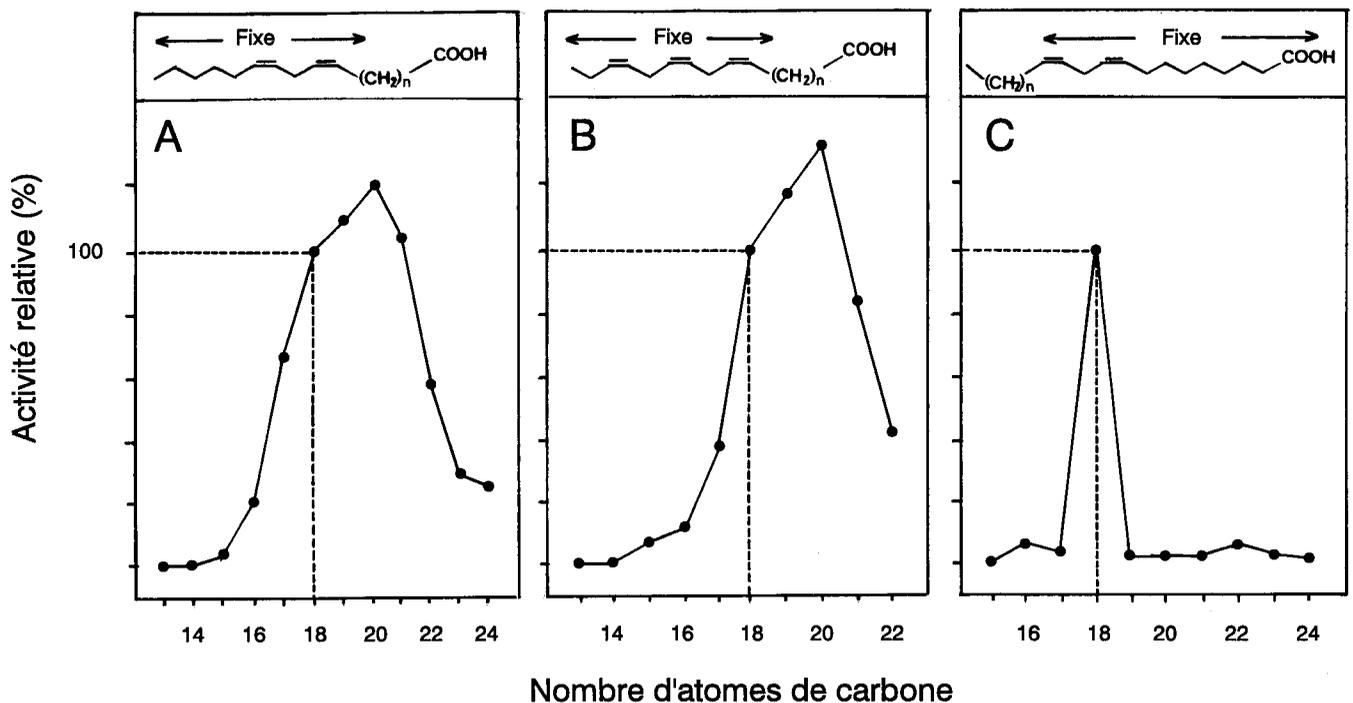
Lors de la formation des hydroperoxydes, l'insertion de l'oxygène est spécifique. Par contre, la fixation de l'acide à l'intérieur du site actif de la lipoxygénase peut être réalisée de deux façons différentes : "la tête en avant" ou "la queue en avant" (Figure 4) (Gardner, 1991).

À ces deux orientations possibles du substrat correspondent les deux isomères de position que sont les 9- et 13-hydroperoxydes. Ces deux réactions sont rendues possibles par la symétrie du système (Z)-1,(Z)-4-pentadiénique et du

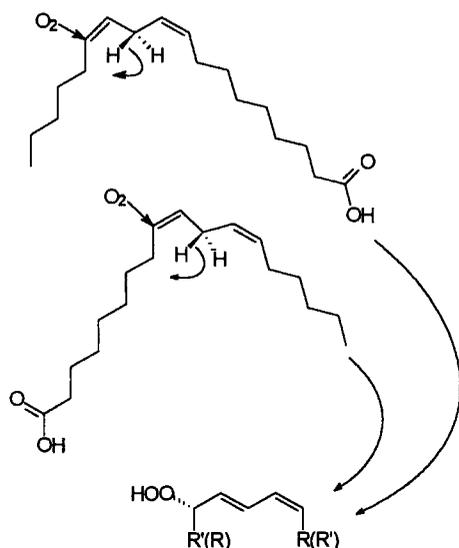
fait de la flexibilité du site actif qui permet la fixation du substrat dans les deux sens.

On peut encore ajouter, concernant la stéréochimie des produits formés, que la Lox-1 forme majoritairement des 13-hydroperoxydes (88 %) dont 91 % de forme S. Lorsque l'acide linoléique est remplacé par son ester méthylique, on obtient un mélange racémique. Ceci démontre l'implication du groupement carboxylique dans la stéréochimie des produits formés (Veldink, Vliegthart, 1991 ; Hatanaka, 1993). La différence d'hydrophobicité entre les deux extrémités du substrat influence la spécificité de position de la dioxygénation (Figure 5) (Datcheva *et al.*, 1991).

Si on étudie l'affinité des isoenzymes 1, 2 et 3 pour des substrats de diverses polarités, on observe des différences de comportement importantes (Tableau 2) (Bild *et al.*, 1977 ; Siedow, 1991). La Lox-1 catalyse préférentiellement l'oxydation d'acides gras chargés (forme anionique de l'acide linoléique à pH 9) et présente une faible réactivité envers les acides gras estérifiés. Les Lox-2 et Lox-3 quant à elles, sont nettement plus réactives vis-à-vis des acides gras neutres. Ceci explique que la Lox-1 forme majoritairement du 13-hydroperoxyde car à des pH basiques, l'acide gras est chargé et ne peut se présenter au sein du site actif de l'enzyme que dans une seule direction. À pH 7 par contre, les deux orientations sont possibles et



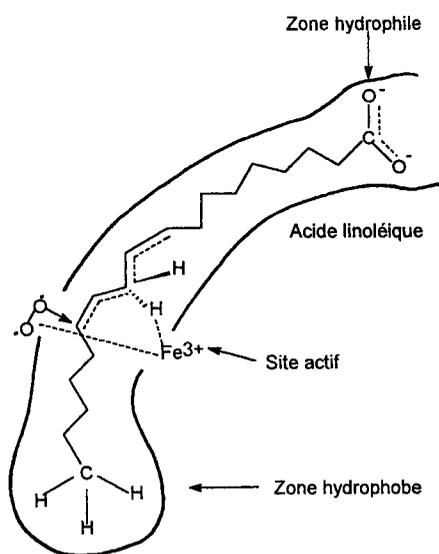
**Figure 3.** Résultat de l'étude de spécificité du substrat de la Lox-1. Activité spécifique en fonction du nombre de carbone du substrat. L'activité est exprimée en pourcent de celle vis-à-vis du composé en C-18, qui dans chacune des trois situations, est un substrat naturel (en A, C-18 = acide linoléique pour n = 7 ; en B, C-18 = acide linoléique pour n = 7 ; en C, C-18 = acide linoléique pour n = 4) (Hatanaka, 1993) — *Result of the study of Lox-1 substrate specificity. Specific activity versus the number of carbon of the substrate. The activity is expressed in percent of the one against the C-18 compound which is in the three cases a natural substrate (A, C-18 = linoleic acid for n = 7 ; B, C-18 = linoleic acid for n = 7 ; C, C-18 = linoleic acid for n = 4).*



**Figure 4.** Orientation de l'acide linoléique "tête en avant" et "queue en avant" (d'après Gardner, 1991) — *Orientation of linoleic acid "head-first" and "tail-first"*.

les isoenzymes 2 et 3 donnent lieu à la formation d'un mélange 50/50 de 9- et 13-hydroperoxydes.

Pourplanche *et al.* (1994) ont montré que lorsque l'on modifie le micro-environnement de la Lox-1 par ajout de co-solvants solubles dans l'eau, on modifie la sélectivité des produits formés. On observe une augmentation du rapport 9/13 hydroperoxyde lors de l'ajout de sorbitol, de saccharose, de glucose, de maltose, de mannitol et de



**Figure 5.** Modèle proposé par Hatanaka (1993) pour l'interaction entre la Lox-1 et son substrat — *Model proposed by Hatanaka (1993) for the interaction between Lox-1 and its substrate.*

**Tableau 2.** Activité relative des Lox-1, Lox-2 et Lox-3 vis-à-vis de divers substrats (Bild *et al.*, 1977) — *Relative activity of Lox-1, Lox-2 and Lox-3 using different substrates.*

Substrat	Lox-1 (pH 9)	Lox-2 (pH 6,8)	Lox-3 (pH 6,8)
Acide linoléique	100	58	3
Linoléate de méthyle	10	30	5
Alcool linoléique	22	16	3
Méthane sulfonate de linoléyle	16	104	5
Nitrile de 10,13-nonadécadiène	7	38	5
Chlorure de linoléyle	63	40	3
Potassium sulfate de linoléyle	140	< 1	< 1
10,13-nonadécadiénamine	52	14	< 1
Acétate de linoléyle	6	23	2
Acide linoléique + Tween	102	21	37

glycérol. Seraient impliquées de petites modifications dans la structure tertiaire avec, par exemple, des modifications dans l'orientation de chaînes latérales de résidus tyrosine ou tryptophane.

Scheller et son équipe (1995) ont focalisé leurs recherches sur l'étude des paramètres cinétiques et sur la structure des produits formés par la Lox-1 pour divers substrats synthétiques. L'ajout d'une fonction carboxylique en C-6 et/ou d'un groupement méthyle en C-15 ou encore d'un cycle, a été testé. On peut observer dans tous les cas une augmentation de  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) et une diminution de  $V_{max}$  (vitesse maximum). D'une manière générale, la modification du substrat diminue la régiosélectivité et l'énantiospécificité, conduisant à un mélange racémique. Cette étude confirme encore une fois que les deux extrémités du substrat ont une influence sur la structure des produits formés, la différence d'hydrophobicité entre les deux extrémités fournissant une aide précieuse pour prédire la spécificité de position.

### Mécanisme réactionnel de la dégradation enzymatique des acides gras polyinsaturés

**Le site actif.** La lipoxygénase a longtemps été considérée comme une dioxygénase exceptionnelle car aucun groupement prosthétique ou cofacteur métallique n'avait été mis en évidence. En 1973, Chan a démontré la présence d'une mole de fer par mole d'enzyme. Par la suite, ce résultat a été confirmé par d'autres auteurs tels que Pistorius *et al.* (1974) qui ont montré le rôle essentiel de cet élément dans l'activité catalytique de l'enzyme.

Le fer au sein de l'enzyme peut se trouver à deux étages d'oxydation. L'enzyme natif contient le fer sous forme  $Fe^{2+}$  et est incolore (Roza, Francke, 1973). En présence d'hydroperoxydes, le fer ferreux est oxydé en fer ferrique, l'enzyme est alors jaune et actif. Cette oxydation ne peut avoir

lieu qu'en présence d'une quantité équimolaire d'hydroperoxydes. Une concentration élevée en hydroperoxydes entraîne le passage à l'état pourpre instable. Dans ce cas, l'enzyme retourne à la forme incolore après quelques minutes à température ambiante. L'enzyme "s'empoisonne" avec ses produits (Siedow, 1991 ; Schilstra *et al.*, 1992 ; Weyd *et al.*, 1992 ; Kramer *et al.*, 1994 ; Scarrow *et al.*, 1994 ; Schilstra *et al.*, 1994a).

De nombreuses hypothèses ont été élaborées quant au mode d'insertion du fer au sein de la protéine. Le fer est impliqué dans une structure de type "non-hème" et est lié à la molécule par l'intermédiaire de  $5 \pm 1$  ligands pour la lipoxygénase native et  $6 \pm 1$  ligands pour la lipoxygénase active. La coordination est réalisée par les résidus histidine aux positions 499, 504, 690, par l'asparagine 694, par l'oxygène du COOH terminal de l'isoleucine 839 et par une molécule d'eau (Figure 6) (Zhang *et al.*, 1991 ; Boyington *et al.*, 1993a, 1993b ; Minor *et al.*, 1993 ; Kramer *et al.*, 1994 ; Nelson, Seitz, 1994 ; Scarrow *et al.*, 1994).

Ce site présente l'avantage d'être flexible et est en accord avec le mécanisme proposé pour l'insertion de l'acide gras "tête en avant" ou "queue en avant".

En 1988, Van der Mer et Duine ont mis en évidence pour la première fois la présence d'un cofacteur organique dans la catalyse enzymatique : la pyrroloquinoline (PQQ), à raison de 0,88 mole par mole d'enzyme. Il s'avère que la PQQ est un très bon agent chélatant du fer et le complexe qu'elle formerait faciliterait l'abstraction d'un atome d'hydrogène du substrat accompagné de l'oxydation du fer à l'état ferrique. Le radical ainsi formé réagirait aisément avec l'oxygène pour former l'hydroperoxyde.

Ces résultats ont cependant été infirmés par Michaud-Soret *et al.* (1990) ainsi que par Veldink *et al.* (1990) qui n'ont pu déceler la présence de PQQ dans la lipoxygénase du soja en ayant recours au protocole décrit par Van der Mer et Duine.

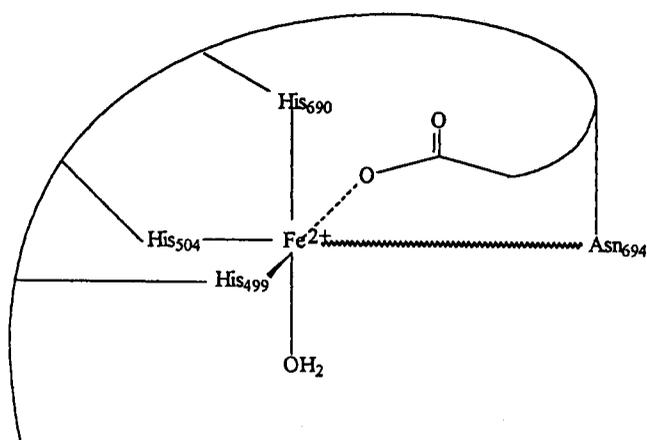


Figure 6. Insertion du fer au sein du site actif de la lipoxygénase (d'après Scarrow, 1993) — *Insertion of iron in the lipoxygenase active site.*

**Réaction d'oxydation primaire.** Comme présenté au point ci-dessus, l'amorce de la réaction nécessite l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique par l'hydroperoxyde. L'enzyme activé peut alors se lier au substrat adéquat et oxyder le système (Z)-1,(Z)-4-pentadiénique.

La première étape consiste en l'éjection d'un hydrogène en position 3. La formation du radical pentadiényle est accompagnée de la réduction du fer ferrique en fer ferreux. Ensuite, le radical pentadiényle réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde. Le cycle est complété par la réduction du radical peroxyde en anion peroxyde moyennant l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique. L'anion peroxyde est alors libéré de l'enzyme et est neutralisé par un proton (Figure 7) (Chism, 1985 ; Siedow, 1991).

La caractéristique essentielle de ce cycle par rapport au cycle anaérobie décrit ci-après est le fait que la fixation de l'oxygène se produit alors que le substrat se trouve au sein de l'enzyme.

Ce mécanisme réactionnel a pu être établi notamment grâce aux recherches de Dolev *et al.* (1967) qui ont montré que l'oxygène incorporé dans la fonction hydroperoxyde provenait de l'oxygène dissous dans la phase aqueuse et non de l'oxygène présent dans les molécules d'eau elles-mêmes. Egmond *et al.* (1972) ont prouvé que le facteur limitant de la catalyse enzymatique était l'abstraction de l'hydrogène et non la fixation de l'oxygène.

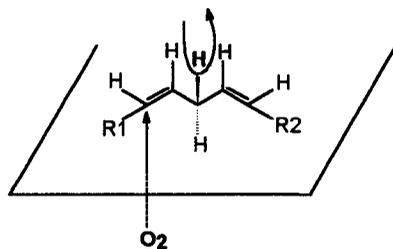
Cette relation antarafaciale entre l'abstraction d'un proton méthylénique et l'attaque de l'oxygène est présentée à la figure 8. L'atome d'hydrogène pro S se situe au dessus du plan du système pentadiényle et l'atome d'hydrogène pro R en dessous. L'attaque de l'oxygène par le dessous génère un 13-hydroperoxyde de configuration S.

Le fait que la phase d'induction de la catalyse soit quasi éliminée lorsque la réaction a lieu en présence d'hydroperoxydes a conduit Smith et Lands (1972) à conclure que l'enzyme possède un site de fixation pour les produits de la réaction.

**Réaction d'oxydation secondaire.** En 1971, Garssen *et al.* ont démontré que l'acide linoléique et le 13-hydroperoxyde de cet acide pouvaient subir une réaction "anaérobie" catalysée par la lipoxygénase du soja. Cette réaction conduit à la formation d'acides oxodiénoïques, du pentane et des dimères de l'acide linoléique (Figure 7).

Il a été rapidement démontré que la concentration en oxygène n'était pas la condition nécessaire à la réalisation d'un cycle plutôt que l'autre. Pour la Lox-1, la réaction secondaire est amorcée par un déficit en oxygène alors que la Lox-3 présente une activité catalytique élevée pour ce second cycle quelle que soit la concentration en oxygène. Malgré les preuves expérimentales, ce cycle a gardé le nom de "cycle anaérobie" par opposition au cycle principal appelé "cycle aérobie".





**Figure 8.** Relation antarafaciale entre l'arrachement d'un proton et l'attaque de l'oxygène lors de la catalyse par la Lox-1 (d'après Egmond *et al.*, 1972) — *Antarafacial relation between proton abstraction and hydrogen insertion during Lox-1 catalysis.*

Le cycle secondaire se distingue du cycle primaire par le fait que le radical se détache de l'enzyme avant que l'oxygène n'ait pu s'y fixer. Les deux cycles se trouvent toujours en concurrence.

En plus des cycles aérobie et anaérobie, des réactions de dégradation non-enzymatiques sont possibles surtout si l'oxygène n'est pas disponible dans le milieu. Ces réactions conduisent à la formation de radicaux responsables de l'oxydation des pigments (chlorophylle et caroténoïde). C'est la Lox-2 qui est la plus active dans cette voie (Garsen *et al.*, 1971 ; De Groot *et al.*, 1973 ; De Groot *et al.*, 1975 ; Chism, 1985 ; Gardner, 1989 ; Gardner, 1991 ; Siedow, 1991 ; Hatanaka, 1993 ; Van der Heijdt *et al.*, 1993).

Dans certaines circonstances, on peut observer l'incorporation d'une seconde molécule d'oxygène et la formation de dihydroperoxydes. Le produit majoritairement obtenu à partir d'acide linoléique pour la lipoxygénase du soja est le 9,16-dihydroperoxyde (Van Os *et al.*, 1981 ; Sok, Kim, 1990, 1994).

### Structure tridimensionnelle de la Lox-1

La Lox-1 est constituée de 839 résidus acides aminés répartis en deux domaines.

Le plus petit domaine, amino-terminal, comprend 146 résidus et est constitué d'un enroulement de huit brins  $\beta$  antiparallèles qui forment un tonneau. Ce domaine est hydrophobe et est totalement séparé du reste de la molécule. Cette partie de l'enzyme ne possède aucune analogie avec les lipoxygénases animales.

Le second domaine, carboxy-terminal, comprend 693 résidus composant 23 hélices et deux feuilletts  $\beta$  antiparallèles. Parmi ces hélices, 17 sont parallèles ou antiparallèles à chacune des autres positionnées autour d'une hélice centrale de 43 résidus. Le site actif de l'enzyme se situe au centre de ce second domaine.

Le domaine catalytique présente deux cavités qui mènent à la surface du site actif enseveli. La première est

hydrophobe et mesure approximativement 1,8 nm de long. Elle se rétrécit à une largeur de 0,25 nm près de l'atome de fer. La deuxième plus longue (4,0 nm), ressemble à un canal à deux coudes, le premier étant situé au milieu de la cavité tandis que le second est adjacent au fer. Les 46 acides aminés qui composent la cavité sont principalement hydrophobes. C'est au niveau de celle-ci que se place l'acide gras (Boyington *et al.*, 1993a, 1993b ; Nelson, Seitz, 1994 ; Martini, Iacazio, 1995).

À l'heure actuelle, les séquences de plus de vingt lipoxygénases animales et végétales ont été déterminées (pour revue voir Boyington *et al.* (1993b) et Van Mechelen *et al.* (1995)). En comparant ces séquences, on peut noter trois régions hautement conservées :

- un groupe de 387 acides aminés dont cinq histidines en milieu de chaîne (His 494, 499, 504, 522 et 531 de la Lox-1) ;
- un résidu histidine à environ 190 acides aminés du groupe précédent (His 690 de la Lox-1) ;
- une séquence terminale de cinq acides aminés (Asn-Ser-Ile-Ser-Ile 839 de la Lox-1).

### Inhibition de la lipoxygénase

L'inhibition de la Lox-1 par diverses molécules a fait l'objet d'études approfondies dont le but principal est une meilleure compréhension des mécanismes réactionnels. On peut classer ces inhibiteurs en trois grandes catégories.

**Inhibiteurs se fixant au niveau du site actif.** Ce type de molécules se fixe directement au niveau du site actif ou libère des produits qui s'y fixent par la suite.

On peut citer les acides gras acétyléniques (acide 5, 8, 11, 14 eicosatétraénoïque) qui transfèrent l'oxygène du groupement hydroperoxyde formé à une méthionine essentielle du site actif (Kuhn *et al.*, 1984).

L'acide 13-thioarachidonique et l'acide 12-méthylène-(Z)-10,13-nonadécadiénoïque ne possèdent pas d'hydrogène labile et se fixent au site actif en inhibant irréversiblement l'enzyme (Corey *et al.*, 1986 ; Corey, d'Alarcao, 1986).

Kuninori *et al.* (1992) ont étudié l'inhibition de la Lox-1 du soja par des n-alcools et n-alkylthiols possédant de 2 à 12 atomes de carbone. Une inhibition compétitive est observée avec les n-alcools, l'effet augmentant en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée jusqu'aux molécules présentant 8 atomes de carbone. Les alkylthiols inhibent l'enzyme de façon non-compétitive et ceci indépendamment du nombre de carbone. Les alcools se fixent au site actif par leur partie hydrophobe ; les alkylthiols fixent leur groupement sulfhydryle à une région polarisable de l'enzyme et leur partie alkyle à une région hydrophobe (sans doute à une tyrosine).

Srinivasulu et Rao (1995) ont montré que les alcools jusqu'au terme en C-6 provoquent une inhibition de type

mixte alors que pour les molécules possédant de 6 à 12 atomes de carbone, il s'agit d'une inhibition compétitive. Une ou deux molécules d'alcool inactiveraient dans un premier temps la Lox-1 sans modifier sa structure (fixation proche du site actif). Dans un second temps, d'autres molécules d'alcool se fixeraient et modifieraient la structure tertiaire.

Nishiyama *et al.* (1993) ont étudié l'effet d'esters de sucrose et d'acides gras (acides gras du C-8 au C-16). L'inhibition est compétitive et voit son effet s'accroître jusqu'au C-12 puis se stabiliser. L'ester de sucrose et d'acide gras se fixe au site catalytique par interaction hydrophobe.

Rotenberg *et al.* (1988) ainsi que Clapp *et al.* (1995) ont montré que l'acide 12-iodo-*cis*-9-octodécénoïque était utilisé comme substrat par la Lox-1 conduisant à l'élimination de l'iode. L'enzyme se trouve irréversiblement inhibé par un radical libéré lors de la réaction.

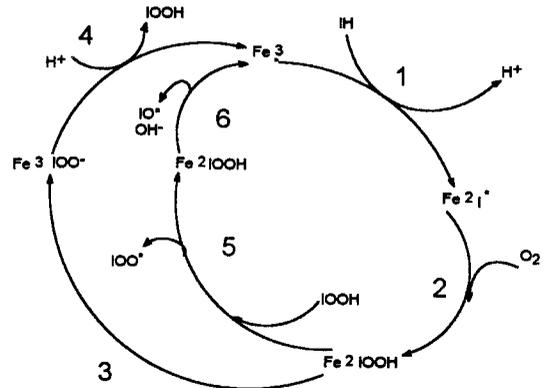
Si une faible concentration en hydroperoxydes est nécessaire pour amorcer la catalyse enzymatique, à de plus grandes concentrations, un effet inhibiteur est obtenu. Il s'agit d'une inhibition réversible et compétitive, le produit se fixant à l'enzyme en lieu et place du substrat. Le 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique présente un effet plus marqué que le 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique (Fauconnier, Marlier, 1996).

**Inhibiteurs agissant sur l'atome de fer du site actif.** Une autre classe d'inhibiteurs agit sur le fer du site actif soit en le chélatant soit en le réduisant en fer ferreux inactif (enzyme natif). Dans ce dernier cas, l'inhibition est levée par l'ajout d'hydroperoxydes qui réoxydent le  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ .

Clapp *et al.* (1985) ont ainsi montré que les *n*-alkylhydroxylamines étaient des inhibiteurs puissants de la Lox-1 avec un effet optimal pour la *n*-octylhydroxylamine et la décylhydroxylamine. Les catécholates et notamment l'acide nordihydroguaiarétique et différents antioxydants dont le butyl hydroxytoluène et l' $\alpha$ -tocophérol inhibent également l'enzyme en réduisant le fer du site actif en  $Fe^{2+}$  inactif. (Kemal *et al.*, 1987 ; Nelson, 1988 ; Van der Zee *et al.*, 1989).

Bombard *et al.* (1993) proposent un schéma explicatif de l'inhibition de la Lox-1 par la phénylhydrazone de l'hexanal. Galey *et al.* (1988) avaient montré que ce composé se comportait comme un inhibiteur suicide car l' $\alpha$ -azo-hydroperoxyde formé se fixait au niveau du site actif. Bombard et son équipe ont montré que le radical hydroperoxyde formé pouvait se détacher du site actif et réoxyder l'enzyme (**Figure 9**).

Desmarais *et al.* (1994) proposent également un schéma expliquant l'inhibition de la Lox-1 par un agent réducteur, la diaryl-*n*-hydroxyurée. Les auteurs parlent d'une réaction "pseudoperoxydase". En fait, l'enzyme oxydé réagit avec la *n*-hydroxylurée. Ce dernier composé est oxydé en radical nitroxyde en provoquant la réduction de l'enzyme en une



**Figure 9.** Inhibition de la Lox-1 par la phénylhydrazone de l'hexanal (d'après Bombard *et al.*, 1993) — *Inhibition of Lox-1 by hexanal phenylhydrazone.* IH = phénylhydrazone ; IOOH = hydroperoxyde de phénylhydrazone ; cycle 1, 2, 3, 4 = cycle classique ; cycle 1, 2, 5, 6 = détachement du radical IOO<sup>•</sup> et réoxydation du fer.

forme inactive. Le radical nitroxyde peut être recyclé en étant réduit par un groupement thiol.

Les agents chélatants du fer seul ne provoquent qu'une faible inactivation de la Lox-1 (Weyd *et al.*, 1992). Par contre, si un agent réducteur y est associé, une forte inhibition de cet enzyme due à la complexation du fer ferreux apparaît.

Les chélatants du fer ferrique (tirone) montrent un effet inhibiteur plus important après addition de substrat. Ceci est sans doute dû à l'effet oxydant de l'hydroperoxyde produit. L'utilisation d'agents réducteurs et oxydants seuls ne provoque qu'une faible inhibition.

**Inhibiteurs de radicaux libres.** La Lox-1 voit son activité catalytique réduite en présence d'inhibiteurs de radicaux libres tels que les flavonoïdes (Baumann *et al.*, 1980).

Maccarone *et al.* (1995) ont étudié l'effet de différents antioxydants (acide ascorbique, acide-6-palmitoyle ascorbique et trolox) sur la catalyse de la Lox-1. Ces derniers composés agissent de façon compétitive, complète et réversible mais sans réduire le fer ferrique. Leur action serait due à deux phénomènes : le piégeage de radicaux libres et l'interaction dans le "tunnel" du site actif en formant un complexe inactif.

### La lipoxigénase et les agents tensioactifs

Lors d'études d'activité, les substrats de la lipoxigénase étant peu solubles dans l'eau, on a régulièrement recours à des tensioactifs de façon à réaliser une émulsion de l'acide gras dans le milieu réactionnel. C'est pour cette raison que ce point particulier a retenu l'attention de divers auteurs.

L'activité catalytique de la Lox-1 a ainsi été étudiée au sein de micelles inverses formées à l'aide de bis (2-éthyl-

hexyl) sulfosuccinate de sodium, d'octane et d'eau (Shkarina *et al.*, 1992). Une inhibition de l'enzyme par le tensioactif est observée mais l'étude des produits formés montre que c'est le 2-(S)-hydroperoxyde qui est majoritairement synthétisé (comme lorsque la synthèse a lieu en phase aqueuse). Le substrat et l'enzyme ont été localisés dans les micelles inverses avec cependant quelques molécules d'acide gras dans la phase organique. Le mécanisme proposé est le suivant : l'acide gras se trouverait dans le tensioactif et passerait dans la phase aqueuse intérieure lors de la réaction. En effet, si la réaction avait lieu directement dans la membrane, le groupement COOH serait accessible facilement et on obtiendrait du 9-hydroperoxyde.

Piazza *et al.* (Piazza, 1992 ; Piazza *et al.*, 1994) ont testé la conversion de l'acide linoléique en hydroperoxydes dans des microémulsions contenant de l'eau, un tensioactif et un solvant organique. Les meilleurs résultats ( $143 \mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1}$ ) ont été obtenus à pH 9,0 avec un rapport eau/solvant de 100 en présence de Nonidet P40 (2,36 mM). Le solvant utilisé est le 2,2,4-triméthylpentane mais son remplacement par du toluène, du trifluoroéthane, du cyclohexane, de l'éther isopropylique ou de l'octane n'a que peu d'influence sur les rendements de réaction.

Srinivasulu et Rao (1993) observent que, pour de faibles concentrations en tensioactifs, il y a une augmentation de l'activité corrélée avec une stabilisation de la structure des protéines. À des concentrations plus élevées, un effet inhibiteur est obtenu avec, dans l'ordre croissant d'inhibition : bromure de cétyltriméthylammonium > Tween 20 > dodécyl sulfate de sodium > Brij 35 > sel sodique de l'acide désoxycholéique. Des études de conformation ont montré que les tensioactifs affectaient seulement l'affinité de l'enzyme pour son substrat et non le nombre de sites de fixation.

L'étude de l'effet de détergents non-ioniques (Lubrol, Tween 20, Triton X-100) sur la cinétique de la catalyse enzymatique de la Lox-1 et de la Lox-2 montre que ceux-ci ralentissent la réaction sauf lorsque la concentration en substrat est telle qu'elle inhibe l'enzyme. L'analyse des résultats montre que la lipoxygénase agit sur l'acide gras libre et non avec l'acide gras présent au sein des micelles. Il s'établit un équilibre simple entre l'acide gras libre et inclus, le tensioactif se comportant comme un inhibiteur compétitif (Schilstra *et al.*, 1994b).

### Immobilisation de la lipoxygénase

Compte tenu des rôles importants de la lipoxygénase, que ce soit en physiologie végétale, en technologie agroalimentaire, en biotechnologie, de nombreux auteurs ont tenté de l'immobiliser afin de l'étudier et surtout de la réutiliser.

Une des premières immobilisations a été effectuée par Allen (1968) sur de la laine de verre et par Graveland en 1970 sur la gluténine.

Par la suite, Grossman *et al.* (1972) ont fixé la lipoxygénase sur de l'agarose avec une perte d'activité de 25 % par rapport à l'enzyme libre. Le temps de conservation de l'enzyme se trouve accru, le recyclage n'a pas été testé.

Parra-Diaz *et al.* (1993) ont repris cette étude ; ils ont obtenu une liaison lipoxygénase-matrice vingt fois plus stable. L'enzyme conserve son activité spécifique pendant six mois à 5°C et peut être recyclé sept fois sans perte d'activité. L'activité spécifique de l'enzyme immobilisé est cependant 15 fois plus faible que celle de l'enzyme libre.

Cardillo *et al.* (1983) ont utilisé du sépharose en fixant l'enzyme avec du bromure de cyanogène. L'enzyme a un temps de vie limité dans une telle structure et des pertes d'activité importantes sont observées lors d'un travail en continu. D'autre part, le pourcentage d'enzyme fixé est faible (de 19 à 33 %).

Une membrane d'acétate de cellulose a été utilisée par Cardillo et Fedeli (1991). Cette technique simple et peu coûteuse protège l'enzyme lors du stockage (perte d'activité de 20 % en deux mois). L'enzyme ainsi conditionné a pu être recyclé avec succès mais une production en continu est impossible à obtenir du fait de l'inactivation de l'enzyme par les hydroperoxydes accumulés dans le milieu réactionnel. De très bons résultats ont également été obtenus avec de la cellulose greffée (DEAE) même si l'activité de l'enzyme immobilisée y est inférieure à celle de l'enzyme libre (Cuperus *et al.*, 1995).

Si le talc (silicate de magnésium) a donné de bons résultats avec diverses lipoxygénases végétales (Battu *et al.*, 1994), il n'en est pas de même avec le soja (Chebli, 1993). La stabilité de l'enzyme se trouve encore une fois augmentée mais pas l'activité spécifique. Dans les conditions optimales, on conserve 70 % du pouvoir catalytique lors de l'immobilisation. L'enzyme peut être réutilisé sept fois sans perte d'activité importante et peut surtout servir à des synthèses en milieu organique.

Il ressort des études précitées que le facteur limitant l'utilisation de la lipoxygénase immobilisée serait un problème de diffusion du substrat jusqu'au site actif de l'enzyme.

### LA LIPOXYGÉNASE DU SOJA DANS L'INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE

Dès 1934, Haas et Bohn ont montré que l'on pouvait utiliser de la farine de soja pour blanchir la farine de blé lors de la fabrication du pain. Par la suite, le rôle de la lipoxygénase dans la cooxydation des pigments a été éclairci.

On a, dès cette époque, évoqué les problèmes causés par une odeur de "haricot" lorsque l'on utilisait des proportions plus importantes de farine de soja. Dans les années 60, l'utilisation du soja en tant que source de protéines dans des produits tels que le lait de soja ou des substituts de viande, s'est heurtée à ce problème d'odeurs

indésirables qui est associé à l'oxydation des matières grasses par la lipoxygénase (Eskin *et al.*, 1977 ; Wilkens *et al.*, 1967).

Différents procédés technologiques tels que le chauffage ou des traitements alcalins ont été développés afin d'inactiver l'enzyme (Wolf, 1975). Un traitement par micro-ondes est également très efficace pour dénaturer la lipoxygénase (Kermasha *et al.*, 1993).

Chapman *et al.* (1976) ont montré l'influence de la sélection génétique sur l'activité enzymatique de la lipoxygénase et donc la possibilité d'améliorer les qualités technologiques des farines de soja en réalisant une sélection rigoureuse des cultivars les plus intéressants.

Récemment, des mutants n'exprimant pas un ou plusieurs isoenzymes de la Lox ont été obtenus par croisement (Moreira *et al.*, 1993). Ainsi, Hildebrand et Hymowitz (1981, 1982) ont sélectionné des lignées mutées n'exprimant pas soit la Lox-1, soit la Lox-2, soit la Lox-3. Kitamura *et al.* (1983) ont obtenu le même résultat pour la Lox-1, Davies et Nielsen (1986) pour la Lox-2, Kitamura *et al.* (1983), pour la Lox-3. Des lignées doublement mutées pour la Lox-1 et Lox-3 ou pour la Lox-2 et Lox-3 ou encore pour la Lox-1 et Lox-2 (Takamura *et al.*, 1991) ont été décrites. Hajika *et al.* (1991) ainsi que Kobayashi (1995) ont pu produire une variété de soja n'exprimant aucun des trois isoenzymes précités.

L'étude de la production de composés aromatiques (sans ajout d'acide gras) a démontré que c'est la Lox-2 qui est majoritairement responsable de la production d'hexanal. C'est ce dernier composé qui est responsable de l'odeur de "haricot" que l'on cherche à éviter dans les produits dérivés du soja (Addo *et al.*, 1993 ; Fukushima, 1994).

## LA LIPOXYGÉNASE, OUTIL BIOTECHNOLOGIQUE

S'il est vrai que la lipoxygénase occasionne de nombreux désagréments dans les industries agroalimentaires, il est par contre intéressant d'en tirer profit pour produire des molécules aromatiques. En effet, ces aldéhydes (dont l'hexanal) si gênant dans les produits issus du soja sont très recherchés par les aromaticiens.

Au cours des vingt dernières années, l'industrie des arômes a connu d'importantes mutations tant qualitatives que quantitatives. Les préparations aromatisantes sont ajoutées de plus en plus souvent aux produits alimentaires suite aux détériorations organoleptiques engendrées par les traitements technologiques (pasteurisation, lyophilisation, etc.).

Si, au départ, de nombreux arômes étaient synthétiques c'est-à-dire issus de la synthèse chimique, il n'en est plus rien aujourd'hui car la pression des consommateurs est telle que les produits naturels sont de plus en plus recherchés.

L'utilisation et la fabrication d'arômes sont régis par des directives et règlements européens. Dans ce cadre

légal, des arômes produits par voie biotechnologique (micro-organismes, enzymes notamment) sont considérés comme naturels si les matières premières le sont (*Journal Officiel des Communautés Européennes*, n°L 184161–65, juin 1988).

Il est judicieux de tirer profit du système de dégradation enzymatique des acides gras polyinsaturés pour obtenir des arômes naturels qui seront vendus jusqu'à cent fois plus cher que leurs homologues synthétiques.

Si on se réfère à la **figure 2**, on voit que différents alcools et aldéhydes peuvent être obtenus suite à l'action compétitive de plusieurs enzymes (lipoxygénase, hydroperoxyde lyase, alcool dehydrogénase, isomérase). Le **tableau 3** présente ces molécules, leur flaveur, leurs domaine et dose d'utilisation ainsi que leur prix. Parmi ces composés, deux sont particulièrement recherchés : le *cis*-3-hexénol et le *trans*-2-hexénal respectivement appelés alcool et aldéhyde de feuilles. Ces deux molécules ont un prix de vente élevé et sont d'une utilisation universelle comme "note verte".

Un certain nombre de brevets et de publications ont pour but l'étude de ces productions enzymatiques. Ainsi, un brevet a été déposé par Kanisawa *et al.* en 1988 (US Patent 4,769,243). Les auteurs utilisent des graines de soja moulues et y ajoutent des acides gras tout en oxygénant. Le mélange est alors distillé. Les rendements de production et la pureté des produits obtenus sont faibles.

Goers *et al.* (1989) (US Patent 4,806,379) utilisent quant à eux des feuilles de fraisier en lieu et place du soja. Ce processus fournit également un mélange de molécules à note verte.

Pernod Ricard (brevet français 8912901) décrit en 1989 un système de production de *cis*-3-hexénol à l'aide de feuilles de radis et de levure de boulangerie. Les rendements obtenus avoisinent les 300 mg par kg de feuilles.

Iacazio *et al.* (1990) ont obtenu de hauts rendements de production de 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique en utilisant de la lipoxygénase de soja commerciale et de l'acide linoléique dans un réacteur sous pression d'oxygène (400 kPa). En une heure, 80 % de l'acide gras (22 g · L<sup>-1</sup>) est transformé fournissant 96 % de l'isomère 13.

En 1993, la société Firmenich a déposé un brevet international (PCT/EP 93/01057) concernant la production d'aldéhydes et d'alcools aliphatiques. Le procédé décrit est le suivant : la source de lipoxygénase est de la farine de soja, celle de lyase un homogénat de goyave ; la levure de boulangerie est utilisée comme réductase. Selon que l'on utilise de l'acide linoléique ou linoléique et selon la cascade de réactions enzymatiques choisies, on obtient : de l'hexanal, de l'hexanol, du *trans*-2-hexénal ou du *cis*-3-hexénol. La source d'acide linoléique est l'huile de tournesol hydrolysée, celle d'acide linoléique, l'huile de lin hydrolysée. Ces résultats se trouvent également consignés dans les publications de Whitehead *et al.* (1995) et de Müller *et al.* (1995). Les rendements obtenus varient entre

**Tableau 3.** Les molécules à note verte : flaveur, utilisation et dosage (Arctander, 1969) ; les prix mentionnés sont ceux du marché 1996 (1 USD = 32 BEF) — *Green note molecules : flavor, use and dosage. The prices mentioned are the market prices 1996.*

Nom	Flaveur	Utilisation	Concentration (ppm)	Prix (BEF par kg)
<i>Cis</i> -3-hexéнал	Note verte	Arôme d'herbe, fleur, fruit	0,2-5	
<i>Trans</i> -2-hexéнал	Note verte, fruitée, piquante	Arôme de fleur, de fruit (banane, pomme, etc.)	0,7-20	143 000 Pureté 90 %
<i>Trans</i> -2-hexéanol	Fruit vert, caramel, feuille de chrysanthème	Parfum de lavande, de géranium, floral ; arôme de fraise, menthe, jus d'orange	Traces	120 000 Pureté 90 %
<i>Cis</i> -3-hexéanol	Herbeux, vert, fruité	Huile essentielle de fleur, flaveur de menthe et de fruits	1-5	
n-hexanal	Herbeux, vert, si dilué : herbe coupée et fruits broyés	Remplacement des aldéhydes insaturés ; beurre, miel, fromage, rhum	1-5	
n-hexanol	Gras, fruité, vineux	Huiles essentielles (géranium) ; imite présence d'alcool ; fruits (noix de coco, etc.)		18 000 Pureté 90 %
<i>Cis</i> -3- <i>cis</i> -6-nonadiéнал	Légume vert ; feuille de violette (faible concentration) ; beurre (forte concentration)	Base de concombre, de violette, narcisse ; redonne la fraîcheur aux légumes séchés	< 1	
<i>Cis</i> -3- <i>cis</i> -6-nonadiéanol	Odeur verte de feuillage, d'herbage	Base de violette, de narcisse ; concombre, muguet, cyclamen, pomme verte	0,01-0,05	
<i>Cis</i> -3-nonéнал		Pas d'application connue		
<i>Trans</i> -2-nonéanol		Boissons non-alcoolisées, glaces, soupes	0,15-0,2	
<i>Cis</i> -3-nonéнал	Floral, peu fruité	Parfumerie		
<i>Trans</i> -2-nonéнал	Floral, note verte légère	Savon	200-300	
2,4-décadiéнал	Orange	Orange amère, citron, pamplemousse		

0,9 et 5 g de molécules à note verte par kg de milieu réactionnel.

Piazza *et al.* (1994) synthétisent des hydroperoxydes en présence de solvant organique à l'aide d'une lipoxygénase immobilisée. Le milieu est constitué d'octane et d'eau (35/65). Les rendements obtenus atteignent 80 % en deux heures avec une pureté de 97 % pour le 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique ( $0,76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Drouet *et al.* (1994) produisent des hydroperoxydes dans un réacteur biphasique eau/octane (8/1) avec des rendements de conversion plus élevés que dans la synthèse classique en milieux aqueux. Ceci est particulièrement marqué pour les concentrations élevées en substrat ( $> 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). À de telles concentrations, l'acide gras a tendance à s'agréger ce qui n'est pas le cas dans un système biphasique. Il est à noter que la stéréochimie des produits formés n'est pas affectée par la présence de solvants organiques.

## CONCLUSION

Les lipoxygénases du soja ont fait et font l'objet de très nombreuses publications. Les mécanismes réactionnels sont à l'heure actuelle bien connus. Pour la Lox-1, la structure tridimensionnelle a été élucidée récemment permettant de mieux comprendre encore la catalyse enzymatique.

Il reste cependant plusieurs points à élucider quant aux rôles physiologiques joués par le système de dégradation enzymatique des acides gras polyinsaturés. Dans ce domaine, les informations disponibles sont parfois contradictoires puisqu'il est question de l'implication du système enzymatique aussi bien dans des phénomènes de croissance que de sénescence.

La sélection génétique de lignées mutées n'exprimant aucun des isoenzymes de la lipoxygénase laisse entrevoir

la perspective d'utiliser le soja dans diverses applications agro-alimentaires sans encourir les risques d'odeurs indésirables.

Pour la synthèse par voies biotechnologiques de molécules à note verte, le soja fournit une source peu onéreuse de lipoxygénase spécifiques pour la synthèse de 13-hydroperoxydes.

## Bibliographie

- Addo K, Burton D, Stuart MR, Burton HR, Hildebrand DF (1993). Soybean flour lipoxygenase isozymes mutant effects on bread dough volatiles. *J. Food Sci.* **58** (3), 583–586.
- Allen JC (1968). Soybean lipoxygenase-1. Purification and the effect of organic solvents upon kinetics of the reaction. *Eur. J. Biochem.* **4**, 201–208.
- Altschuler M, Collins GB, Hildebrand DF (1989). Developmental expression of lipoxygenases in soybeans. *Plant Sci.* **63**, 151–158.
- André E, Hou KW (1932). The presence of a lipid oxidase in soy bean, *Glycine soya*, Lieb. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* **194**, 645–647.
- Arctander S, ed. (1969). "Perfume and flavor chemicals". Montclair NJ.
- Axelrod B, Cheesbrough TM, Laakso S (1981). Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol.* **71**, 441–446.
- Balls AK, Axelrod B, Kies MW (1943). Soybean lipoxydase. *J. Biol. Chem.* **149**, 491–504.
- Battu S, Rabinovitch-Chable H, Beneytout JL (1994). Effectiveness of talc as adsorbent for purification and immobilization of plant lipoxygenases. *J. Agric. Food Chem.* **42** (10), 2115–2119.
- Baumann J, Bruchausen F, Wurm G (1980). Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins* **20**, 627–629.
- Beneytout JL, Andrianarison RH, Rakotoarisoa Z, Tixier M (1989). Properties of a lipoxygenase in blue-green algae (*Oscillatoria* sp.). *Plant Physiol.* **91**, 367–372.
- Bild GS, Ramadoss CS, Axelrod B (1977). Effect on substrate polarity on the activity of soybean lipoxygenase isoenzymes. *Lipids* **12**, 732–737.
- Bombard S, Chopard-Casadevall C, Chottard JC (1993). A new peroxidase pathway for soybean lipoxygenase-1. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **130**, 417–427.
- Boyer RF, Litts D, Kostishak J, Wijesundera RC, Gunstone FD (1979). The action of soybean lipoxygenase-1 on furan derivatives. *Chem. Phys. Lipids* **25**, 237–240.
- Boyington JC, Gaffney BJ, Amzel LM (1993a). Structure of soybean lipoxygenase-1. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 744–748.
- Boyington JC, Gaffney BJ, Amzel LM (1993b). The three dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* **260**, 1482–1486.
- Bundy GL, Nidy EG, Epps DE, Mizesak SA, Wnuk RJ (1986). Discovery of an arachidonic acid C-8 lipoxygenase in the gorgonian coral *Pseudoplexaura porosa*. *J. Biol. Chem.* **261** (2), 747–751.
- Cardillo M, Lanzani A, Fedeli E, Anguiuro L (1983). Sintesi e caratterizzazione di lipossigenasi immobilizzata da impiegare nella perossidazione di acidi grassi poli-insaturi. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **60** (8), 477–482.
- Cardillo M, Fedeli E (1991). Preparation of linoleic acid hydroperoxides by immobilized lipoxygenase. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **68** (5), 1013–1018.
- Chan HWS (1973). Soy-bean lipoxygenase, an iron containing dioxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* **327**, 32–35.
- Chapman GW, Robertson JA, Burdick D (1976). Chemical composition and lipoxygenase activity in soybeans as affected by genotype and environment. *J. Am. Oil Chemist. Soc.* **53**, 54–56.
- Chebli C (1993). Interactions talc/enzymes : réactivité de la lipoxygénase du soja et de la chloroperoxydase de *Caldariomyces fumago* adsorbées en milieu aqueux et organique, thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Chism GW (1985). Soy lipoxygenase. In "Flavor chemistry of fats and oils" (D.B. Min, T.H. Smouse, eds.), pp. 175–187. American Oil Chemists Society, Champaign IL.
- Christopher J, Pistorius T, Axelrod B (1970). Isolation of an isoenzyme from soybean lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* **198**, 12–18.
- Christopher J, Pistorius T, Axelrod B (1972). Isolation of a third isoenzyme from soybean lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* **284**, 54–62.
- Clapp CH, Grandizio AM, Mc Askill SA, Moser R (1995). Action of soybean lipoxygenase on 12-iodo-*cis*-9-octadecenoic acid and 12-bromo-*cis*-9-octadecenoic acid. *Biochemistry* **34** (1), 264–272.
- Clapp CH, Banerjee A, Rotenberg SA (1985). Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by *n*-alkylhydroxylamines. *Biochemistry* **24**, 1826–1830.
- Corey EJ, d'Alarcao M (1986). A new irreversible inhibitor of soybean lipoxygenase: relevance to mechanism. *Tetrahedron Lett.* **27** (31), 3589–3590.
- Corey EJ, d'Alarcao M, Matsuda SPT (1986). A new irreversible inhibitor of soybean lipoxygenase. *Tetrahedron Lett.* **27** (31), 3585–3588.
- Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE (1992). Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4938–4941.
- Croft KPC, Jüttner F, Slusarenko AJ (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolitica*. *Plant Physiol.* **101**, 13–24.
- Cuperus FP, Kramer GFH, Derksen JTP, Bouwer ST (1995). Activity of immobilized lipoxygenase used for the formation of perhydroxyacids. *Catal. Today* **25**, 441–445.
- Daniel R, Dorizon J, Deprez D (1994). Determination of lipoxygenase activity by continuous flow amperometric detection. *Anal. Biochem.* **219**, 154–155.
- Datcheva VK, Kiss K, Solomon L, Kyler KS (1991). Asymmetric hydroxylation with lipoxygenase: the role of group hydrophobicity on regioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 270–274.
- Davies CS, Nielsen NC (1986). Genetic analysis of a null allele for lipoxygenase-2 in soybean. *Crop Sci.* **26**, 460–463.
- De Groot IMC, Garssen GJ, Vliegenthart JFG, Boldingh J (1973). The detection of linoleic acid radicals in the anaerobic reaction of lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 279–284.

- De Groot IMC, Veldinck GA, Vliegthart JFG, Boldingh J, Wever R, Van Gelder BF (1975). Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxigenase-1. *Biochim. Biophys. Acta* **377**, 71–78.
- Desmarais SR, Riendeau D, Gresser MJ (1994). Inhibition of soybean lipoxigenase-1 by n-diaryl-n-hydroxyurea by reduction of the ferric enzyme. *Biochemistry* **33**, 13391–13400.
- Dolev A, Rohwedder WK, Dutton HJ (1967). Mechanism of lipoxidase reaction. I. Specificity of hydroperoxidation of linoleic acid. *Lipids* **2**, 28–32.
- Drouet P, Thomas D, Legoy MD (1994). Production of 13(S)-hydroperoxy-9(Z), 11(E)-octadecanoic using soybean lipoxigenase 1 in a biphasic octane-water system. *Tetrahedron Lett.* **35** (23), 3923–3926.
- Egmond MR, Vliegthart JFG, Boldingh J (1972). Stereospecificity of the hydrogen abstraction at carbon atom n-8 in the oxygenation of linoleic acid by lipoxigenase from corn germs and soya beans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 1055–1060.
- Ehret R, Schab J, Weiler EW (1994). Lipoxigenase in *Bryonia dioica* Jacq. tendrils and cell cultures. *J. Plant Physiol.* **144** (2), 175–182.
- Eskin NAM, Grossman S, Pinsky A (1977). Biochemistry of lipoxigenase in relation to food quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (April), 1–40.
- Farmer EE, Ryan CA (1992). Octadecanoic precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**, 129–134.
- Fauconnier ML, Vanzeveren E, Marlier M, Lognay G, Wathélet JP, Séverin M (1995). Assessment of lipoxigenase activity in 35 plant species. *Grasas Aceites* **46** (1), 6–10.
- Fauconnier ML, Marlier M (1996). Purification of soybean lipoxigenase isoenzyme-1 and characterization of its inhibition by 13-hydroperoxides. *Grasas Aceites* **47** (sous presse).
- Finazzi-Agro A, Avigliano L, Veldinck GA, Vliegthart JFG, Boldingh J (1973). The influence of oxygen on the fluorescence of lipoxigenase. *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 462–470.
- Fukushima D (1994). Recent progress on biotechnology of soybean proteins and soybean protein food products. *Food Biotechnol.* **8** (2–3), 83–135.
- Funk MO, Whitney MA, Hausknecht EC, O'Brien EM (1985). Resolution of the isoenzymes of soybean lipoxigenase using isoelectric focusing and chromatofocusing. *Anal. Biochem.* **146**, 246–251.
- Funk MO, André JC, Otsuki T (1987). Oxygenation of trans polyunsaturated fatty acids by lipoxigenase reveals steric features of the catalytic mechanism. *Biochemistry* **26**, 6880–6884.
- Galey JB, Bomard S, Chopart C, Girerd JJ, Lederer F, Thang DC, Nam NH, Mansuy D, Chottard JC (1988). Hexanal phenylhydrazone is a mechanism-based inactivator of soybean lipoxigenase-1. *Biochemistry* **27**, 1058–1066.
- Gardner HW (1989). How the lipoxigenase pathway affects the organoleptic properties of fresh fruits and vegetables. In "Flavor chemistry of lipids foods" (D.B. Min, T.H. Smouse, eds.), pp. 98–112. American Oil Chemists Society, Champaign IL.
- Gardner HW (1991). Recent investigations into the lipoxigenase pathway of plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1084**, 221–239.
- Garsen GJ, Vliegthart JFG, Boldingh J (1971). An aerobic reaction between lipoxigenase, linoleic acid and its hydroperoxides. *Biochem. J.* **122**, 327–332.
- Geerts A, Feltkamp D, Rosahl S (1994). Expression of lipoxigenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol.* **105** (1), 269–277.
- German JB, Kinsella JE (1986). Hydroperoxide metabolism in trout gill tissue: effect of glutathione on lipoxigenase products generated from arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **879**, 378–389.
- Graveland A (1970). Modification of the course of the reaction between wheat flour lipoxigenase and linoleic acid due to adsorption of lipoxigenase on glutenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41** (2), 427–434.
- Grayburn WS, Schneider GR, Hamilton-Kemp TR, Bookjans G, Ali K, Hildebrand DF (1991). Soybean leaves contain multiple lipoxigenases. *Plant Physiol.* **95**, 1214–1218.
- Grossman S, Trop M, Budowski P, Perl M, Pinsky A (1972). Properties of agarose-bound soya-bean lipoxigenase. *Biochem. J.* **127**, 909–910.
- Haas CW, Bohn R (1934). Bleaching bread dough. US Patent 1957333–1957337.
- Hajika M, Igita K, Kitamura K (1991). A line lacking all the seed lipoxigenase isoenzymes in soybean [*Glycine max* (L.)] induced by gamma-ray irradiation. *Jpn J. Breed.* **41**, 507–509.
- Hamberg M (1986). Isolation and structure of lipoxigenase products from *Saprolegnia parasitica*. *Biochim. Biophys. Acta* **876**, 688–692.
- Hammond EG, Duvick DN, Fehr WR, Hildebrand DF, Lacefield EC, Pfeiffer TW (1992). Rapid screening techniques for lipoxigenases in soybean seeds. *Crop Sci.* **32**, 820–821.
- Hatanaka A (1993). The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry* **34** (5), 1201–1218.
- Hatanaka A, Kajiwara T, Sekiya J (1987). Biosynthetic pathway for C-6 aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chem. Phys. Lipids* **44**, 341–361.
- Hatanaka A, Kajiwara T, Matsui K, Kitamura A (1992). Expression of lipoxigenase and hydroperoxide lyase activities in tomato fruits. *Z. Naturforsch.* **47** (c), 369–374.
- Hildebrand DF, Hymowitz T (1983). Lipoxigenase activities in developing and germinating soybean seeds with and without lipoxigenase-1. *Bot. Gaz.* **144**, 212–216.
- Hildebrand DF, Hymowitz T (1981). Two soybean genotypes lacking lipoxigenase-1. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 583–586.
- Hildebrand DF, Hymowitz T (1982). Inheritance of lipoxigenase-1 activity in soybean seeds. *Crop Sci.* **22**, 851–853.
- Hildebrand D (1989). Lipoxigenases. *Physiol. Plant.* **76**, 249–253.
- Iacazio G, Langrand G, Baratti J, Buono G, Triantaphylides C (1990). Preparative enzymatic synthesis of linoleic acid (13S)-hydroperoxide using soybean lipoxigenase-1. *J. Org. Chem.* **55**, 1690–1691.
- Kato T, Ohata H, Tanaka K, Shibata D (1992). Partial amino acid sequences of soybean lipoxigenase L-6 isolated from cotyledons. *Plant Physiol.* **98**, 324–330.
- Kemal C, Louis-Flambert P, Krupinski-Olsen R, Shorter AL (1987). Reductive inactivation of soybean lipoxigenase 1 by

- catechols: a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity. *Biochemistry* **26**, 7064–7072.
- Kermasha S, Bisakowski B, Ramaswamy H, Van de Voort FR (1993). Thermal and microwave inactivation of soybean lipoxygenase. *Lebensm. Wiss. Technol.* **26**, 215–219.
- Kitamura K, Davies CS, Kaizuma N, Nielsen NC (1983). Genetic analysis of a null allele for lipoxygenase-3 in soybean seeds. *Crop Sci.* **23**, 924–927.
- Kobayashi A, Tsuda Y, Hirata N, Kubota K, Kitamura K (1995). Aroma constituents of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] milk lacking lipoxygenase isoenzymes. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2449–2452.
- Koch RB, Stern B, Fenari CG (1958). Linoleic acid and trilinolein as substrates for soybean lipoxygenase(s). *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 165–168.
- Kondo Y, Kawai Y, Miyazawa T, Matsui H, Mizutani J. (1994). An assay for lipoxygenase activity by chemiluminescence. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58** (2), 421–422.
- Kramer JA, Johnson KR, Dunham WR, Sands RH, Funk MO (1994). Position 713 is critical for catalysis but not iron binding in soybean lipoxygenase-3. *Biochemistry* **33** (50), 15017–15022.
- Kubacka-Zebalska M, Kacperska-Palacz A (1980). Lipoxygenase, an enzyme involved in plant growth? *Physiol. Veg.* **18**, 339–347.
- Kuhn H, Holzthutter HG, Schewe T, Hiebsch C, Rapoport SM (1984). The mechanism of inactivation of lipoxygenases by acetylenic fatty acids. *Eur. J. Biochem.* **139**, 577–583.
- Kuhn H, Eggert L, Zabolotsky OA, Myagkova GI, Schewe T (1991). Keto fatty acids not containing allylic methylenes are lipoxygenase substrates. *Biochemistry* **30**, 10269–10273.
- Kuninori T, Nishiyama J, Shirakawa M, Shimoyama A (1992). Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by n-alcohols and n-alkylthiols. *Biochim. Biophys. Acta* **1125**, 49–55.
- Maccarone M, Veldink GA, Vliegthart JFG, Finazzi-Agro A (1995). Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by chain-breaking antioxidants. *Lipids* **30** (1), 51–54.
- Macri F, Braidot E, Petrusa E, Vianello A (1994). Lipoxygenase activity associated to isolated soybean plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1215**, 109–114.
- Martini D, Iacazio G (1995). Les lipoxygénases et les voies métaboliques associées. *Ol. Corps Gras Lipides* **2** (5), 374–385.
- Matsui K, Narahara H, Kajiwara T, Hatanaka A (1991). Purification and properties of lipoxygenase in *Marchantia polymorpha* cultured cells. *Phytochemistry* **30**, 1499–1502.
- Michaud-Soret I, Daniel R, Chopard C, Mansui D, Cucurou C, Ullrich V, Chottard JC (1990). Soybean lipoxygenase-1, 2a, 2b and 2c do not contain PQQ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172** (3), 1122–1128.
- Minor W, Steczko J, Bolin JT, Otwinowski Z, Axelrod B (1993). Crystallographic determination of the active site iron and its ligands in soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* **36**, 6320–6323.
- Mitsuda H, Yasumoto K, Yamamoto A (1967). Study of soybean lipoxygenase. I. Preparation of crystalline enzyme and assay by polarographic method. *Agric. Biol. Chem.* **31**, 115–118.
- Moreira MA, Tavares SR, Ramos V, Barros EG (1993). Hexanal production and TBA number are reduced in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds lacking lipoxygenase isoenzymes 2 and 3. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 103–106.
- Müller BI, Dean C, Whitehead IM (1995). ‘The industrial use of plant enzymes for the production of natural ‘green note’ flavour compounds. Bioflavour 95, Dijon, France, 14–17 février 1995’.
- Nellen A, Rojahn B, Kindl H (1995). Lipoxygenase forms located at the plant plasma membrane. *Z. Naturforsch. (c)* **50** (1–2), 29–36.
- Nelson MJ (1988). Catecholate complexes of ferric soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* **27**, 4273–4278.
- Nelson MJ, Seitz SP (1994). The structure and function of lipoxygenase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4** (6), 878–884.
- Nishiyama J, Shizu Y, Kuninori T (1993). Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by sucrose esters of fatty acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57** (4), 557–560.
- Park TK, Polacco JC (1989). Distinct lipoxygenase species appear in the hypocotyl/radicle of germinating soybean. *Plant Physiol.* **90**, 285–290.
- Parra-Diaz D, Brower DP, Medina B, Piazza G (1993). A method for immobilization of lipoxygenase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **18**, 359–367.
- Piazza GJ (1992). Lipoxygenase catalyzed hydroperoxide formation in microemulsions containing nonionic surfactant. *Biotechnol. Lett.* **14** (12), 1153–1158.
- Piazza GJ, Brower DP, Parra-Diaz D (1994). Synthesis of fatty acid hydroperoxide in the presence of organic solvent using immobilized lipoxygenase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19**, 243–252.
- Pistorius K, Axelrod B (1974). Iron, an essential component of lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* **262**, 3183–3186.
- Pourplanche C, Lambert C, Berjot M, Marx J, Chopart C, Alix AJP, Larreta-Garde V (1994). Conformational changes of lipoxygenase (Lox) in modified environments. *J. Biol. Chem.* **269** (50), 31585–31591.
- Rotenberg SA, Grandizio AM, Seltzer A, Clapp CH (1988). Inactivation of soybean lipoxygenase 1 by 12-iodo-*cis*-9-octadecenoic acid. *Biochemistry* **27**, 8813–8817.
- Roza M, Francke A (1973). Soybean lipoxygenase: an iron containing protein. *Biochim. Biophys. Acta* **327**, 24–31.
- Sanz LC, Perez AG, Olias JM (1992). La lipoxygenasa en el reino vegetal. II. Funciones fisiológicas asignadas. *Grasas Aceites* **43** (5), 287–290.
- Saravitz DM, Siedow JN (1995). The lipoxygenase isoenzymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves. *Plant Physiol.* **107** (2), 535–543.
- Satoh T, Matsuda Y, Takashio M, Satoh K, Beppu T, Arima K (1976). Isolation of lipoxygenase-like enzyme in *Fusarium oxysporum*. *Agric. Biol. Chem.* **40** (5), 953–961.
- Scarrow RC, Trimistis MG, Buck CP, Grove GN, Cowling RA, Nelson MJ (1994). X-ray spectroscopy on the iron site in soybean lipoxygenase-1: changes in coordination upon oxidation or addition of methanol. *Biochemistry* **33** (50), 15023–15035.
- Scheller G, Jäger E, Hoffmann B, Schmitt M, Schreier P (1995). Soybean lipoxygenase: substrate structure and product selectivity. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1768–1774.
- Scheller G, Weyd S, Karas M, Hillenkamp F, Schreier P (1994). Accurate molecular mass determination by mass spectrometry.

- trical techniques: differentiation of soybean lipoxygenase isoenzymes. *Phytochem. Anal.* **5**, 281–285.
- Schewe T, Rapoport SM, Kühn H (1986). Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. *Adv. Enzymol.* **58**, 192–272.
- Schilstra MJ, Velding GA, Vliegthart JFG (1994a). The dioxygenation rate in lipoxygenase catalysis is determined by the amount of iron III lipoxygenase in solution. *Biochemistry* **33** (13), 3974–3979.
- Schilstra MJ, Velding GA, Vliegthart JFG (1994b). Effect of nonionic detergents on lipoxygenase catalysis. *Lipids* **29** (4), 225–229.
- Schilstra MJ, Velding GA, Verhagen J, Vliegthart JFG (1992). Effect of lipid hydroperoxide on lipoxygenase kinetics. *Biochemistry* **31**, 7692–7699.
- Shechter G, Grossman S (1983). Lipoxygenase from baker's yeast: purification and properties. *Int. J. Biochem.* **15** (11), 1295–1304.
- Shkarina TN, Kuhn H, Schewe T (1992). Specificity of soybean lipoxygenase-1 in hydrated reverse micelles of sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate. *Lipids* **27** (9), 690–693.
- Siedow JN (1991). Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 145–158.
- Smith WL, Lands WEM (1972). Oxygenation of unsaturated fatty acids by soybean lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* **247**, 1038–1047.
- Sok DE, Kim MR (1990). Enzymatic formation of 9, 16-dihydro(pero)xyoctadecatrienoic acid isomers from  $\alpha$ -linoleic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 86–93.
- Sok DE, Kim MR (1994). Conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to dihydro(pero)xyoctadecatrienoic acid isomers by soybean and potato lipoxygenases. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2703–2708.
- Srinivasulu S, Rao AGA (1995). Structure and kinetic thermal stability studies of the interaction of monohydric alcohols with lipoxygenase-1 from soybeans (*Glycine max*). *J. Agric. Food Chem.* **43**, 562–567.
- Srinivasulu S, Rao AGA (1993). Kinetic and structural studies on the interaction of surfactants with lipoxygenase-1 from soybean (*Glycine max*). *J. Agric. Food Chem.* **41**, 366–371.
- Suda I, Hajika M, Nishiba Y, Furuta S, Igita K (1995). Simple and rapid method for selective detection of individual lipoxygenase isoenzymes in soybean seeds. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 742–747.
- Surrey K (1964). Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.* **39** (June), 65–70.
- Sumner JB, Sumner R (1940). The coupled oxidation of carotene and fat by carotene oxidase. *J. Biol. Chem.* **134**, 531–533.
- Takamura H, Kitamura K, Kito M (1991). Inhibition by lipoxygenase-3 of n-hexanal generation in soybeans. *FEBS Lett.* **292**, 42–44.
- Theorell H, Hollman RT, Akeson A (1947). Crystalline lipoxygenase. *Acta Chim. Scand.* **1**, 571–576.
- Van der Heijdt LM, Van der Lecq F, Lachmansingh A, Versluis K, Van der Kerk-Van Hoof A, Veldink GA, Vliegthart JFG (1993). X-ray absorption spectroscopy of soybean lipoxygenase-1. *Lipids* **28** (9), 779–782.
- Van der Mer RA, Duine JA (1988). Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is the organic cofactor in soybean lipoxygenase-1. *FEBS Lett.* **231**, 303–307.
- Van der Zee J, Eling TE, Mason RP (1989). Formation of free radical metabolites in the reaction between lipoxygenase and its inhibitors. An ESR study. *Biochemistry* **28**, 8363–8367.
- Van Mechelen JR, Smits M, Douma AC, Rouster J, Cameron-Mills V, Heidekamp F, Valk BE (1995). Primary structure of a lipoxygenase from barley grain as deduced from its cDNA sequence. *Biochim. Biophys. Acta* **1254**, 221–225.
- Van Os CPA, Rijke-Schilder GPM, Van Halbeek H, Verhagen J, Vliegthart JFG (1981). Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase. Kinetics and regioselectivities of the reaction steps. *Biochim. Biophys. Acta.* **663**, 177–193.
- Veldink GA, Boelens H, Maccarone M, Van der Lecq F, Vliegthart JFG (1990). Soybean lipoxygenase-1 is not a quinoprotein. *FEBS. Lett.* **270**, 135–138.
- Veldink GA, Vliegthart JFG (1991). Substrates and products of lipoxygenase catalysis. In "Studies in natural products chemistry" (Atta-ur Rahman, ed.), pp. 559–589. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- Vick BA (1993). Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway. In "Lipid metabolism in plants" (T.S. Moore, ed.), pp. 167–191. CRC Press, Boca Raton.
- Vick BA, Zimmerman DC (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **111** (2), 470–477.
- Vick BA, Zimmerman DC (1993). The lipoxygenase pathway. In "Lipid metabolism in plants" (T.S. Moore, ed.), pp. 383–390. CRC Press, Boca Raton.
- Weyd S, Scheller G, Huffer M, Schreier P (1992). Soybean lipoxygenase: preliminary spectroscopic studies of native and iron-free isoenzymes. In "Selective reactions of metal-activated molecules" (H. Werner, A.G. Griesbeck, W. Adam, G. Bringman, W. Kieffer, eds.). Braunschweig, Germany.
- Whitaker JR (1991). Lipoxygenases. In "Oxidative enzymes in foods" (D.S. Robinson, N.A.M. Eskin, eds.), pp. 175–215. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- Whitehead IM, Müller BL, Dean C (1995). Industrial use of soybean lipoxygenase for the production of natural green note flavor compounds. *Cereal Food World* **40** (4), 193–197.
- Wilkins WF, Mattick LR, Hand DB (1967). Effect of processing method on oxidative off-flavors of soybean milk. *Food Technol.* **21**, 1630–1632.
- Wolf WJ (1975). Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. *J. Agric. Food Chem.* **23** (2), 136–141.
- Yabuuchi S, Lister RM, Axelrod B, Wilcox JR, Nielsen NC (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of lipoxygenase isoenzymes in soybean. *Crop Sci.* **22**, 333–337.
- Zhang Y, Gebhard MS, Solomon EI (1991). Spectroscopic studies of the 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.* **113**, 5162–5175.
- Zimmerman DC, Vick BA (1973). Lipoxygenase in *Chlorella pyrenoidosa*. *Lipids* **8**, 264–266.
- Zimmerman DC, Coudron CA (1979). Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-10-dodecenoic acid. *Plant Physiol.* **63**, 536–541.