



УДК 547.915.5:577.152.53*991:581.198

СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТЬ СИНТЕЗА НОВЫХ ОКСИЛИПИНОВ (ДИВИНИЛОВЫХ ЭФИРОВ) ФЕРМЕНТОМ ИЗ ЛУКОВИЦ ЧЕСНОКА

© 1996 г. А. Н. Гречкин[#], М. Хамберг^{*}

Казанский институт биологии РАН, 420503, Казань, а/я 30;

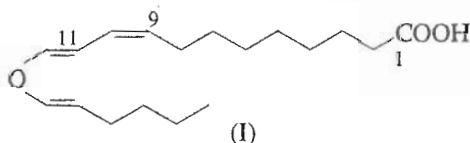
^{*}Каролинский институт, Стокгольм

Поступило в редакцию 19.04.96 г.

Изучена утилизация (9Z,11E,13R,S)-13-гидроперокси-9,11-октадекадиеновой кислоты [(13R,S)-HPOD] синтазой дивиниловых эфиров из луковиц чеснока. Обнаружено, что фермент проявляет стереоселективность, используя в качестве субстрата предпочтительно (13S)-эпимер гидроперекиси.

Ключевые слова: (9Z,11E,13R,S)-13-гидроперокси-9,11-октадекадиеновая кислота; (9Z,11E,13S)-13-гидроперокси-9,11-октадекадиеновая кислота; синтаза дивиниловых эфиров из луковиц чеснока; стереоспецифичность.

Недавно была впервые описана 13-гидропероксидспецифичная синтаза дивиниловых эфиров из луковиц чеснока (*Allium sativum* L.) [1]. Фермент превращает (9Z,11E,13S)-13-гидроперокси-9,11-октадекадиеновую ((13S)-HPOD) и (9Z,11E,13S,15Z)-13-гидроперокси-9,11,15-октадекатриеновую ((13S)-HPOT) кислоты в неизвестные ранее оксипилены (дивиниловые эфиры): (9Z,11E,1'E)-12-[1'-гексенилокси]-9,11-додекадиеновую (этеролевою, I) и (9Z,11E,1'E,3'Z)-12-[1',3'-гексаденилокси]-9,11-додекадиеновую (этероленовую) кислоты [1]. В настоящей работе нами изучена стереоспецифичность действия фермента.



Из получаемой при аутоокислении линолеата в атмосфере кислорода смеси регио- и стереоизомерных гидроперекисей методом ВЭЖХ на нормальной фазе выделяли образец (13R,S)-HPOD. Микросомы (осадок 9300–105000g) выделяли дифференциальным центрифугированием из гомогената 10 г луковиц чеснока в 30 мл 0.1 М боратного буфера, pH 9.0. Препараты (13R,S)-HPOD или (13S)-HPOD (по 0.5 мг) инкубировали 30 мин при 23°C в 3 мл того же буфера с изолированными микросомами (1.8 или 5.4 мг белка). Продукты инкубации разделяли методом ВЭЖХ на колонке (4.6 × 250 мм) Nucleosil 5 ODS при изократичес-

ком элюировании смесью ацетонитрил – вода – уксусная кислота (60 : 40 : 0.01). Остаток не использованной ферментом 13-HPOD собирали и проводили ее стереохимический анализ согласно [2]. Для этого остаток 13-HPOD восстанавливали NaBH₄. Образующуюся гидроксикислоту метилировали диазометаном, метиловый эфир обрабатывали пропионовым ангидридом в пиридине. Озонолиз пропионильного производного с последующей обработкой надуксусной кислотой приводил к образованию 2-пропионилоксигептановой кислоты. Диастереомерный амид этой кислоты, метиловый эфир N-(2-пропионилоксигептанойл)-L-фенилаланина, готовили по методике, описанной ранее [2]. Стандарты того же амидного производного получали аналогичной процедурой из хиральной и рацемической (13S)-HPOD и (13R,S)-HPOD соответственно. Анализы диастереомерных амидов выполняли методом ГЖХ на капиллярной колонке DB-210 (15 м, диаметр 0.25 мм, толщина слоя фазы 0.25 мкм) при 190°C. Линейная скорость потока гелия 36 см/с.

Инкубация рацемической (13R,S)-HPOD, так же как и хиральной (13S)-HPOD, с микросомами из луковиц чеснока приводила к образованию одного преобладающего продукта – этеролеовой кислоты (I). Аналитические данные для метилового эфира: масс-спектр (электронный удар, 70 эВ): *m/z* (*I*, %): 308.235 (100) (C₁₉H₃₂O₃) [M⁺], 277 (9) [M⁺ – CH₃O], 251 (9) [M⁺ – C₄H₉], 209 (3) [M⁺ – C₆H₁₁O], 177 (28) [209 – CH₃OH], 165 (42) [M⁺ – C1–C7], 159 (31) [177 – H₂O], 135 (86) [M⁺ – C₆H₁₁OH – CH₂COOCH₃]. ¹H-ЯМР (250 МГц, CD₃CN), δ, м. д. (*J*, Гц): 0.93 (т, H6', 3H, *J*_{5,6} 6.9), 1.33 (м, H4–H7, H4', H5', 12H), 1.59 (м, H3, 2H), 1.97 (м, H3', 2H), 2.12 (м, H8, 2H), 2.30

Сокращения: ВНТ – бутилгидрокситолуол (2,6-ди-*т*-бутил-*п*-крезол), 13-HPOD – (9Z,11E)-13-гидроперокси-9,11-октадекадиеновая кислота, 13-HPOT – (9Z,11E,5Z)-13-гидроперокси-9,11,15-октадекатриеновая кислота.

[#] Автор для переписки.

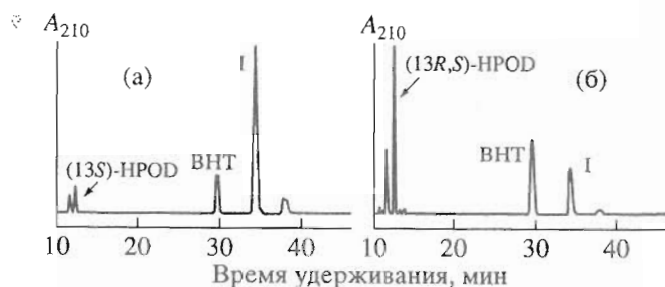


Рис. 1. Разделение продуктов превращения (13S)-HPOD (а) и (13R,S)-HPOD (б) методом ВЭЖХ на обращенной фазе. ВНТ – бутилгидрокситолуол (2,6-дипрет-бутил-*n*-крезол), присутствующий в качестве антиоксиданта в диэтиловом эфире.

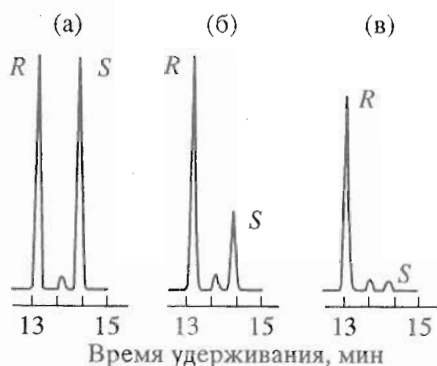


Рис. 2. Стереоспецифичность утилизации (13R,S)-HPOD ферментом из лукович чеснока. Капиллярный газохроматографический анализ диастереомерных амидных производных, полученных (как описано в тексте) из исходной (13R,S)-HPOD (а), а также из не подвергшегося трансформации остатка (13R,S)-HPOD, собранного после ее инкубации с суспензиями микросом. Концентрации белка 1.8 (б) и 5.4 мг (в).

(т, Н2, 2Н, $J_{2,3}$ 7.4), 3.63 (с, ОМе, 3Н), 5.17 (дт, Н2', $J_{1,2}$ 12.2, $J_{2,3}$ 7.4), 5.30 (дт, Н9, 1Н, $J_{8,9}$ 7.5, $J_{9,10}$ 10.3), 5.90 (ддт, Н10, 1Н, $J_{10,11}$ 11.5, $J_{8,10}$ 1.2), 6.01 (дд, Н11, 1Н, $J_{11,12}$ 11.5), 6.39 (дт, Н1', 1Н, $J_{1,2}$ 12.2, $J_{1,3}$ 1.2), 6.65 (д, Н12, 1Н).

Выход этеролеовой кислоты после инкубации микросом с (13S)-HPOD достигал 90% (рис. 1а). Превращение (13R,S)-HPOD в этеролеовую кислоту в присутствии микросом (1.8 и 5.4 мг белка) составляло 50.4% (рис. 1б) и 74.6% соответственно. При этом остатки исходной (13R,S)-HPOD (рис. 2а) содержали соответственно 94 и 88% (13R)-энантиомера (рис. 2б, 2в). Этот результат показывает, что (13R)-HPOD утилизируется ферментом намного медленнее, чем (13S)-HPOD. В то же время проявляемая ферментом стереоспецифичность не абсолютна. В присутствии избыточного количества фермента (13R,S)-HPOD утилизируется практически полностью. Сходную стереоспецифичность проявляет "гетеролитическая" гидропероксидлиаза из листьев чая при инкубации с (13R,S)-HPOD [3]. В отличие от синтазы дивиниловых эфиров синтаза окисей алленов проявляет строгую стереоспецифичность, используя при инкубации с рацемической (13R,S)-HPOD в качестве субстрата лишь (13S)-, но не (13R)-энантиомер [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grechkin A.N., Fazliev F.N., Mukhtarova L.S. // FEBS Lett. 1995. V. 371. P. 159–162.
2. Zhang L.-Y., Hamberg M. // Chem. Phys. Lipids. 1994. V. 74. P. 151–161.
3. Gardner H.W. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1084. P. 221–239.

Stereospecific Synthesis of Novel Divinyl Ether Oxylipins by the Enzyme from Garlic Bulbs

A. N. Grechkin* and M. Hamberg**

*Kazan Institute of Biology, Russian Academy of Sciences, a/ya 30, Kazan, 420503 Russia

**Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Abstract—Oxidation of (9Z,11E,13R,S)-13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid by the synthase of divinyl ethers from garlic bulbs (*Allium sativum* L.) was studied. The enzyme was found to be partially stereospecific, preferentially using the (13S)-epimer of hydroperoxide.

Key words: (9Z,11E,13R,S)-13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid, (9Z,11E,13S)-13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid, divinyl ether synthase from garlic bulbs, stereospecificity.