

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ АН УКРАЇНИ

На правах рукопису

МОГІЛЕВИЧ
Тетяна Василівна

ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ ТА МЕХАНІЗМУ
КАТАЛІЗУ ОКИСЛЕННЯ ПОЛІЕНАСИЧЕНИХ
ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПОКСИГЕНАЗОЮ
У ВОДНИХ ТА ОРГАНІЧНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

02.00.10 — біоорганічна хімія,
хімія природних та фізіологічно активних речовин

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ — 1994



Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії
АН України

Наукові керівники:

академік АН України, доктор хімічних наук
В. П. Кухар
кандидат хімічних наук І. А. Бутович

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Р. П. Виногорова
доктор біологічних наук, професор
В. К. Кібірев

Провідна організація: Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
АН України

Захист відбудеться «25» лютого 1994 р. на засіданні
спеціалізованої вченої ради Д 016.65.01 в Інституті біоорганічної
хімії та нафтохімії АН України (253094 Київ, вул. Мурманська, 1).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біо-
органічної хімії та нафтохімії АН України (253094 Київ, вул. Мур-
манська, 1).

Автореферат розісланий «22» січня 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Д. М. Федорак

ДВ-29.739

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Дослідження ферментів, що беруть участь у біосинтезі біологічно активних сполук, має важливе значення для розуміння тонких регуляторних процесів у організмах рослин, тварин та людини, створення нових лікарських засобів та сільськогосподарських препаратів. Ліпоксигенази (КФ І.13.11.12) каталізують окислення поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) до гідропероксидів, а також подальшу їх трансформацію до оксо-, гідрокси-, епокси- та інших похідних. Продукти цих реакцій є інтермедіатами біосинтезу лейкотриєнів, простагландинів, ліпоксинів, гепоксилінів - важливих біологічних регуляторів з широким спектром дії, та, як стало відомо в останні роки, мають власну біологічну активність. Тому, механізм ліпоксигеназної реакції, а також біологічна роль похідних ПНЖК є темою інтенсивних досліджень у нашій країні та за кордоном. Безперечно цікавим є застосування водорозчинних та іммобілізованих форм ліпоксигеназ для препаративного одержання біологічно активних сполук.

При дослідженні ліпоксигеназного каталізу та розробці ферментативних методів синтезу похідних ПНЖК за участю ліпоксигеназ ефективним може бути використання гетерофазних водних та водно-органічних систем, які дозволяють вирішити проблеми, що пов'язані з обмеженою розчинністю субстратів та нестабільністю продуктів реакції у водному середовищі.

Таким чином, вивчення кінетичних та каталітичних властивостей ліпоксигеназ у різних системах та водно-органічних сумішах, розробка методів їх іммобілізації та вивчення ферментативного синтезу похідних жирних кислот за участю препаратів ліпоксигеназ є актуальним завданням біоорганічної хімії.

Мета роботи. Метою роботи було порівняльне дослідження кінетичних закономірностей окислення лінолевої кислоти (ЛК), яке каталізує ліпоксигеназа-І з соєвих бобів (ЛО), у водному розчині, у водно-міцелярній системі детергенту та в обернених міцелях поверхнево-активної речовини (ПАР) в органічному розчиннику. В роботі планувалось вивчити кінетику окислення лінолевої кислоти та її метилового ефіру (МЕЛК) з метою зв'язування ролі крбоксильної групи субстрату у зв'язуванні з ферментом, одержати препарати іммобілізованої ліпоксигенази та вивчити їх каталі-

тичні властивості, а також дослідити ферментативний синтез похідних ПНЖК з їх участю.

Наукова новизна. У роботі проведено порівняльне вивчення кінетичних параметрів окислення лінолевої кислоти ліпоксигеназою у водному середовищі, у водно-міцелярній системі та в обернених міцелях аерозолю OT (дізооктилсульфосукцината натрію) у октані, а також кінетики окислення ліпоксигеназою лінолевої кислоти та її метилового ефіру (МЕЛК). Досліджені кислотно-основні властивості ЛК у водно-міцелярній системі детергента та запропонована фізико-хімічна модель реакційної системи. Вперше отримані препарати ліпоксигенази, яку іммобілізовано на модифікованому кремнеземі, та досліджені їх каталітичні властивості. Вперше розроблено спосіб одержання IZL₃-гідропероксида лінолевої кислоти з використанням іммобілізованої ліпоксигенази. Досліджено перетворення гідропероксида ЛК у водному та водно-органічному середовищах під дією іммобілізованої ліпоксигенази.

Практична значимість роботи. Отримані препарати ферменту можуть бути використані у стереоселективному синтезі біологічно активних похідних жирних кислот. Дані по закономірностям реакцій окислення ПНЖК та їх похідних і каталітичним властивостям ферменту можуть бути корисними для більш глибокого розуміння механізму ліпоксигеназного каталізу і ролі ліпоксигеназ в організмах рослин, тварин та людини.

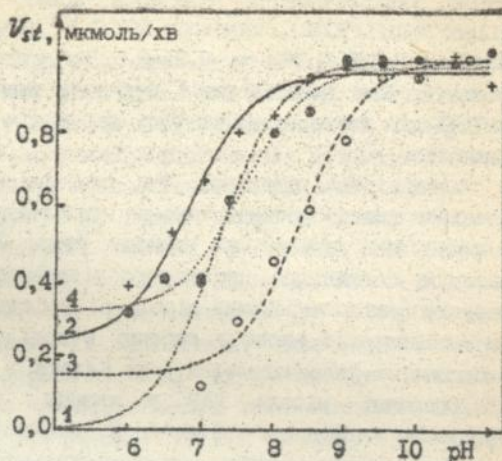
Апробація роботи. За темою дисертації опубліковано 6 друкованих робіт, одну статтю прийнято до друку. За матеріалами роботи було зроблено доповіді на всеукраїнських та міжнародній конференціях.

Структура роботи. Дисертаційна робота складається з вступу, двох глав огляду літератур, опису матеріалів та методів, результатів та обговорення, висновків, списку цитованої літератури та списку публікацій автора за темою дисертації. Дисертацію викладено на 125 сторінках друкованого тексту та ілюстровано 4 таблицями, 3 схемами та 33 малюнками.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

У роботі використано ліпоксигеназу-I з соєвих бобів фірм Fluka та Олайн (обернені міцели), лінолеву кислоту 99%, луброл FX фірми Sigma, аерозоль OT (Fluka), пористі кремнеземні носії

Мал. 1. Залежність стаціонарної швидкості реакції від рН: 1(●, ---) - розчинна форма ЛО, субстрат - ЛК; 2(+, -) - розчинна форма ЛО, субстрат - ЛК, 0,02% луброл FX; 3(○, -) - розчинна ЛО, субстрат - МЕЛК, 0,02% луброл FX; 4(■, ·····) - іммобілізована ліпоксигеназа, ЛК. Значення v_{st} нормовані. За одиницю прийняті значення швидкості



реакції при рН 9,5-10. Концентрація субстрату - 0,1 мМ.

У роботі було проведено порівняльне дослідження кінетичних закономірностей окислення ферментом лінолевої кислоти та її метилового ефіру. МЕЛК, який не іонізується, є практично нерозчинним у воді за будь яких значень рН, що ускладнює спектрофотометричну реєстрацію кінетичних кривих. Тому ферментативну реакцію проводили в присутності мицелоутворюючої концентрації детергента луброла FX, що дозволяє сольбілізувати жирнокислотні субстрати шляхом утворення мішаних мицел ЛК(або МЕЛК)/ПАР (Шенфельд Н., 1982), внаслідок чого мутність реакційної суміші зменшується.

Вбудовування жирної кислоти у мицелу могло викликати зміни її властивостей, насамперед, кислотно-основних. Тому у роботі було визначено залежність ступеня іонізації лінолевої кислоти у 0,02% розчині лубролу FX від рН. Розрахунки параметрів одержаної кривої двома незалежними математичними методами - сплайн-апроксимацією з наступним чисельним диференціюванням та за рівнянням

$$\alpha = \frac{\sum a_i \cdot 10^{pH - pK_{a_i}}}{1 + \sum 10^{pH - pK_{a_i}}} \quad 1,$$

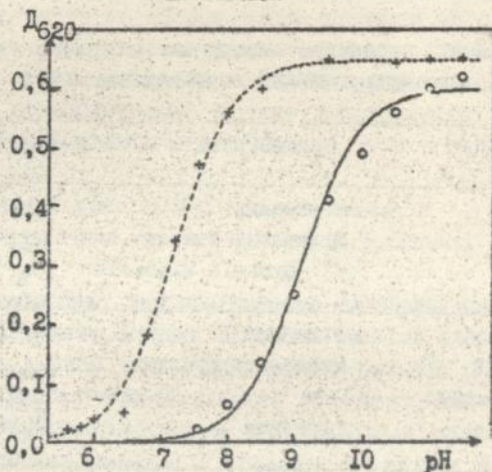
(де α - ступінь іонізації кислоти, i - кількість форм кислоти, що відрізняються значеннями pK_{a_i} , a_i - мольна доля i -го компоненту), дозволили достовірно визначити присутність у системі двох основних форм лінолевої кислоти, з рівними мольними долями та pK_a , що дорівнюють $6,5 \pm 0,1$ та $8,5 \pm 0,1$. Обидва значення від-

різняються від значень pK_a водорозчинних карбонових кислот - 4,5-5,0. Зміни кислотно-основних властивостей лінолевої кислоти при її вбудовуванні у міцелу можуть бути пов'язані з існуванням між поверхнею міцел та об'ємом розчину різниці потенціалів та зміною pH біля поверхні внаслідок перерозподілу розчинених іонів. При використанні луброла РХ, конденсата олігоетиленгліколя та жирного спирту, у прилеглому шарі розчину концентрується протони, і локальне значення pH стає більш "кислим" порівняно з pH в об'ємі розчину.

Ця гіпотеза підтверджується при дослідженні іонізації гідрофобного кислотно-основного індикатора бромтимолового синього (БТС), криві титрування якого у водно-міцелярній системі зміщені на 2 одиниці pH у більш лужну область порівняно з водним розчином (Мал. 2). Величина та напрям ефекту, що спостерігається, однакові для ЛК та БТС.

Друге значення pK_a , що дорівнює 8,5±0,1, можна віднести до титрування димерів лінолевої кислоти у вуглеводневому ядрі міцели. Таким чином, кислотно-основні властивості лінолевої кислоти у водно-міцелярній системі відрізняються від таких у водному розчині, що необхідно враховувати при дослідженні окислення жирнокислотних субстратів (ЛК та МЕЛК) ліпоксигеназою в присутності лубролу РХ.

Ліпоксигеназа-І здатна каталізувати окислення МЕЛК, хоча значення V_{st} у цьому випадку у 10 разів нижче, ніж при окисленні неетерифікованого субстрату. Залежність V_{st} від pH як для ЛК, так і для МЕЛК мають вигляд кривої, що виходить на плато (Мал.



Мал. 2. Іонізація pH-індикатора бромтимолового синього у воді (+, - -) та у 0,02% розчині лубролу РХ (o.—).

I). Але для метильованого субстрату спостерігається зміщення початку плато у більш лужну область порівняно з кривою для ЛК. Значення pK_a ферменту були розраховані за модифікованою v^{2-} -функцією Міхаеліса

$$v_{st} = v_{opt} / (1 + 10^{pK/10^{pH}}) + c \quad 2,$$

де c - емпірична константа, що відбиває неферментативний процес (таблиця I). З малюнка видно, що ефект зміщення кривої подібний до наведеного для лінолевої кислоти та БТС, вбудованих чи сорбованих на міцелі детергенту.

Таблиця I
Кінетичні параметри окислення лінолевої кислоти (ЛК) та її метилового ефіру (МЕЛК) ліпоксигеназою-I з соєвих бобів.

Субстрат	Залежність	Значення параметрів
ЛК	Рівняння Міхаеліса-Ментен	$K_M = 0,015 \pm 0,002 \text{ мМ}$
	v^{2-} -функція Міхаеліса	$v_{max} = 16,6 \pm 0,7 \text{ мкмоль/хв}$ $pK_a = 7,22 \pm 0,05$
ЛК (0,02% луброл FX)	Рівняння Міхаеліса-Ментен	$K_M = 0,149 \pm 0,015 \text{ мМ}$ $v_{max} = 8,09 \pm 0,30 \text{ мкмоль/хв}$
	Рівняння 2	$v_{max}/K_M = 0,054$ $pK_a = 6,8 \pm 0,1$
	Рівняння 2	$pK_a = 6,8 \pm 0,1$
МЕЛК (0,02% луброл FX)	Рівняння Міхаеліса-Ментен	$K_M = 0,060 \pm 0,005 \text{ мМ}$ $v_{max} = 0,92 \pm 0,03 \text{ мкмоль/хв}$
	Рівняння 2	$v_{max}/K_M = 0,015$ $pK_a = 8,4 \pm 0,1$
	Рівняння 2	$pK_a = 8,4 \pm 0,1$

Різниця рН-залежностей швидкості реакції для МЕЛК та ЛК відбиває, можливо, різну локалізацію ферментативного процесу у гетерофазній мицелярній системі. Метильовий ефір, який не іонізується, при розчиненні у системі з лубролом повністю вбудовується у мицелі детергенту (Бутович І.А., 1992), тоді як лінолева кислота розподіляється між мицелами та об'ємом розчину. Таким чином, окислення метильованого субстрату відбувається поблизу поверхні мицел, в яку вбудований МЕЛК, а у випадку з ЛК ліпоксигеназа діє на субстрат, що знаходиться в об'ємі розчину.

Залежність v_{st} від концентрації субстрату як для лінолевої

кислоти, так і для її метилового ефіру в присутності дубролу описуються рівнянням Міхаеліса-Ментен у діапазоні рН 0,025-0,150 мМ та 0,0125-0,5000 мМ, відповідно.

Значення кінетичних параметрів представлені в таблиці I. Відношення v_{\max}/K_M , що характеризує специфічність ферменту до того чи іншого субстрату (Фьоршт Е., 1980), для ЛК у 3,5 рази вище, ніж для МЕЛК, тобто ліпоксигеназа більш специфічна до неметильованої, іонізованої форми субстрату. Відмінність значень K_M за лінолевою кислотою та її ефіром можна пояснити на основі припущення про різну локалізацію ферментативного процесу у гетерофазній системі. Уявне збільшення константи у випадку з ЛК пов'язане, можливо, з виключенням частини субстрату із сфери реакції за рахунок вбудовування у міцел ПАР.

2. Каталітичні властивості ліпоксигенази, що включена до обернених міцел аерозолів ОТ у октані.

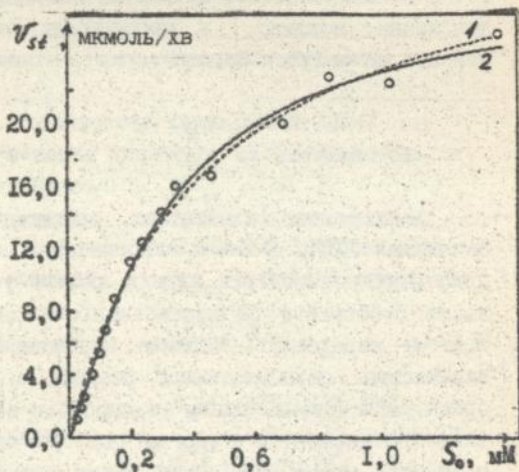
Дослідження кінетичних закономірностей ліпоксигеназного окислення ПНЖК, а також використання ліпоксигеназ для одержання природних метаболітів жирних кислот ускладнені низькою розчинністю субстратів та нестабільністю деяких продуктів реакції у водному середовищі. Можливе вирішення цієї проблеми полягає у перенесенні ферментативної реакції з водного розчину у водно-органічні системи. Одним із способів збереження каталітичної активності ферментів в органічних розчинниках є включення їх до обернених міцел ПАР. Тому метою роботи було дослідження каталітичних властивостей ліпоксигенази-I з соєвих бобів у обернених міцелах ПАР в органічному розчиннику.

При виборі системи обернених міцел для включення ферменту було досліджено вплив різних детергентів на його активність. Встановлено, що катіонні (цетилтриметиламоній бромистий, трикаприлметиламоній хлористий), аніонний (аерозоль ОТ) та неіонні (твін 20, тритон X100, дуброл РХ) інгібують фермент з IC_{50} 0,5-1 мМ, 4 мМ, 6-8 мМ, відповідно.

Залежність v_{st} реакції, яку каталізує ЛО, що включена до обернених міцел аерозолів ОТ в октані, від рН має вигляд кривої, що виходить на плато при лужних значеннях рН, однак, порівняно з тією ж залежністю для реакції у водному середовищі спостерігається зміщення початку плато у більш лужну область, котре тим

сильніше, чим нижче ступінь гідратації, w_0 . Уявні значення pK_a , що були розраховані за f^{2-} -функцією Міхаеліса, склали $8,5 \pm 0,1$ для $w_0=20$ та $8,87 \pm 0,06$ для w_0 , що на 1,3-1,7 одиниць вище, ніж для ЛО у водному середовищі. Цей ефект пов'язаний з аніонною природою детергенту та концентруванням протонів біля зарядженої поверхні міцел. При збільшенні w_0 у міцелах з'являється вільна вода, яка не бере участі у гідратації полярних груп ПАР, і локальне значення рН водної порожнини міцел наближається до рН солубілізованого водного розчину. Тому крива залежності швидкості реакції від рН зменшується у меншій мірі.

Мал. 3. Залежність стаціонарної швидкості окислення ЛК ліпоксигеназ, що включена до обернених міцел, від концентрації субстрату: крива 1 - апроксимація за рівнянням Міхаеліса-Ментен, крива 2 - апроксимація за рівнянням Хіла. $w_0=23$.



Залежність швидкості реакції від концентрації субстра-

ту була досліджена в інтервалі значень S_0 від 0,025 до 1,38 мМ, при значенні ступеню гідратації 23. Значення константи Міхаеліса та максимальної швидкості реакції склали $0,437 \pm 0,037$ мМ та $0,633 \pm 0,026$ мкмоль/хв, відповідно. Однак, при малих значеннях w_0 спостерігається відхилення від гіперболічної кривої. При розрахунку цієї залежності за рівнянням Хіла коефіцієнт Хіла, n , дорівнював $1,22 \pm 0,08$. Таким чином, можна стверджувати, що ліпоксигеназа в обернених міцелах виявляє позитивну коопера- тивність за субстратом.

Значення ступеню гідратації обернених міцел, за яким активність включеної ліпоксигенази максимальна, виявлено таким, що дорівнює 20-23. Радіус внутрішньої порожнини міцел при певному

значенні W_0 можна оцінити за рівнянням 3 (Левашов А.В., 1988):

$$r_M(\text{нм}) = 0,4 + 0,15W_0 \quad 3$$

Для оцінки радіусів молекул ферментів використовують дані по їх молекулярним масам. Для найпростішої моделі - куля з густиною $1,2 \text{ г/см}^3$ - радіус молекули білку, r_0 , зв'язаний з його молекулярною масою, M_0 , співвідношенням 4 (те ж джерело):

$$r_0(\text{нм}) = 0,07(M_0)^{1/3} \quad 4$$

Розраховані за рівняннями 3 та 4 значення радіусів внутрішньої порожнини міцели та молекули ліпоксигенази дорівнюють 3,4-3,85 та 3,25 нм відповідно, тобто максимальна активність ферменту виявляється в умовах, коли розміри внутрішньої порожнини міцели близькі до розмірів глобули білку.

Активність ліпоксигенази у системі обернених міцел залежить від концентрації детергенту - аерозолу OT та максимальна при її значенні 0,03 мМ.

3. Каталітичні властивості ліпоксигенази, що іммобілізована на модифікованому кремнеземі

Унікальні каталітичні властивості ферментів (висока питома активність, специфічність, функціонування при кімнатній температурі та нормальному тиску) дозволяють використовувати їх для одержання різноманітних природних сполук у лабораторних та промислових масштабах. Ферментативний катализ має особливі переваги у синтезі малих кількостей речовин, що мають високу біологічну активність. Це в повній мірі відноситься до продуктів ліпоксигеназного окислення ПНЖК. В тонкому органічному синтезі все найчастіше використовують іммобілізовані ферменти. Тому метою роботи було одержання препаратів іммобілізованої ліпоксигенази, дослідження їх каталітичних властивостей та використання у синтезі похідних ПНЖК.

Носієм для іммобілізації було обрано пористий кремнезем, який має достатню хімічну та механічну стійкість, не набрякає, не підлягає мікробіологічній деструкції та зручний у використанні в проточних реакторах завдяки його нестисливості.

В роботі була досліджена кінетика окислення ЛК ліпоксигеназою, що іммобілізована на аminosилпорі-030, активованому глутаровим альдегідом (ГА-аміносилпорі). Залежність V_{st} від рН приведена на малюнку 1. Загальний вигляд кривої та оптимальне

значення рН співпадають з даними, одержаними для неімобілізованого ферменту. Зниження активності імобілізованої ліпоксигенази при рН 10,5 і вище може бути пов'язане з відомою деструкцією кремнеземної матриці у лужному середовищі. Для цієї форми ферменту, на відміну від розчинної форми ліпоксигенази, крива рН-залежності швидкості реакції описується рівнянням 2. Розраховане значення pK_a ферменту, $7,50 \pm 0,16$, є близьким до такого для розчинної форми ($7,22 \pm 0,05$). Мабуть, імобілізація ліпоксигенази не спричиняє змін кислотно-основних властивостей амінокислотних залишків ферменту, що відповідає за каталіз.

Залежність V_{st} від концентрації субстрату описується рівнянням Міхаеліса-Ментен у діапазоні концентрацій 0,02-0,10 мМ. Величина K_M дорівнює $0,102 \pm 0,020$ мМ. При імобілізації ліпоксигеназа зберігає від 4 до 14% вихідної активності. За цих умов зі збільшенням кількості зв'язаного ферменту питома активність препарату (з розрахунку на 1 г імобілізованого білку) знижувалась. Це явище може бути наслідком впливу дифузії субстрату чи продукту в порах носія на процес каталізу (Березін І.В., 1985). На користь останнього ствердження свідчить той факт, що для ліпоксигенази, яка імобілізована тим же способом на модифікованому кремнеземі, що не має пор, - аеросилі, ступінь зберігання активності становив 16-20%.

Для дослідження впливу способу зв'язування ферменту з носієм на активність препарату в роботі було визначено активність препаратів імобілізованої ЛО, що відрізняються типом зв'язку білок-носій (таблиця 2). Найбільш високу активність виявили препарати ферменту, що 1) сорбований на амінокремнеземі, 2) імобілізований на ГА-амінокремнеземі, 3) імобілізований на карбоксикремнеземі, активованому N-гідроксисукцинімідом.

4. Одержання гідропероксиду лінолевої кислоти з використанням імобілізованої ліпоксигенази.

Препарат ліпоксигенази з соєвих бобів, що імобілізована на ГА-аміносіліпорі, було використано для одержання $I3L_8$ -гідропероксиду лінолевої кислоти (Бутович І.А., Авт. св. N 1631086, СРСР, 1988). Вихід продукту склав 96-98% (до 50 мг продукту/1 г кремнезему/день). Препарат лишався стабільним на протязі тижня при безперервній роботі на протязі 12 годин на день.

Таблиця 2.

Активність препаратів іммобілізованої ліпоксигенази з різним типом зв'язку білок-носії.

Спосіб зв'язування та носій	Ступінь зв'язування, %	Активність, од./г носія
АСХ-І,5, активований глутаровим альдегідом	100	1,11
АСХ-І,5, активований хлористим ціануром	100	0,06
АСХ-І,5, оброблений янтарним ангідридом та активований γ -нітрофенолом	100	0,03
АСХ-І,5, оброблений янтарним ангідридом та активований N-гідроксисукцинімідом	92	1,47
АСХ-І,5	100	0,70
АСХ-І,5, оброблений янтарним ангідридом	100	0,03
"Silipor 030", оброблений γ -АПЕС	100	2,13
"Silipor 030", оброблений γ -ТПЕС	100	неакт.

Одержаний препарат був достатньо чистим за даними ТМХ (пластини Kieselgel 60 F₂₅₄, (Merck), система гексан:діетиловий ефір= 65:35) та ОФ ВЕРХ (колонка LiChrosorb RP 18, 250x4, елюент метанол:вода:оцтова кислота=70:30:0,01). Час виходу продукту до та після відновлення боргідридом натрію або трифенілфосфіном складав 69,9 та 62,7 хв відповідно.

Присутність гідропероксидної групи у молекулі продукту було визначено за специфічною реакцією з N,N-діметил- γ -фенілєндіаміном. Максимум при 235 нм в УФ-спектрі поглинання одержаного гідропероксиду (розчинник - метанол) свідчить про утворення спряженого дієнового хромофору. У ІК-спектрі поглинання продукту $\nu_{\max}(\text{CO}_2) = 3560 \text{ см}^{-1}$ відповідає валентним коливанням зв'язку O-H гідропероксидної групи.

Одержаний гідропероксид відновили боргідридом натрію,

етерифікували діазометаном та аналізували методом $^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, CDCl_3 , ТМС як внутрішній стандарт). Фрагмент спектру δ 2,18 м.д., дт, (IH, $J=7,5$ Гц, $J=7,5$ Гц), δ 5,43 м.д., м, (IH, $J=7,8$ Гц, $J=10,8$ Гц), δ 5,97 м.д., т, (IH, $J=11,1$ Гц), δ 6,48 м.д., м, (IH, $J=10,8$ Гц, $J=15$ Гц), δ 5,66 м.д., дд, (IH, $J=6,9$ Гц, $J=15,3$ Гц), δ 4,17 м.д., дд, (IH, $J=6,6$ Гц, $J=13,5$ Гц), δ 1,35 м.д., м, δ 1,75 м.д., с. співпадає з даними літератури (Van Oв С.Р.А., 1980) та підтверджує структуру сполуки.

Одержаний продукт виявляє оптичну активність. $[\alpha]_D^{25} = -8^{\circ}$, що є близьким до значення, визначеного для I3L_8 -гідропероксида лінолевої кислоти у роботі Iacazio G. (1990).

5. Дослідження перетворення гідропероксиду лінолевої кислоти під дією іммобілізованої ліпоксигенази.

Актуальність дослідження біосинтезу та біологічної ролі продуктів перетворення гідропероксидів ПНЖК під дією ліпоксигеназ з різних джерел зумовлена виявленою різноманітною біологічною активністю цих сполук. Обмежена розчинність субстратів та нестійкість деяких продуктів реакції у водному розчині потребують застосування нетрадиційних середовищ для проведення реакції, таких, як, наприклад, водно-органічні суміші. Тому у роботі була досліджена трансформація ППЛК в присутності ЛК під дією ліпоксигенази, що іммобілізована на ГА-амінокремнеземі, у водному та водно-органічному середовищі.

Продуктами анаеробного перетворення ППЛК в присутності ЛК під дією ЛО-І з соєвих бобів у водному розчині є І3-оксооктадекадієнова та І3-оксотридекадієнова кислоти, пентан, епоксигідроксипохідні та жирнокислотні димери (Garssen G.J., 1972.).

Для проведення реакції були використані такі системи: 1) водний розчин; ЛК, концентрація якої значно перевищує концентрацію кисню, або ЛК та ППЛК в анаеробних умовах; розчинна форма ліпоксигенази; 2) водний розчин; ЛК, концентрація якої значно перевищує концентрацію кисню, або ЛК та ППЛК в анаеробних умовах; іммобілізована ліпоксигеназа; 3) октан; ЛК, концентрація якої значно перевищує концентрацію кисню в системі, або ЛК та ППЛК в анаеробних умовах; іммобілізована ліпоксигеназа.

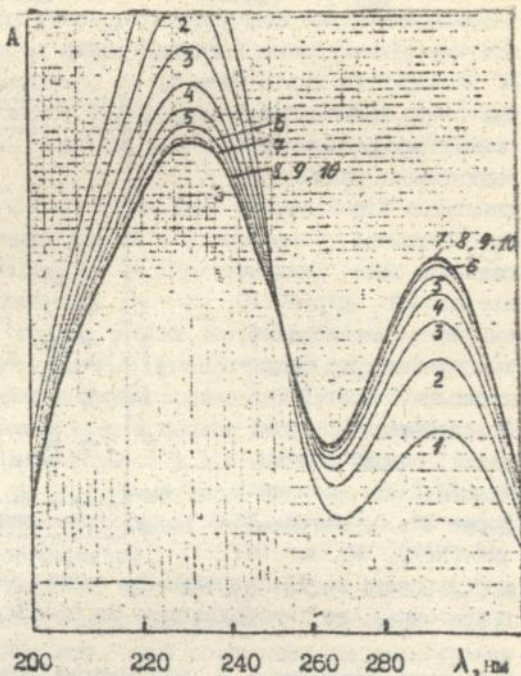
Про хід ферментативної реакції свідчить зростання оптичної густини при $\lambda=280$ нм в УФ-спектрі поглинання реакційної суміші,

що відповідає поглинанню оксопохідних лінолевої кислоти (Мал. 4).

Мал. 4. Зміни оптичного поглинання реакційної суміші у ході ферментативної реакції. Склад суміші: 0,1 М натрій-боратний буферний розчин, ЛК (0,5 мМ), ліпоксигеназа (0,016 мг/мл). $\Delta t = 2,5$ хв.

При використанні термоінактивованого іммобілізованого ферменту продукти реакції утворюються у кількостях, що відповідають процесам аутоокислення та неферментативного перегрупування ГПЛК. Це дозволяє виключити можливість каталізу носієм.

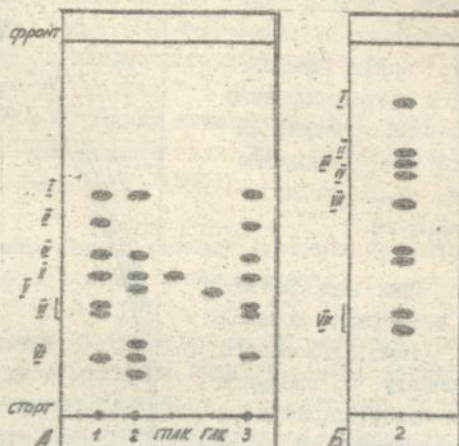
У роботі було досліджено якісний склад продуктів реакції в описаних системах. На малюнку 5 приведено розділення суміші продуктів реакції у системах, що були використані Verhagen B. (1980) та Claeus B. (1985) - системи А та Б, відповідно. Визначені значення R_f основних компонентів - димерів лінолевої кислоти, оксокислот, гідроксиду, гідропероксиду, епоксигідрокси- та тригідроксипохідних лінолевої кислоти - є близькими до значень, визначених авторами цих робіт. Крім того, сполука II поглинає в УФ-області спектру, $\lambda_{\max} (\text{MeOH}) = 231$ нм, і водночас є найменш полярною з одержаних продуктів, що дозволило віднести її до димерів ЛК та її похідних. Компоненти III та VI, що ідентифіковані як ІЗ-оксооктадекадієнова та ІЗ-оксотридекадієнова кислоти відповідно, також мають поглинання в УФ-області



спектру, λ_{\max} III (MeOH) = 277,7 нм, λ_{\max} VI (MeOH) = 273,4 нм, та дають характерне забарвлення з динітрофенілгидразином. Останній, як відомо, реагує з альдегідами та кетонами.

Мал. 5. Хроматограма суміші продуктів ферментативної реакції на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) у системах А - гексан:діетиловий ефір=60:40 та Б - етилацетат:ізооктан:оцтова кислота:вода=10:6:2:10.

Склад реакційної суміші: 1) водний розчин, ЛК (ЛК+ГПЛК), розчинна форма ЛО, 2) октан, ЛК (ЛК+ГПЛК), ЛО, що іммобілізована на ГА-силіпорі, 3) водний розчин, ЛК (ЛК+ГПЛК), ліпоксигеназа, що іммобілізована на сфероні 300.



Максимуми поглинання в ІК-спектрах компонентів III та VI - $\nu_{III} = 1654 \text{ см}^{-1}$ та $\nu_{VI} = 1680 \text{ см}^{-1}$ - свідчать про присутність оксо- ($-C=O$) та альдегідної ($-HC=O$) груп, відповідно. Сполуки VII та VIII не поглинають в ультрафіолетовій області спектру.

Якісні склади продуктів реакції з іммобілізованою ліпоксигеназою у водному середовищі та у водно-органічній суміші ідентичні і, в основному, схожі з таким для реакції з неіммобілізованою ліпоксигеназою у водному розчині. Відсутність серед продуктів реакції з іммобілізованою ЛО ІЗ-оксотридекадієнової кислоти та жирнокислотних димерів може бути пов'язана з особливостями носія. У цьому зв'язку показовим є той факт, що при проведенні цієї ж реакції за участю ЛО, що іммобілізована на органічному носії сфероні 300, названі сполуки утворюються і склад продуктів повністю співпадає з таким для реакції з розчинною формою ферменту у водному середовищі.

ВИСНОВКИ

1. При порівняльному дослідженні кінетики окислення лінолевої кислоти та метилового ефіру лінолевої кислоти ліпоксигеназою-I з соєвих бобів виявлено, що фермент більш специфічний до неетерифікованої, іонізованої форми субстрату, а також пристосований до окислення жирної кислоти, яка неінтегрована у мицелярні структури.

2. Виявлені зміни кислотно-основних властивостей субстрату - лінолевої кислоти - внаслідок її вбудовування у мицели детергенту, а також присутність її у цій системі у двох основних формах - мономерній та димерній.

3. При дослідженні впливу різних детергентів на активність ліпоксигенази встановлено, що найбільш інгібуєть фермент катіонні ПАВ. Визначені оптимальні умови проведення реакції окислення лінолевої кислоти ліпоксигеназою з соєвих бобів в обернених мицелах аерозолу ОТ в октані. Фермент у цій системі виявляє позитивну кооперативність за лінолевою кислотою. За оптимального ступеня гідратації розміри внутрішньої порожнини мицел є близькими до розмірів молекули ферменту.

4. Одержані каталітично активні препарати ліпоксигенази, що іммобілізовані на модифікованому кремнеземі. Найбільшу активність мають препарати ферменту, який сорбований на амінокремнеземі, а також хімічно іммобілізований на амінокремнеземі, активованому глутаровим альдегідом, та карбоксикремнеземі, активованому N-гідроксисукцинімідом.

5. Розроблено спосіб стереоселективного синтезу $13L_3$ -гідропероксиду лінолевої кислоти з використанням іммобілізованої ліпоксигенази.

6. Проведена трансформація ПНЖК під дією іммобілізованої ліпоксигенази у водному та водно-органічному середовищах. Склад продуктів, що утворюється, є подібним до такого для реакції під дією розчинної форми ферменту у водному розчині, що вказує на перспективність використання іммобілізованої ліпоксигенази для синтезу різноманітних метаболітів ПНЖК.

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ПНЖК - поліненасичені жирні кислоти; ЛО - ліпоксигеназа-I з соє-

вих бобів; ЛК - ліолева кислота; МЕЛК - метиловий ефір ліолевої кислоти; v_{st} - стаціонарна швидкість реакції; АСХ-І,Б - аміносілохром-І,Б; ПАР - поверхнево-активна речовина; W_0 - ступінь гідратації; ГА-аміносіліпор - аміносіліпор, активований глутаровим альдегідом; аерозоль ОТ (АОТ) - діізооктилсульфосукцинат натрію; γ -АПТЕС - γ -амінопропілтриетоксисилан; ГПЛК - гідропероксид ліолевої кислоти; БТС - бромтимоловий синій, γ -ТПТЕС - γ -тіопропілтриетоксисилан, MeOH - метанол.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бутович І.А., Могилевич Т.В., Кухарь В.П. Активность липоксигеназы, включенной в обращенные мицеллы аэрозоля ОТ в октане// Укр. биохим. журн. 1989. Т. 61. № 2. С. 54-58.

2. Бутович І.А., Цысь Е.В., Могилевич Т.В., Кухарь В.П. Влияние физико-химических факторов на липоксигеназное окисление линолевой кислоты// Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 9. С. 1273-1280.

3. Бутович І.А., Цысь Е.В., Могилевич Т.В. Окисление линолевой кислоты и метиллинолеата липоксигеназами из картофеля и соевых бобов// Биохимия. 1992. Т. 57, вып. 10. С. 1472-1480.

4. Бутович І.А., Могилевич Т.В., Огий С.А., Кутняя М.Ю., Кухарь В.П. Каталитические свойства липоксигеназы из соевых бобов, иммобилизованной на модифицированном кремнезем// Биоорган. химия. - в печати.

5. Бутович І.А., Кухарь В.П., Цысь Е.В., Бридня В.П., Могилевич Т.В. Ферментативное регио- и стереоселективное окисление полиненасыщенных жирных кислот - альтернативный подход к синтезу лейкотриенов// Тез. докл. VI Всес. симп. по ниж. энзимологии. Вильнюс. 1988. с. 114.

6. Бутович І.А., Могилевич Т.В., Цысь Е.В., Кухарь В.П. Препаративный ферментативный синтез эйкозаноидов и их аналогов с помощью липоксигеназ// Тез. докл. IV Всес. конф. "Синтез и исследование простагландинов". Минск. 1989. с. 108.

7. Igor A. Butovich, Tatyana V. Mogilevich, Sergey A. Ohiv. Synthesis of 13(S)-hydroperoxylinooleic acid by immobilised soybean lipoxygenase./ 3rd international conference on lipid mediators in health & disease (LMHD). Jerusalem, Israel. Oct. 31 - Nov. 4, 1993. P. 120.

І.А. Бутович

Підписано до друку 01.94. Формат 60×84¹/₁₆. Папір офсетний. Офсетний друк.
Ум. друк. арк. 0,93. Тираж 90 прим. Зам. 19к.

ВПП корпорації УкрНТІ, 252171, Київ-171, вул. Горького, 180.

115-9178

АВ 29.139