

## 273. Über die Bildung von 9-Hydroxy-10,12- und 13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäure durch «Liperoxidase» aus Cerealien

Vorläufige Mitteilung<sup>1)</sup>

von **W. Heimann** und **P. Schreier**

Institut für Lebensmittelchemie der Universität Karlsruhe

Herrn Prof. Dr. *Hans Beyer*, Greifswald, zum 65. Geburtstag gewidmet

(8. X. 70)

*Zusammenfassung.* Nach Inkubation der durch Soja-Lipoxygenase (E. C. 1.13.1.13) gebildeten Linolsäurehydroperoxide (LHPO) mit einem Hafer-Acetonrockenpulver in Phosphatpuffer pH 7,0 (0,05 M) wurden als Umsetzungsprodukte die beiden ungesättigten 9-Hydroxy-10,12- und 13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäuren erhalten. Diese Reaktion wurde durch Einsatz von radioaktiv markierten LHPO bestätigt. Nach vorheriger Hitzeinaktivierung blieb die Umsetzung aus. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte an Hand der Massenspektren nach Veresterung, katalytischer Hydrierung und Oxydation zu 9-Oxo- bzw. 13-Oxo-stearinsäure-methylester.

Die antioxydative Wirkung von Getreidemehlen, insbesondere von Hafermehl [1], ursprünglich einem Phosphatid-Eiweiss-Komplex zugeschrieben [2], wurde bereits 1941 mit enzymatischen Vorgängen in Zusammenhang gebracht [3]. Der Nachweis, dass Peroxidase in das Geschehen der Lipoxydation bei Cerealien-Samen eingeschaltet ist, gelang bei Untersuchungen an Weizenkeimmehl [4]. Weitere Hinweise für den Einfluss einer Peroxidase auf die Geschwindigkeit des Linolsäurehydroperoxid(LHPO)-Abbaues wurden durch die Befunde an Sojabohnen-Rohextrakten [5] gebracht. In jüngster Zeit wurde die Abtrennung einer «Guajacol-LHPO-Oxydoreductase» von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Peroxidase durch Chromatographie an CM-Sephadex beschrieben [6].

Unsere Arbeiten verfolgten das Ziel, die Mitwirkung einer Peroxidase beim Abbau der LHPO in Hafer aufgrund der gebildeten Reaktionsprodukte nachzuweisen. Hierzu gingen wir wie folgt vor.

Die LHPO wurden durch Inkubation von Linolsäure (Fa. Roth, 98%) in O<sub>2</sub>-Atmosphäre mittels Soja-Lipoxygenase (Fa. Roth) in Phosphatpuffer, pH 7,0 (0,05 M) hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Min. wurde die vorher angesäuerte Lösung ausgeäthert, die LHPO mittels präparativer Schichtchromatographie (PSC.) gereinigt (Kieselgel PF<sub>254</sub>, 1 mm, Pentan + Diäthyläther + Eisessig 60 + 40 + 1), dann eluiert und anschliessend mit einem Hafer-Acetonrockenpulver (Proteingehalt 20%) 15 Min. in Phosphatpuffer pH 7,0 (0,05 M) inkubiert. Nach Extraktion der angesäuerten Lösung mit Äther traten im DC. zwei Verbindungen auf, deren R<sub>f</sub>-Werte übereinstimmten mit denen der Reaktionsprodukte einer mittels LiBH<sub>4</sub> durchgeführten LHPO-Reduktion. Nach vorheriger Hitzeinaktivierung des Gemisches (20 Min. in siedendem Äthanol [4]) blieb die Umsetzung aus. Die Autoradiographie mit radioaktiv markierten LHPO bestätigte das Ergebnis (Darstellung wie oben mit Linolsäure-[(U)-C<sup>14</sup>], CFB 40 des Radiochemical Centre, Amersham, 1 mCi/mM).

Die enzymatisch gebildeten *cis-trans* konjugierten Hydroxydiensäuren (UV.: 234 nm; IR.: 3434 cm<sup>-1</sup>, 987 cm<sup>-1</sup>, 947 cm<sup>-1</sup>) [7] wurden nach PSC.-Trennung, Veresterung mit Diazomethan, katalytischer Hydrierung mit PtO<sub>2</sub> und Oxydation mit

<sup>1)</sup> Eine ausführliche Mitteilung soll in dieser Zeitschrift erscheinen.

CrO<sub>3</sub> in Eisessig identifiziert. Parallelversuche wurden mit LiBH<sub>4</sub> reduzierten LHPO sowie authentischem 13-Hydroxy-9,11-octa-decadiensäure-methylester ausgeführt. Die Endprodukte konnten von uns massenspektrometrisch als 13-Oxo- und 9-Oxo-stearinsäure-methylester identifiziert werden [8].

Die Bildung der Hydroxydienfettsäuren aus den vorgängig durch Lipoxygenase gebildeten LHPO weist deutlich auf einen durch eine Peroxidase katalysierten Wirkungsmechanismus hin. Es liegt nahe, die in Hafer vorkommenden phenolischen Antioxydantien als Sauerstoffacceptoren anzunehmen, deren Struktur als wasserlösliche Ester der Ferula- und Kaffeesäure weitgehend aufgeklärt werden konnte [9].

Die Annahme verschiedener Autoren [10], dass Lipoxygenase in die Biosynthese der Hydroxy-*trans-cis*-konjugierten Octadecadiensäuren eingeschaltet ist, wird durch unsere Befunde bestätigt. Die in jüngster Zeit beobachtete Bildung dieser ungesättigten Verbindungen durch eine GSH-Peroxidase aus Rattenleber [11] sowie durch ein Prostaglandin synthetisierendes Enzym tierischen Ursprungs [8] lässt in Verbindung mit unseren hier mitgeteilten Ergebnissen erkennen, dass diesen ungesättigten Säuren nicht nur im tierischen, sondern auch im pflanzlichen Metabolismus eine spezifische Bedeutung zukommt.

Die UV.-Spektren wurden im Zeiss-Spektrophotometer PMQ II, die IR.-Spektren mit dem Perkin-Elmer-Spektrophotometer Mod. 257 in KBr aufgenommen.

Massenspektrometrie: Gerät CH 7 Varian Mat, Bremen. Kopplung über einen einstufigen Separator (Trägergas He) mit Gerät 1201 Varian Aerograph. Trennsäule 2 m, 1/16 Zoll innerer Durchmesser, SE-30 10% auf Aeropak-30 80/100 mesh. Separator 220°, Einspritzblock 250°, Trennsäule 220°; 70 eV.

Das Untersuchungsmaterial, entspelzter, unpräparierter Schweden-Hafer (Ernte 1968) stellte uns dankenswerterweise die Fa. Knorr, Heilbronn, zur Verfügung.

Herrn Prof. W. H. Tallent, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, danken wir für die freundliche Überlassung einer authentischen Vergleichsprobe Coriolsäure-methylester.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. N. Peters, jr. & S. Musher, Ind. Eng. Chemistry 29, 146 (1937); S. Musher, C. L. Bedford & M. A. Joslyn, Food Res. 2, 455 (1937).
- [2] W. Diemair, R. Strohecker & K. Reuland, Z. Lebensm.-Unters. u. -Forsch. 79, 23 (1940).
- [3] K. Täufel & R. Müller, Biochem. Z. 310, 152 (1941); 315, 381 (1943).
- [4] K. Täufel & M. Rothe, Fette, Seifen, Anstrichmittel 67, 907 (1965).
- [5] J. A. Blain & E. C. C. Styles, Nature 184, 1141 (1959); J. A. Blain & T. Barr, *ibid.* 190, 538 (1961); B. Gini & R. B. Koch, J. Food Sci. 26, 359 (1961).
- [6] J. Schormüller, J. Weber, B. Höxer & W. Grosch, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 139, 357 (1968).
- [7] J. R. Chipault & J. M. Hawkins, J. Amer. Oil Chemist's Soc. 36, 535 (1959).
- [8] M. Hamberg & B. Samuelsson, J. biol. Chemistry 242, 5344 (1967).
- [9] D. G. H. Daniels, H. G. C. King & H. F. Martin, Nature 191, 1302 (1961); D. G. H. Daniels & H. F. Martin, Chemistry & Ind. 1964, 2058; 1965, 1763; J. Sci. Food Agric. 18, 589 (1967).
- [10] A. Dolev, W. K. Rohwedder, T. L. Mounts & H. J. Dutton, Lipids 2, 33 (1967); W. H. Tallent, J. Harris, G. F. Spencer & I. A. Wolff, *ibid.* 3, 425 (1968).
- [11] B. O. Christophersen, Biochim. biophys. Acta 164, 35 (1968).