

## Efnasmíðar stöðubundinna þríglýseríða með staðvendinni ensímhvataðri asylyun

Arnar Halldórsson, Carlos D. Magnússon og Guðmundur G. Haraldsson

Raunvísindastofnun Háskólans

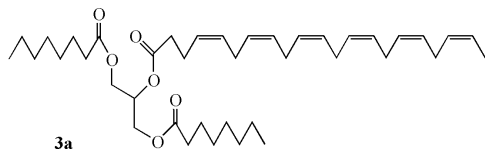
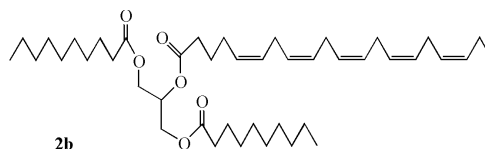
Vefútgáfa: 16. ágúst 2004

**Ágrip** Sex stöðubundin þríglýseríð sem öll innihalda hreina ómega-3 fjölómettaða fitusýru í miðstöðu og hreina mettaða miðlungslanga fitusýru í endastöðum voru útbúin með tveggja skrefa efnasmíð í há-um hreinleika og heimtum. Í fyrra skrefinu var kyrrsettum *Candida antarctica* lípasa beitt við 0–4°C til þess útbúa staðhverfureint 1,3-díglýseríð úr glýseróli og viðeigandi vínýl ester sem asylygjafa. Í kjölfarið fylgdi svo hefðbundið lífrænt efnahvarf þar sem fjölómettuðu fitusýrunni var komið fyrir í miðstöðu með hjálp tengimiðils. Bæði skrefin gáfu af sér ágætar heimtur í öllum tilvikum.

### Inngangur

Þegar fjallað er um stöðubundin lípíð [1] er átt við fituefni sem hafa fyrirfram ákveðna samsetningu eða dreifingu fitusýra á glýseról sameindinni. Stöðubundin þríglýseríð setin tiltekinni fitusýru eða fitusýrusamsetningu í endastöðum, en frábrugðinni fitusýru eða fitusýrusamsetningu í miðstöðu hafa hlotið verulega athygli vísindamanna út frá næringarfræðilegu sjónarmiði [2]. Þar af hafa stöðubundin þríglýseríð með löngum fjölómettuðum fitusýrum í miðstöðu og mettuðum miðlungslöngum fitusýrum í endastöðum hlotið sérstaka athygli. Ástæðan er sú að hinar miðlungslöngu fitusýrur í endastöðum verða fyrir hröðu vatnsrofi brisartilslípasa í meltingarveginum. Eftir upptöku þeirra í þörmunum berast þær síðan hratt til lifrarinnar þar sem þær nýtast sem skjótfenginn orkugjafi. Eftir sitja 2-mónóglýseríð miðsett hinum lífsnauðsynlegu fjölómettuðu fitusýrum og þjóna sem uppspretta þeirra eftir upptöku mónóglýseríðanna gegnum þarmaveggina [3]. Þau hlaðast upp sem þríglýseríð í fituvefjum eða sem fosfólípíð í frumuhimnum, og losna þessar fitusýrur þaðan eftir þörfum til hinna margvíslegu líffræðilegu hlutverka sinna.

Heilsusamleg áhrif af neyslu fitu úr sjávarfangi eru nær einvörðungu rakin til ómega-3 fjölómettuðra fitusýra, einkum *cis*-5,8,11,14,17-eikósapentaensýru (EPA) og *cis*-4,7,10,13,16,19-dókósaheptaensýru (DHA) [4]. Þess vegna eykst sífellt eftirspurnin eftir stöðubundnum þríglýseríðum sem innihalda EPA eða DHA í miðstöðu og mettaðar miðlungslangar fitusýrur í endastöðum [5].



**Mynd 1.** Efnabygging 2-eikósapentaenóyl-2,3-didecanóylglýseról (**2b**, vinstri) og 2-dókósaheptaenóyl-2,3-díoktanóylglýseról (**3a**, hægri)

Efnasmíði stöðubundinna þríglýseríða þarfnast mikillar staðvendni (regioselectivity) sem ekki væri möguleg með hefðbundnum lífrænum efnasmíðum án þessa að grípa til margvíslegra verndunar- og afverndunaraðgerða. Staðvendni lípasa gerir þá að einkar hentugum lífhvötum til efnasmíða á stöðubundnum þríglýseríðum og má fyrir tilstilli þeirra innleiða tiltekna fitusýrur í endastöður glýseríða með ýmsum ferlum estrunar [6] eða umestrunar [7]. Annar mikilvægur kostur lípasa eru hinar mildu aðstæður sem þeir bjóða upp á sem geta skipt sköpum við að sporna við umröðunum asylyhópa innan sameindar. Slík hliðarhvörf eru stundum nefnd asylyráp [8] og eru vel þekkt vandamál í tengslum við asylyanir á fjölalkóhólum og þau ber að forðast ef ná á fram ásætlanlegri staðvendni [9].

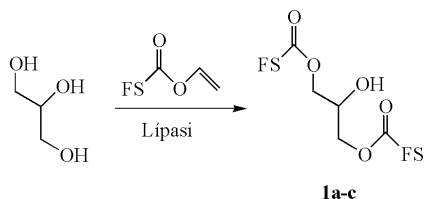
Meginmarkmið þeirra rannsókna sem hér er lýst var að smíða einsleit stöðubundin þríglýseríð

í háum hreinleika, með EPA og DHA í miðstöðu og mettaða miðlungslanga fitusýru í endastöðum. Við efnasmíðina koma bæði hefðbundnar aðferðir lífrænna efnasmíða og líf-lífrænar efnasmíðar við sögu, þar sem lípösum er beitt. Mynd 1 sýnir byggingu tveggja slíkra stöðubundinna þríglýseríða.

### Niðurstöður og umræður

Hinar stöðubundnu þríglýseríðafleiður með EPA (2a-c) og DHA (3a-c) í miðstöðu voru smíðaðar úr glýseróli í tveimur skrefum, þar sem tvinnad var saman hefðbundnum aðferðum lífrænna efnasmíða og líftækni. Í fyrra skrefinu var kyrrsettum lípasa beitt til að estera báðar endastöður glýseróls til myndunar 1,3-díglýseríða **1a-c** [10]. Í kjölfarið fylgdi hefðbundið lífrænt efnahvarf þar sem tengimiðill var notaður til að innleiða hreint EPA eða DHA í miðstöðuna [10–12].

Í fyrra skrefinu voru 1,3-díglýseríð útbúin með estrun glýseróls með 2.5 jafngildum (25% yfirmagni) af hreinu vínýl kaprylati (C<sub>8</sub>), kapríati (C<sub>10</sub>) eða lárati (C<sub>12</sub>), hvataðri af kyrrsettum *Candida antarctica* lípasa (Novozym 435) (mynd 2).

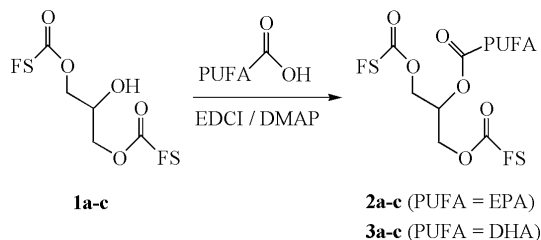


FS = C<sub>7</sub>H<sub>15</sub> (a), C<sub>9</sub>H<sub>19</sub> (b), C<sub>11</sub>H<sub>23</sub> (c)

**Mynd 2.** Efnasmíði 1,3-díglýseríða með ensímhvataðri asyln glýseróls.

Hvarfið var framkvæmt við 0–4°C í díklórómétani eða klóróformi með 10% ensími, grundvallad á vigt hvarfefnanna. Við þessar aðstæður fékkst fram fullkomin 1,3-staðvendni hjá ensíminu. Lítið var notað af lífrænum leysi, aðeins nóg til að leysa upp hvarfefnin (0,1 mL fyrir hvert gramm af hvarfefni). Framgangi hvarfsins var svo fylgt eftir með þáttbundinni greiningu á þunnlagsplötu og <sup>1</sup>H NMR. Meðan á hvarfinu stóð sást aðeins lítið magn 1-mónóglýseríðs ásamt miklu magni af myndefninu. Hvarfinu var lokið eftir 3–5 klst og voru engin merki asyrláps, þar sem hvorki 2-mónóglýseríð, 1,2-díglýseríð né þríglýseríð greindust á <sup>1</sup>H NMR rófi. Aftur á móti, mátti greina asyrláp væri hvarf-tíminn lengdur eða hitastigið hækkað (20°C).

Til að tryggja góðar heimtur þurfti 2,5 jafngildi af vínýl esternum, sem jafngildir 25% yfirmagni. Með þessu næst umtalsverð aukning í hvarfhraða og áhrif vatnsrofs á vínýl esterana verður



FS = C<sub>7</sub>H<sub>15</sub> (a), C<sub>9</sub>H<sub>19</sub> (b), C<sub>11</sub>H<sub>23</sub> (c)

**Mynd 3.** Efnasmíði stöðubundinna þríglýseríða með lífrænum tengimiðli.

ekki til vandræða. Vatnsrofið tengist því að örlítið af vatni þarf ávallt að vera til staðar til að lípasar haldi fullri virkni við hinar vatnsfirrtu aðstæður [10]. Vatnsmagnið er háð tegund lípasans og þarf oft að beita nákvæmri stjórnun á vatnsinnihaldi til að viðhalda hámarksvirkni lípasans og lágmarka vatnsrofið á sama tíma. Með notkun vínýl estera fæst ógagnhverf og hröð umestrun þar sem enól farhópurinn ráphverfist í asetaldhýð sem hefur enga kjarnsækni og gufar upp úr lausninni. Myndefni **1a-c** fengust hrein í 90–92% heimtum (sjá töflu 1) eftir endurkristöllum í n-hexani (–18°C).

**Tafla 1.** 1,3-díglýseríð úr lípasa hvataða skrefinu.

| Efni      | Fitusýra (FS)                    | Heimtur (%) |
|-----------|----------------------------------|-------------|
| <b>1a</b> | –C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>  | 90          |
| <b>1b</b> | –C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>  | 92          |
| <b>1c</b> | –C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> | 92          |

Í síðara skrefinu var 1-(3-dímetylamínóprópyl)-3-etylkarbódíamíðvetnisklóríð (EDCI) notað sem tengimiðill í viðurvist 0.3–0.5 mól jafngilda af 4-dímetylamínópyridíns (DMAP) og díklórómétans við herbergishita. DMAP þjónar bæði sem basi og hvati í hvarfinu. Um 12–15 klst tók að innleiða EPA og DHA að fullu í miðstöðu 1,3-díglýseríðsins við þessar aðstæður og sáust engar vísbendingar um asyrláp. Myndefni **2a-c** og **3a-c** fengust í háum hreinleika sem örkristallar í um 90–95% heimtum (sjá töflu 2) eftir kristöllum í köldu n-hexani. Heildarheimtur úr báðum skrefunum voru því á bilinu 80–85% samtals.

Bygging allra afurða og milliafurða var að fullu sannkennd með hágæða <sup>1</sup>H og <sup>13</sup>C NMR og IR lítrófsgreiningum, massagreiningu og frumefnagreiningu. <sup>13</sup>C NMR greiningin kom að mjög góðum notum við að fylgja eftir staðvendni efnahvarfanna og til að staðfesta að fitusýrurnar væru staðsettar í fyrirhuguðum stöðum þríglýseríðanna, ekki eingöngu fyrir ensímhvarfið heldur einnig hið síðara. Þetta byggist á því að tvö aðgreind merki fengust fyrir karbonylkolefni fitusýranna, háð staðsetningu þeirra

í endastöðum ( $\alpha$ ) eða miðstöðu ( $\beta$ ) þríglýseríðanna, og að sjálfsögðu því að efnavik þeirra er breytilegt og einkennandi fyrir þær hverja um sig [10, 13].

**Tafla 2.** Efnasmíð stöðubundinna þríglýseríða.

| Efni | Fitusýra (FS)                    | Ómega-3 | Heimtur (%) |
|------|----------------------------------|---------|-------------|
| 2a   | -C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>  | EPA     | 90          |
| 2b   | -C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>  | EPA     | 92          |
| 2c   | -C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> | EPA     | 92          |
| 3a   | -C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>  | DHA     | 90          |
| 3b   | -C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>  | DHA     | 94          |
| 3c   | -C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> | DHA     | 95          |

Þetta kemur berlega fram í töflu 3. Merki karbonylkolefnis allra miðlungslöngu fitusýranna fengust við  $\delta$  173,2 ppm þegar þær eru staðsettar í endastöðum en við  $\delta$  172,9 ppm í miðstöðu. Efnavik karbonylkolefna EPA og DHA voru frábrugðin miðlungslöngu fitusýrunum og jafnframt innbyrðis. Aðgreining karbonylkolefna EPA og DHA ræðst af nálægð karboxylhópsins við fremsta C-C tvítengið, sem er einu tengi nær í tilvikum DHA.

**Tafla 3.** 1,3-díglýseríð úr lípasa hvataða skrefinu.

| Fitusýra | $\alpha$ C=O ( $\delta$ ppm) | $\beta$ C=O ( $\delta$ ppm) |
|----------|------------------------------|-----------------------------|
| FS       | 173,2                        | 172,9                       |
| EPA      | 172,8                        | 172,5                       |
| DHA      | 172,6                        | 172,1                       |

## Þakkir

Rannsóknasjóði Háskólans er þakkaður fjárstuðningur við verkefnið. Novozyme í Danmörku er þakkað fyrir ensímið og Pronova Biocare í Noregi fyrir EPA og DHA á hreinu formi. Sigríði Jónsdóttur á Raunvísindastofnun Háskólans er þakkað fyrir NMR mælingar, Sigurði V. Smárasyni hjá Íslenskri erfðagreiningu og Trine Porsgaard hjá DTU í Danmörku fyrir massagreiningar og loks er Karin Linthoe hjá Háskólanum í Kaupmannahöfn þakkað fyrir frumefnagreiningar.

**Summary:** A highly efficient two-step chemoenzymatic synthesis of six structured triacylglycerols comprising a pure n-3 polyunsaturated fatty acid at the mid-position and a pure saturated medium-chain fatty acid located at the end-positions is described. In the first step an immobilized *Candida antarctica* lipase was observed to display an excellent regioselectivity toward the end-positions of glycerol at 0-4°C using vinyl esters as acylating agents. The n-3 fatty acids were introduced into the remaining mid-position highly efficiently using EDCI coupling agent. No acyl-migration side-reactions were observed to take place under these conditions and excellent yields were obtained in all cases.

## Heimildir

- [1] C.C. Akoh, in *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, ed. C.C. Akoh and D.B. Min, Marcel Dekker, New York, 1998, Chapter 26, pp. 699-727
- [2] F.D. Gunstone, ed., *Structured and Modified Lipids*, Marcel Dekker, New York, 2001.
- [3] M.S. Christensen, C.-E. Höy, C.C. Becker, and T.G. Redgrave, *Am. J. Clin. Nutr.* **61** (1995) 56.
- [4] J.A. Nettleton, *Omega-3 Fatty Acids and Health*, Chapman and Hall, New York, 1995.
- [5] T. Yamane, in *Enzymes in Lipid Modification*, ed. U.T. Bornscheuer, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, pp. 148-169.
- [6] U. Schmid, U.T. Bornscheuer, M.M. Soumanou, G.P. McNeill, and R.D. Schmid, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75** (1998) 1527.
- [7] Y. Shimada, A. Sugihara, K. Maruyama, T. Nagao, S. Nakayama, H. Nakano, and Y. Tominaga, *J. Ferment. Bioeng.* **81** (1996) 299.
- [8] D.R. Kodali, A. Tercyak, D.A. Fahey, and D.M. Small, *Chem. Phys. lipids* **52** (1990) 163.
- [9] S. Bloomer, P. Adlercreutz, and B. Mattiasson, *Biocatalysis* **5** (1991) 145.
- [10] A. Halldorsson, C.D. Magnusson, and G.G. Haraldsson, *Tetrahedron* **59** (2003) 9101.
- [11] G.G. Haraldsson, A. Halldorsson, and E. Kulås, *J. Am. Oil Chem Soc.* **77** (2000) 1139.
- [12] A. Halldorsson, C.D. Magnusson, and G.G. Haraldsson, *Tetrahedron Lett.* **42** (2001) 7675.
- [13] G.G. Haraldsson, B.Ö. Gudmundsson, and Ö. Almarsson, *Tetrahedron* **51** (1995) 941.

**Um höfundana:** Arnar Halldórsson lauk doktorsprófi í efnafræði frá Háskóla Íslands 2003 og starfar nú sem sérfræðingur á Raunvísindastofnun Háskólans og hjá Pronova Biocare í Noregi.

Carlos D. Magnússon er doktorsnemi í lífrænni efnafræði við Háskóla Íslands undir handleiðslu Guðmundar G. Haraldssonar.

Guðmundur G. Haraldsson er prófessor í lífrænni efnafræði við Háskóla Íslands.

Raunvísindastofnun Háskólans  
Dunhaga 3, IS-107 Reykjavík  
arnarha@hi.is  
carlos@raunvis.hi.is  
gghar@raunvis.hi.is

Móttekin: 13. apríl 2004

