

A konjugált linolsav antioxidáns hatásának vizsgálata egy modell kísérletben

Borosné Győri Anikó¹ – Salamon Rozália² –
Gundel János³ – Győri Zoltán¹ –
Salamon Szidónia² – Csapó János⁴

¹Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum,
Mezőgazdaságtudományi Kar,

Állattenyésztéstudományi Intézet, Debrecen

²EMTE Műszaki és Társadalomtudományi Kar,

Élelmiszertudományi Tanszék, Csíkszereda

³Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Herceghalom

⁴Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar,

Kémiai-Biokémiai Tanszék, Kaposvár

gyoria@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A Szerzők liszt finomságúra darált kukoricát 5% konjugált linolsavban dúsított vajjal dörzsölték el, majd alumínium tálcán 1 cm-es vastagságú rétegben, szabad levegőn tartották, és hetente mérték savszámát, peroxidszámát, valamint zsírsav-összetételét. Megállapították, hogy 24 hét alatt alig történt változás a zsírsav-összetételben, ezt követően azonban a peroxidszám és a savszám növekedésével párhuzamosan a telítetlen zsírsavak mennyisége csökkent, míg a telítetteké nem változott jelentős mértékben. Vizsgálataikkal a konjugált linolsav antioxidáns hatását bizonyították.

Kulcsszavak: konjugált linolsav, KLS, antioxidáns hatás, ghee

SUMMARY

Corn milled like flour was crumbled with 5% butter containing a high level of conjugated linoleic acid, then kept exposed to air on an aluminium tray at a layer of 1 cm thickness. Its acid number, peroxide number and fatty acid composition were measured weekly. It was established that during a 24 week long period, there was very little change in the composition of fatty acids, but after this, in parallel with the increasing acid number and peroxide number, the amount of unsaturated fatty acids decreased, while those values for saturated fatty acids did not change considerably. With these investigations, the authors proved the antioxidant effect of conjugated linoleic acid.

Keywords: conjugated linoleic acid, CLA, antioxidant effect, ghee

1. BEVEZETÉS

A konjugált linolsav antioxidáns hatásának vizsgálatára kísérletet állítottunk be, ghee-vel kevert kukoricadarával.

A ghee tisztított vajat jelent. Különösen magas a konjugált linolsav (KLS) tartalma, mely a főzés során közölt energia hatására alakul ki. Előszeretettel alkalmazzák ezt a technológiát a fejlődő világ országaiban, elsősorban Indiában, ahol a vaj számít a legfontosabb állati eredetű zsírforrásnak.

Kísérletekkel igazolták (Aneja és Murthi, 1991), hogy az indiai ghee KLS-szintjét nagyban befolyásolja annak előállítási módja. A KLS mennyisége akár ötszörösére is növelhető, ugyanis 0,5-0,6 g/100 g zsír KLS-t tartalmazó tehéntej nyersanyagból 2,5-2,8 g/100 g zsír KLS-tartalmú ghee-t sikerült előállítaniuk. A KLS-tartalmat befolyásolta a szűrés hőmérséklete is, ugyanis magasabb hőmérsékleten (120 °C) több keletkezett, mint alacsonyabb hőmérsékleten (110 °C). A ghee gyártása folyamán alkalmazott hőközléssel járó folyamatok, fehérje jelenlétében, minden kétséget kizáróan felelőssé tehetőek a KLS-szint növekedéséért.

A KLS az állati eredetű élelmiszerekben, ezen belül is a kérődzők húsában, tejében és a tejből készült tejtermékekben fordul elő nagyobb koncentrációban. A konjugált linolsav eredete lehet a bendőben zajló mikrobiális tevékenység, melynek során jelentős mennyiségű KLS keletkezhet (Kepler és mtsai, 1966), de a konjugált linolsav kialakulhat linolsavból is a napfény ultraibolya sugarainak hatására, és különösen monogasztrikus állatok esetében a takarmány KLS-tartalma is jelentős hatással lehet az állati test konjugált linolsav tartalmára.

Újabb vizsgálatok eredményei alapján feltételezni lehet, hogy a KLS a transz-C18:1 zsírsavakból is kialakulhat a tehének tejmirigyében (Griinari és Bauman, 1999), vagy a patkányok májában (Pollard és mtsai, 1980), a $\Delta 9$ -deszaturáz-reakcióval (Griinari és mtsai, 2000).

A konjugált linolsavak kémiai reakciókban – enzimek közreműködése nélkül is – kialakulhatnak a linolsavban gazdag olajok lúgos izomerizációja, vagy a ricinusolaj víztelenítése közben (Padley és mtsai, 1994). Nagy kéntartalmú fehérjék jelenlétében a linolsav *in vivo* szabadgyökös autooxidációja során is keletkezhet KLS. Egy olyan szintézismódszert is kifejlesztettek, amellyel metil-c9t11-KLS-at lehet előállítani ricinusolajból nyert ricinussav-metil-észterből (Berdeaux és mtsai, 1997).

A konjugált linolsavak (KLS) antioxidáns hatásáról több közlemény jelent meg (Ha és mtsai, 1990; Ip és mtsai, 1991; Van den Berg és mtsai,

1995). A szerzők szerint a konjugált linolsav a sejtmembránba beépülve megvédi azt az agresszív szabadgyökök támadásától, melynek következtében megakadályozza a sejtek kóros elburjánzását. Yin és mtsai (1999) szerint a membránszerkezet zavara és a relatív oxigén-diffúzió koncentráció termékeinek növekedése azok a lehetséges mechanizmusok, amelyeken keresztül a membránlipidekben lévő KLS hatással lehet az oxidatív stresszre. Jiang és Kamal-Eldin (1998) a KLS antioxidáns tulajdonságait vizsgálták egy *in vitro* modell rendszerben. Linolsav-metilészter (LSM) és konjugált linolsav-metilészter (KLSM) oldatokhoz metilénkéket (MK) adtak, majd megvilágítással fotooxidációt váltottak ki. A KLSM oldatok peroxidszáma lényegesen kisebb volt, mint a LSM oldatoké.

Fentiek miatt határoztuk el, hogy vizsgáljuk a ghee technológiával kapott magasabb KLS-tartalmú vaj antioxidáns hatását a kukoricadara esetében. Azért a kukoricadarát választottuk vizsgálatunk tárgyául, mert annak avasodása – a nagy koncentrációban jelenlévő linolsav miatt – rendkívül gyorsan zajlik le. Feltételezéseink szerint amennyiben a konjugált linolsav képes meggátolni a kukoricadara avasodását, nagy valószínűséggel más élelmiszer, illetve takarmány alapanyag avasodását is jótékonyan gátolhatja.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A ghee előállítása és keverése kukoricadarához

A vajat villanytűzhelyen 10 literes lábasban felolvasztottuk, és folyamatosan melegítettük. A melegítés közben képződött habot leszedtük. Amikor már nem képződött hab, papírszűrőn átszűrtük. A felfőzött vajat műanyag hordóban tároltuk a kukoricadarához történő keverésig.

A kukoricadarát lisztfinomságúra őröltük, majd 5% mennyiségben a megnövelt konjugált linolsav-tartalmú vajat kevertünk hozzá. Alapos összekeverés, illetve eldörzsölés után a keveréket selyempapírral bélelt alumíniumtálcára öntöttük, kb. 1 cm vastagságú rétegre elterítettük, a felületét pedig az oxidáció felgyorsítására, valamint a levegővel való jobb érintkezés érdekében egy fakeverővel naponta folyamatosan átkevertük. A keveréket 40 hétig 20 °C-on tartottuk, melynek során hetente meghatároztuk a savszámot és a peroxidszámot, a zsírsavösszetételt, beleértve a konjugált linolsavat is.

2.2. Kémiai analízis

A minták savszámát és peroxidszámát a Magyar Szabványnak (MSZ 683011) megfelelően végeztük.

2.2.1. A vaj zsírsav-összetételének meghatározása

Előkészítés bór-trifluoridos átészterezéshez. Körülbelül 0,5-1 g zsírt tartalmazó mintát 8-20 cm³ tömény sósavval forró vízfürdőn egy órán keresztül roncsoltuk. Miután lehűlt, 7 cm³ etanolt adtunk

hozzá. A lipideket előbb 15 cm³ éterrel, majd 15 cm³ petroléterrel (f.p.<60 °C) extraháltuk, majd a szerves fázisokat egyesítettük. Ebből annyit töltöttünk egy csiszolatos gömblombikba, amely kb. 150-200 mg zsírt tartalmazott, majd rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottuk az oldószert. A teljes bepárlás nem szükséges.

Hidrolízis és észterképzés. A bepárolt mintához 4 cm³ 0,5 M metanolos nátrium-hidroxid-oldatot öntöttünk, visszafolyó hűtőt szereltünk a gömblombikra, és elektromos melegítőn forraltuk addig, amíg az aljáról a zsírceppel el nem tűntek (kb. 5 perc). Ezután a hűtőn keresztül 4 cm³ 14%-os metanolos bór-trifluorid-oldatot öntöttünk a lombikba, és három percig forraltuk. Négy cm³ nátrium-szulfáton szárított hexánt adtunk hozzá, egy percig forraltuk, majd lehűtöttük. Lehűlés után levettük a hűtőt, és annyi telített vizes sóoldatot öntöttünk a lombikba, hogy a szerves fázis a nyakába kerüljön. Szétválás után a szerves fázisból mintát vettünk vízmentes nátrium-szulfátot tartalmazó fiolákba, és ebből injektáltunk a gázkromatográfba.

A gázkromatográfiai analízis körülményei: Készülék: Chrompack CP 9000 gázkromatográf; kolonna: 100 m×0,25 mm kvarc kapilláris, CS-Sil 88 (FAME) állófázis; detektor: FID 270 °C; injektor: splitter 270 °C; vivógáz: hélium, 235 kPa; hőmérséklet-program: kolonna 140 °C, 10 percig; 10 °C/perc emelés 235 °C-ig, izoterm 26 percig; injektált oldat térfogata: 0,5-2 µl. A zsírsav-metilészterek azonosítására a következő standardet használtuk: „37 component FAME Mix”, melynek gyártója és forgalmazója a Supelco cég.

2.2.2. A vaj konjugáltlinolsav-tartalmának meghatározása

Lipid-extrakció. Kb. 0,3 g zsírt tartalmazó mintát bemértünk egy 100 cm³-es főzőpohárba, majd 80 cm³ szerves oldószer-elegyet (hexán:i-propanol 3:2 arányú elegye, HIP) adtunk hozzá. Diszperziós készülékkel a mintát eloszlattuk a folyadékfázisban (IKA Ultra-turrax T25 basic típusú diszperziós készülék, 2. fokozat (9500 RPM), 2 perc). Ezt követően a szuszpenziót membránszűrőn keresztül (MN640W típus, 90 mm átmérő) gravitációs úton 250 cm³-es Erlenmeyer lombikba szűrtük. A szűrőt háromszor 10 cm³ HIP eleggyel átmostuk, a szerves fázisokat egyesítettük. A szűrletekhez 5,0 g vízmentes nátrium-szulfátot tettünk és összeráztuk. A mintából származó víz megkötése után a szerves fázist a sóról talpas gömblombikba leöntöttük, majd rotációs gyorsbepárlón vákuum alatt 80 °C-on bepároltuk. A bepárlási maradékot n-hexánnal, 10 cm³-es mérőlombikba mostuk (hexános törzsoldat).

Metilezés. A hexános törzsoldatból kivettünk 0,5 cm³-t, 4 cm³-es, lezárható fedelű üvegcsébe tettük, 0,5 cm³ 4 M metanolos nátrium-metilát-oldatot adtunk hozzá, összeráztuk, majd 50 °C-on 30 percen át melegítettük. Ezt követően 1 cm³ hexánt, majd 1 cm³ vizet adtunk hozzá, összeráztuk és a fázisok elválása után a szerves fázisból 1 cm³-t

5 cm³-es mérőlombikba tettünk, majd a vizes fázishoz 1,2 cm³ hexánt adtunk, összeráztuk, majd 1 cm³ hexános fázist a mérőlombikba vittük át. A hexános extrakciót a fentén kívül még kétszer megismételtük, az utolsó hexános fázis elvételekor lehetőség szerint a teljes felső fázist eltávolítottuk, majd a lombikot jelre töltöttük, és az így kapott oldatot csavaros tetéjű fiolában mélyhűtve tároltuk az analízis megkezdéséig.

Kromatográfias körülmények. Hőmérséklet-program: kolonna 140 °C, 10 percig; 5 °C/perc emelés 235 °C-ig, izoterm 30 percig. Az injektált oldat térfogata: 2 µl. Az egyéb körülmények azonosak a zsírsav-összetétel meghatározásánál leírtakkal. A standard törzsoldat és a kalibrációs sor készítésére alkalmas bármely gyártó által forgalomba hozott konjugált linolsav-készítmény (pl. a Sigma cég által forgalmazott konjugált linolsav-elegy).

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A vaj KLS tartalma a felfőzés előtt 0,56% volt a zsírsav-metilészterek relatív tömegszázalékában mérve, mely a ghee készítés során 1,68%-ra nőtt. A kukoricadarával összekeverve a kapott zsíros anyag konjugált linolsav-tartalmát 0,36%-nak mértük, tehát maga a kukoricadara is tartalmazott minimális mennyiségben konjugált linolsavat.

A savszám és a peroxidszám változását elemezve megállapítottuk, hogy a peroxidszám 20 hét alatt, a kísérlet kezdetén mért 7-ről 50-re, a savszám pedig ugyanezen időszakban 5-ről 10-re nőtt (1. ábra). A tárolás 20. és 40. hete között a peroxidszám 50-ről 229-re, a savszám pedig 10-ről 39-re nőtt. A 40. hét után kísérleteinket nem terveztük folytatni, hisz 40 hét alatt az élelmiszerek és a takarmányok többségét felhasználják, a 40. hetet meghaladó felhasználásra csak nagyon ritkán kerül sor.

Vizsgálatainkból levonhatjuk azt a következtetést, hogy 20 héten keresztül sem a peroxidszám, sem a savszám nem haladta meg a szabvány által előírt még megengedhető értéket, tehát a megnövelt KLS-tartalmú vaj 20 héten át meggátolta az avasodásra rendkívül hajlamos kukoricadara romlását. A 20. hetet követően a peroxidszám rohamosan elkezdett növekedni, azonban a savszám még a tárolás 40. hetében is csak 39-es értéket ért el.

1. ábra: Savszám, peroxidszám

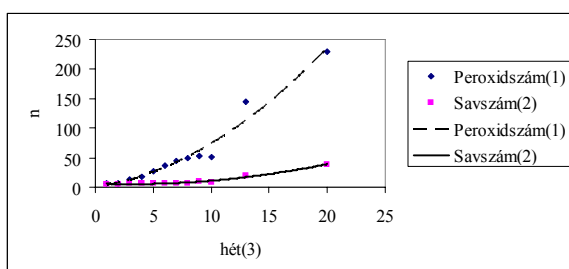


Figure 1: Acid and peroxide number
peroxide number(1), acid number(2), week(3)

A tárolás első 20 hetében a konjugáltlinolsav-tartalom 0,30%-ról 0,26%-ra csökkent (2. ábra). Ugyanezen idő alatt a linolsav 28,6%-ról 27,5%-ra csökkent (3. ábra), de az olajsav- és a linolénsav-tartalom (4. ábra) alig változott, és ugyancsak változatlanok maradtak a rövid, a közepes és a hosszú szénláncú telített zsírsavak is. A tárolás 20. és 40. hete között a KLS-tartalom 0,26%-ról 0,11%-ra, a linolsav-tartalom 27-28%-ról 23-24%-ra, a linolénsav-tartalom pedig 0,89%-ról 0,65%-ra csökkent, és még ebben az időszakban sem változott lényegesen az olajsav mennyisége, valamint a telített zsírsavak aránya.

2. ábra: Konjugált linolsav tartalom

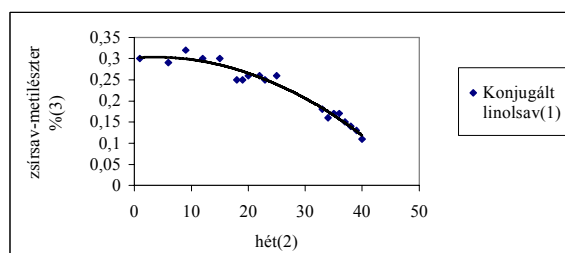


Figure 2: Conjugated linoleic acid content
conjugated linoleic acid(1), week(2), fatty acid-methylester %(3)

3. ábra: Linolsav tartalom

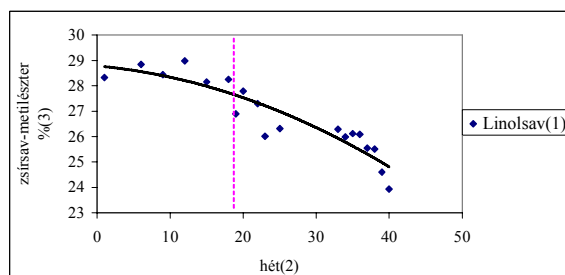


Figure 3: Linoleic acid content
linoleic acid(1), week(2), fatty acid-methylester %(3)

4. ábra: Linolénsav tartalom

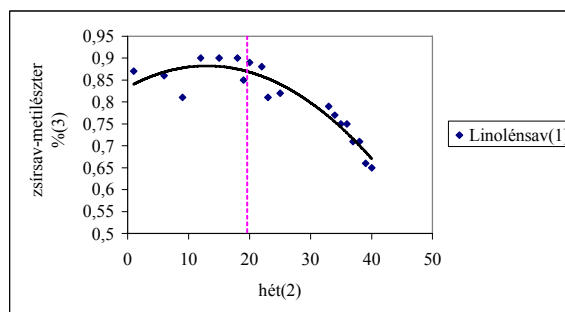


Figure 4: Linolenic acid content
linolenic acid(1), week(2), fatty acid-methylester %(3)

Kísérleteinkből tehát levonhatjuk azt a következtetést, hogy az összes többszörösen telítetlen zsírsav közül a konjugált linolsav a legérzékenyebb az oxidációra, tehát antioxidáns hatása a legnagyobb. A megnövelt KLS-tartalomnak köszönhetően a (ember számára esszenciális) linolsav és a (félíg esszenciális) linolénsav mennyisége alig változott a

tárolás első hetében, és a változás a tárolás 20. hete után is, arányaiban elhanyagolható volt a konjugált linolsavhoz viszonyítva.

Fentiekből levonhatjuk az a következtetést, hogy a megnövelt KLS-tartalmú vaj (ghee) jelentős antioxidáns tulajdonságával megvédi az élelmiszerek és a takarmányok oxidációra érzékeny komponenseit.

IRODALOM

- Aneja, R.P.-Murthi, T.N. (1991): Beneficial effects of ghee. *Nature*, 350. 280.
- Berdeaux, O.-Christie, W.W.-Gunstone, F.D.-Sebedio, J.L. (1997): Large-scale synthesis of methyl cis-9, trans-11-octadecadienoate from methyl ricinoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74. 1011-1015.
- Griinari, J.-Bauman, T.B. (1999): Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. (Eds. Yuracez, M.W.-Mossoba, M.M.-Kramer, J.K.G.-Pariza, M.W.-Nelson, G.) AOCS Press, Champaign, IL. 1 180-198.
- Griinari, J.-Corl, B.A.-Lacy, P.Y.-Chouinard, K.V.-Nurmela, V.-Bauman, D.E. (2000): Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *J. Nutr.*, 130. 2285-2291.
- Ha, Y.L.-Storckson, J.-Pariza, M.W. (1990): Inhibition of benzo(a)prene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.*, 50. 1097-1101.
- Ip, C.-Chin, S.F.-Scimeca, J.A.-Pariza, M.W. (1991): Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.*, 51. 6118-6124.
- Jiang, J.-Kamal-Eldin, A. (1998): Comparing methylene blue-photosensitized oxidation of methyl-conjugated linoleate and methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 46. 3. 923-927.
- Kepler, C.R.-Hirons, K.P.-McNeill, J.J.-Tove, S.B. (1966): Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, 241. 1350-1354.
- Padley, F.B.-Gunstone, F.D.-Harwood, J.L. (1994): Occurrence and characteristic of oils and fats. In: *The lipid Handbook*. (Eds. Gunston, F.D.-Harwood, J.L.-Padley, F.B.) Chapman & Hall, London. 51.
- Pollard, M.R.-Gunstone, F.D.-James, A.T.-Morris, L.J. (1980): Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids*, 15. 306-314.
- Van den Berg, J.J.M.-Cook, N.E.-Tribble, D.L. (1995): Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids*, 30. 599-605.
- Yin, J.J.-Mossoba, M.M.-Kramer, J.K.G.-Yurawecz, M.P.-Eulitz, K.-Morehouse, K.M.-Ku, Y. (1999): Effect of conjugated linoleic acid on oxygen diffusion-concentration product and depletion in membranes by using elektron spin resonance spin-label oximetry. *Lipids*, 34. 10. 1017-1023.