

# A konjugált linolsav antioxidáns hatásának vizsgálata egy modell kísérletben

## Examination of the Antioxidant Effect of Conjugated Linoleic Acid During a Model Experiment

SALAMON Rozália<sup>1</sup>, GYŐRI Anikó<sup>2</sup>, GYŐRI Zoltán<sup>2</sup>, LÓKI Katalin<sup>3</sup>, SÁRA Péter<sup>3</sup>,  
SALAMON Szidónia<sup>1</sup>, CSAPÓNÉ KISS Zsuzsanna<sup>3</sup>, CSAPÓ János<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>EMTE Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék,  
RO-4100 Csíkszereda, Szabadság tér 1., Tel.: 40-266-314-657, fax: 40-266-372-099;  
salamonrozalia@sapientia.sicorum.ro

<sup>2</sup>Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum, H-4032 Debrecen,  
Böszörményi út 138., Tel.: 36-52-417-572, fax: 36-52-417-572; gyori@agr.unideb.hu, www.agr.unideb.hu

<sup>3</sup>Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kémiai-Biokémiai Tanszék,  
H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40. Tel.: 36-82-314-155, fax: 36-82-321-749,  
e-mail: csapo@mail.atk.u-kaposvar.hu; www.u-kaposvar.hu

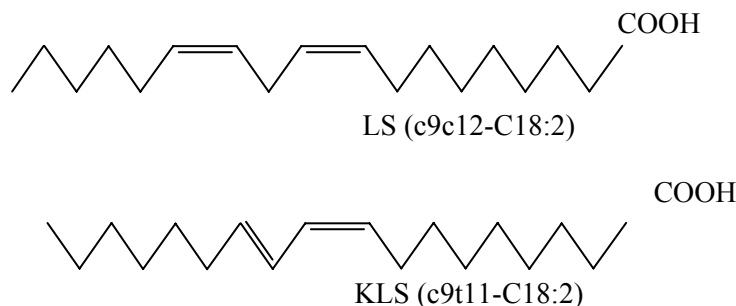
### ABSTRACT

Corn milled like flour was crumbled with 5% butter containing high level of conjugated linoleic acid (CLA), then it was kept on free air on an aluminum tray in a thick layer of 1 cm and its acid number, peroxide number and fatty acid composition was measured every week. We 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 of acid number and peroxide number, the amount of unsaturated fatty acids decreased, while the saturated ones did not change considerably. With our investigations we wished to point out the antioxidant effect of the conjugated linoleic acid.

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

### 1. BEVEZETÉS

A konjugált linolsav megnevezés azon linolsav-izomerek (szerkezeti és geometriai izomerek) gyűjtőneve, amelyek a linolsavval szemben nem izolált, hanem konjugált helyzetben tartalmazznak két kettős kötést. A kettős kötések többnyire a 9, 11, vagy a 10, 12 helyzetben találhatóak [1], de egyéb pozíciókban (8, 11; vagy 11, 13) is előfordulhatnak [2]. Mindkét kettős kötés lehet *cisz* (*c*), vagy *transz* (*t*) konfigurációjú (1. ábra).



1. ábra

*A linolsav és a konjugált linolsav képlete*

A KLS a természetben főként a többszörösen telítetlen zsírsavak biológiai hidrogénezése során termelődik. Ez a bakteriális enzimtevékenység főként a kérődző állatok bendőjében zajlik [3], és feltételezik, hogy a patkányok bélcsatornájában található mikrobák is képesek a szabad linolsavat c9t11 konjugált linolsavvá alakítani. A leggyakrabban előforduló természetes CLA-izomer a C9t11-C18:2 [4], amely a c9t12 linolsav biológiai hidrogénezésének első lépésében keletkezik. A *Butyrivibrio fibrisolvens* baktérium mikrobiális izomeráz enzimének hatására a linolsavból (c9c12-C18:2) először konjugált linolsav (c9c11-C18:2) képződik, majd a c9 kettős kötés két hidrogénatom felvételével telítődik és így egy egyszeresen telítetlen zsírsav (t11-C18:1) jön létre. Ez további hidrogénezéssel sztearinsavvá (C18:0) alakulhat át [5].

Újabb vizsgálatok eredményei alapján feltételezni lehet, hogy a CLA a transz-C18:1 zsírsavakból is kialakulhat a tehenek tejmirigyében [6], vagy a patkányok májában [7], a  $\Delta 9$ -deszaturáz-reakcióval [8].

A konjugált linolsavak kémiai reakciókban – enzimek közreműködése nélkül is – kialakulhatnak a linolsavban gazdag olajok lúgos izomerizációja, vagy a ricinusolaj víztelenítése közben [9]. A linolsav *in vivo* szabadgyökös autooxidációja során is keletkezhet CLA, nagy kéntartalmú fehérjék jelenlétében. Egy olyan szintézismódszert is kifejlesztettek, amellyel metil-c9t11-CLA-t lehet előállítani ricinusolajból nyert ricinus-sav-metil-észterből [10].

A vaj egy különleges élelmiszer, hisz benne konjugált linolsavon kívül nagy mennyiségben található rövid szénláncú zsírsavak is. Különösen magas a felfőzött vaj (ghee) 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 [11], hogy az indiai ghee KLS-szintjét nagyban befolyásolja annak előállítás módja. A KLS mennyisége akár ötszörösére is növelhető az előállítás során. Sikerült 0,5–0,6 g/100g zsír KLS-t tartalmazó tehéntej nyersanyagból 2,5–2,8 g/100g zsír KLS-tartalmú ghee-t előállítani. A KLS-tartalom növekedéséért részben az alvadékképzés során fellépő mikrobiális fermentáció tehető felelőssé, de a KLS-tartalmat befolyásolta a szűrés hőmérséklete is, ugyanis magasabb hőmérsékleten (120 °C) több KLS 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 konjugált linolsavak (KLS) antioxidáns hatásáról több közlemény jelent meg [12-15]. Egyesek szerint a konjugált linolsav a sejtmembránba beépülve megvédi azt az agresszív szabadgyökök támadásától, melynek következtében megakadályozza a sejtek kóros elburjánzását. A KLS elsősorban 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, de a konjugált linolsav kialakulhat linolsavból is a napfény ultraibolya sugarainak hatására, és különösen monogasztrikus állatoknál a takarmány KLS-tartalma is jelentős hatással lehet az állati test konjugáltlinolsav-összetételére.

Fentiek miatt határoztuk el, hogy vizsgáljuk a ghee technológia során 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 kukoricadarához történő keverése

A szakirodalomban közölt módszerek alapján a vajat 50 literes zsírfőző üstben felolvasztottuk, és addig forraltuk ameddig habmentessé nem vált. A habot folyamatosan leszedtük, a felfőzött vajat pedig műanyag zsákokban tároltuk a kukoricadarához történő keverésig.

A kukoricadarát lisztfinomságúra megőröltük, majd 5% mennyiségben a konjugáltlinolsav-tartalomban megnövelt vajat kevertük hozzá. Alapos összekeverés, illetve eldörzsölés után a keveréket selyempapírral bélelt alumíniumtálcára öntöttük, kb. 1 cm vastagságú rétegre elterítettük, a felületét pedig az oxidáció felgyorsítására ill. 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 tejsír zsírsav-összetételének meghatározása

*Előkészítés bór-trifluoridos átészterezéshez.* Körülbelül 0,5–1 g zsírt tartalmazó mintát 8–20 cm<sup>3</sup> tömény sósavval forró vízfürdőn egy órán keresztül roncsoltuk. Miután lehült, 7 cm<sup>3</sup> etanolt adtunk hozzá. A lipideket előbb 15 cm<sup>3</sup> éterrel, majd 15 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> 0,5 M metanolos nátrium-hidroxid-oldatot öntöttünk, visszafolyó hűtőt szereltünk a gömblombikra, és elektromos melegítőn forraltuk addig, amíg az aljáról a zsírcseppek el nem tűntek (kb. 5 perc). Ezután a hűtőn keresztül 4 cm<sup>3</sup> 14%-os metanolos bór-trifluorid-oldatot öntöttünk a lombikba, és három percig forraltuk. Négy cm<sup>3</sup> nátrium-szulfáton szárított hexánt adtunk hozzá, egy percig forraltuk, majd lehűtöttük. Lehülés 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 gázkromatográfias analízis körülményei:* Készülék: Chrompack CP 9000 gázkromatográf; kolonna: 100 m x 0,25 mm kvarc kapilláris, CS-Sil 88 (FAME) állófázis; detektor: FID 270 °C; injektor: splitter 270 °C; vivőgáz: 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-metil-észterek azonosítására a következő standardet használtuk: „37 component FAME Mix”, melynek gyártója és forgalmazója a Supelco cég.

### 2.2.2. A tejsír konjugáltlinolsav-tartalmának meghatározása

*Lipid-extrakció.* Kb. 0,3 g zsírt tartalmazó tejet bemértünk egy 100 cm<sup>3</sup>-es főzőpohárba, majd 80 cm<sup>3</sup> szerves oldószerelegyet (hexán:i-propanol 3:2 arányú elegye, HIP) adtunk hozzá. Diszperziós készülékkel a mintát eloszlattuk a folyadékfázisban (IKA gyártmányú, 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 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer lombikba szűrtük. A szűrőt háromszor 10 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikba mostuk (hexános törzsoldat).

*Metilezés.* A hexános törzsoldatból kivettünk 0,5 cm<sup>3</sup>-t, 4 cm<sup>3</sup>-es, lezárható fedelű üvegcsébe tettük, majd 0,5 cm<sup>3</sup> 4 M metanolos nátrium-metilát-oldatot adtunk hozzá, összeráztuk, majd 50 °C-on 30 percen át melegítettük. Ezt követően 1 cm<sup>3</sup> hexánt, majd 1 cm<sup>3</sup> vizet adtunk hozzá, összeráztuk, a fázisok elválása után a szerves fázisból 1 cm<sup>3</sup>-t 5 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikba tettünk, majd a vizes fázishoz 1,2 cm<sup>3</sup> hexánt adtunk, összerázzuk, majd 1 cm<sup>3</sup> hexános fázist a mérőlombikba vittük át. A hexános extrakciót a fentén kívül még kétszer megismételtük, az utolsó hexános fázis elvételénél lehetőség szerint a teljes felső fázist eltávolítottuk, majd a lombikot jelre töltöttük, és az így kapott oldatot csavaros tetejű 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. 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 konjugáltlinolsav-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. 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.

A tárolás első 20 hetében a konjugáltlinolsav-tartalom 0,30%-ról 0,26%-ra csökkent. Ugyanezen idő alatt a linolsav 28,6%-ról 27,5%-ra csökkent, az olajsav- és a linolénsav-tartalom 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.

Kísérleteinkből tehát levonhatjuk azt a következtetést, hogy az összes többszörösen telített zsírsav közül a konjugált linolsav a legérzékenyebb az oxidációra, tehát az ő antioxidáns hatása a legnagyobb. Talán a megnövelt KLS-tartalomnak köszönhetően az ember számára esszenciális linolsav és félig 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 tulajdonságánál fogva megvédi az élelmiszer és a takarmány oxidációra érzékeny komponenseit.

#### 4. IRODALOM

- [1.] Ha, Y.L. – Grimm, N.K. – Pariza, M.W.: Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*. 1987. 8. 1881-1887.
- [2.] Christie, W.W. – Dobson, G. – Gunstone, F.D.: Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid. *J. Nutr.* 1997. 124. 694-701.
- [3.] Chin, S.F. – Liu, W. – Albright, K. – Pariza, M.W.: Tissue levels of cis-9, trans-11 conjugated dienoic isomer of linoleic acid (CLA) in rats fed linoleic acid (LA). *Faseb J.* 1992a. 6. A1396.
- [4.] Kepler, C.R. – Tove, S.B.: Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 1967a. 241. 1351-1354.
- [5.] Kepler, C.R. – Tucker, W.P. – Tove, S.B.: Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 1971. 246. 2765-2771.
- [6.] Griinari, J. – Bauman, T.B.: 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. 1999. 1 180-198.
- [7.] Pollard, M.R. – Gunstone, F.D. – James, A.T. – Morris, L.J.: Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids*. 1980. 15. 306-314.
- [8.] Griinari, J. – Corl, B.A. – Lacy, P.Y. – Chouinard, K.V. – Nurmela, V. – Bauman, D.E.: Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta^9$ -desaturase. *J. Nutr.* 2000. 130. 2285-2291.
- [9.] Padley, F.B. – Gunstone, F.D. – Harwood, J.L.: Occurrence and characteristic of oils and fats. In: *The Lipid Handbook*. (Eds. Gunston, F.D., Harwood, J.L., Padley, F.B.) Chapman & Hall, London, 1994. 51.
- [10.] Berdeaux, O. – Christie, W.W. – Gunstone, F.D. – Sebedio, J.L.: Large-scale synthesis of methyl cis-9, trans-11-octadecadienoate from methyl ricinoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997. 74. 1011-1015.
- [11.] Aneja, R.P. – Murthi, T.N.: Beneficial effects of ghee. *Nature*. 1991. 350. 280.
- [12.] Ha, Y.L. – Storrkson, J. – Pariza, M.W.: Inhibition of benzo(a)prene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 1990. 50. 1097-1101.
- [13.] Ip, C. – Chin, S.F. – Scimeca, J.A. – Pariza, M.W.: Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 1991. 51. 6118-6124.
- [14.] Chen, Z.Y. – Chan, P.T. – Zhang, A.: Reassessment of the antioxidant activity of conjugated linoleic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997. 6. 749-753.
- [15.] Van den Berg, J.J.M. – Cook, N.E. – Tribble, D.L.: Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids*. 1995. 30. 599-605.