

## ОСОБЛИВОСТІ УТВОРЕННЯ ДІЄНОВИХ КОН'ЮГАТІВ ЛІНОЛЕВОЇ КИСЛОТИ У МОЛОЧНОКИСЛИХ ПРОДУКТАХ, ЯКІ МІСТЯТЬ ЖИВІ КУЛЬТУРИ МІКРООРГАНІЗМІВ

О. І. Віщур<sup>1</sup>, Р. А. Голубець, О. В. Голубець, А. М. Лазарева, С. М. Шкаруба, О. І. Федько<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології тварин НААН

<sup>2</sup>ДП Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів

У статті наведені дані щодо співвідношення транс-ізомерів олеїнової кислоти та дієнових кон'югатів у ліпідах, виділених із зразків молочнокислих продуктів, які містять живі культури мікроорганізмів. Отримані результати свідчать про те, що вміст кон'югованої лінолевої кислоти у йогуртах, збагачених живими культурами мікроорганізмів, не відрізняється від середніх показників, встановлених для ліпідів, виділених з інших молочних продуктів. Встановлено, що співвідношення дієнових кон'югатів залежить від видового складу популяції мікроорганізмів. Основним ізомером олеїнової кислоти є транс11-18:1, а лінолевої – цис9, транс11-18:2.

**Ключові слова:** МОЛОЧНИЙ ЖИР, ТРАНС-ІЗОМЕРИ, КОН'ЮГОВАНА ЛІНОЛЕВА КИСЛОТА

З того часу як у 80-х роках минулого століття було виявлено антиканцерогенну дію екстракту яловичини [11], постійний інтерес викликають сполуки, що її обумовлюють — дієнові кон'югати лінолевої кислоти. Під цим терміном об'єднана група ізомерів лінолевої кислоти з подвійними зв'язками у положеннях (7-9), (8-10), (9-11), (11-13), (12-14), орієнтованими у цис- або транс-положеннях. Численні дослідження підтверджують, що кон'югована лінолева кислота сповільнює розвиток хімічно індукованих злоякісних пухлин, діючи як антиоксидант [12], інгібітор синтезу нуклеотидів та білків або виявляючи цитотоксичну дію [23]. Дієнові кон'югати зменшують відкладання жиру [20], попереджують виникнення атеросклерозу [8] та діабету [7], підсилюють імунну функцію завдяки стимуляції клітинних та гуморальних факторів захисту [6, 18, 19].

Основним природним джерелом дієнових кон'югатів є молоко та м'язова тканина жуйних тварин, в яких більше 90 % від їх сумарної кількості становить цис9, транс11-18:2 ізомер (рубцева кислота). Вона утворюється при біогідрогенізації лінолевої кислоти внаслідок ізомеризації подвійного зв'язку у положенні (цис12) під впливом ферментів мікроорганізмів вмісту рубця. Вперше здатність до ізомеризації лінолевої кислоти було описано для *Butyrivibrio fibrisolvens* [14]. У подальшому ця властивість була виявлена у багатьох інших видів бактерій, виділених з вмісту рубця, кишечника людини та тварин [1, 15].

Молочні продукти з цільного молока містять дієнові кон'югати у кількості 6-16 мг/г загального жиру [21]. У середньому у добовому раціоні сучасної людини міститься від 150-212 до 300-1500 мг цих сполук [22]. У той же час для попередження розвитку онкологічних захворювань необхідний щоденний прийом не менш, як 3 г дієнових кон'югатів.

Питанню збільшення вмісту ізомерів олеїнової кислоти і дієнових кон'югатів лінолевої кислоти у складі ліпідів молока присвячені чисельні дослідження. Встановлено, що згодовування коровам екструдованої сої викликає збільшення вмісту дієнових кон'югатів жирних кислот у жирі молока в два рази, а риб'ячого жиру — утричі [10]. Додавання до раціону соняшникової олії збільшує вміст рубцевої кислоти в молоці до п'яти разів [9].

Враховуючи, що у складі багатьох видів бактерій присутні ферменти, необхідні для утворення кон'югованої лінолевої кислоти, перспективним напрямком збагачення молочних продуктів дієновими кон'югатами є застосування культур мікроорганізмів, здатних ізомеризувати лінолеву кислоту.

Метою роботи було вивчити кількісний вміст та ізомерний склад кон'югованої лінолевої кислоти у молочнокислих продуктах, які містять живі культури мікроорганізмів.

### Матеріали і методи

Для дослідження з торговельної мережі м. Києва було відібрано 5 зразків йогуртів та молочнокислих продуктів, які містять живі культури мікроорганізмів.

Вміст молочнокислих мікроорганізмів у зразках визначали згідно з ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов».

Ліпіди із зразків виділяли шляхом екстрагування *n*-гексаном. Метилування жирних кислот проводили методом лужного гідролізу із застосуванням розчину метоксиду натрію у метанолі.

Жирнокислотний склад досліджували методом газорідинної хроматографії на газовому хроматографі Hewlett Packard HP-6890 із застосуванням капілярної колонки HP-88 (88%-cyanopropyl aryl-polysiloxane, Agilent Technologies) довжиною 100 м, з внутрішнім діаметром 0,25 мм та товщиною шару нерухомої фази 0,2 мкм за наступних умов: швидкість потоку газу-носія — 1,2 мл/хв., коефіцієнт поділу потоку — 1:100, температура випаровувача — 280 °С, температура детектора (ПД) — 290 °С, температурний режим колонки — поступовий нагрів від 60 °С до 230 °С.

Для ідентифікації хроматографічних піків та обрахунку хроматограм використовували індивідуальні стандартні розчини метилових ефірів жирних кислот, у тому числі *транс6-*, *транс9-*, *транс11-*, *транс12-*, *цис6-*, *цис9-*, *цис11-*-ізомерів октадецевої кислоти виробництва фірми Sigma Chemical Co, суміш метилових ефірів жирних кислот 37 Component FAME Mix т.м. Supelco (кат. № 47885-U) та суміш метилових ефірів кон'югованої лінолевої кислоти т.м. Sigma (кат. № O5632).

Реєстрацію та обробку хроматограм здійснювали за допомогою персонального комп'ютера, оснащеного програмним забезпеченням HP ChemStation.

### Результати й обговорення

Зразки йогуртів, відібраних для дослідження, відрізнялись за якісним та кількісним складом мікроорганізмів (табл. 1). Три з досліджених зразків містили лише лактобактерії, один — лактобактерії у сполученні з біфідобактеріями та пропіоновокислими бактеріями. Один із зразків містив суміш різних видів лактобактрій із біфідобактріями та *Str. thermophilus*.

Таблиця

Склад досліджуваних зразків йогуртів

№ п/п	Найменування продукту	Вміст жиру, %	Склад мікроорганізмів (згідно з маркуванням виробника)	Визначена кількість мікроорганізмів, КУО/г
1	Біойогурт	2,5	Лактобактерії	$6,0 \cdot 10^7$
2	Йогурт	2,5	<i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> susp. <i>bulgaricus</i> , <i>Str. thermophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> ,	$1,4 \cdot 10^8$
3	Молочний продукт	1,6	<i>L. casei</i>	$1,0 \cdot 10^9$
4	Кисломолочний продукт	2,6	Молочнокислі бактерії Біфідобактерії Пропіоновокислі бактерії	$1,5 \cdot 10^7$
5	Кисломолочний продукт	2,5	<i>L. acidophilus</i>	$8,5 \cdot 10^7$

Сумарний вміст транс-ізомерів олеїнової кислоти у жирі, виділеному із зразків, що піддавались випробуванням, коливався від 1,5 до 3,4 %. У більшості зразків виявлено ізомери транс6-, транс9-, транс10- та транс11-18:1, причому вакценова кислота (*транс11-18:1*) становила в середньому 70,3 % від суми транс-ізомерів (рис. 1).

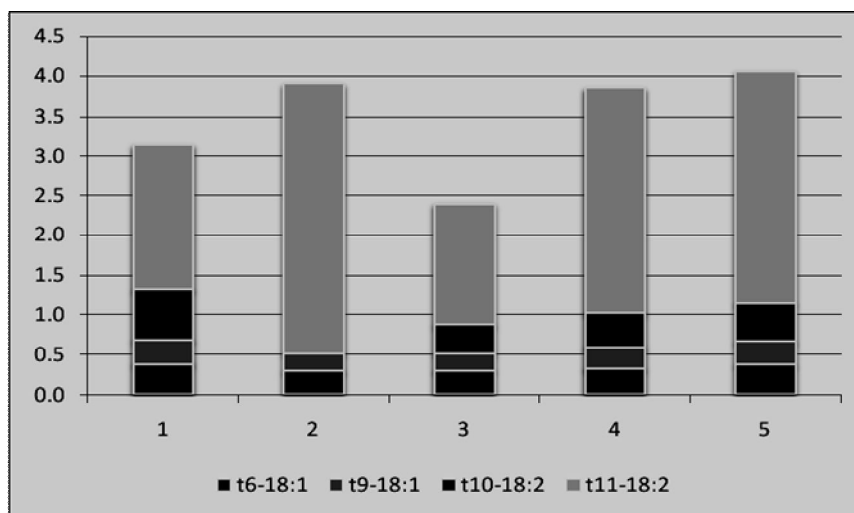


Рис. 1. Вміст транс-ізомерів 18:1 у досліджених зразках йогуртів

Серед ізомерів кон'югованої лінолевої кислоти в усіх зразках переважав *цис9,транс11-18:2*, середній вміст якого становив  $1,20 \pm 0,27$  г/100 г жиру або  $93,0 \pm 2,6$  % від суми дієнових кон'югатів. Крім нього, у чотирьох зразках було виявлено ізомери *цис10,цис12-*, *транс10,цис12-*, *цис11,транс13-*, *цис9,цис11-18:2* (рис. 2).

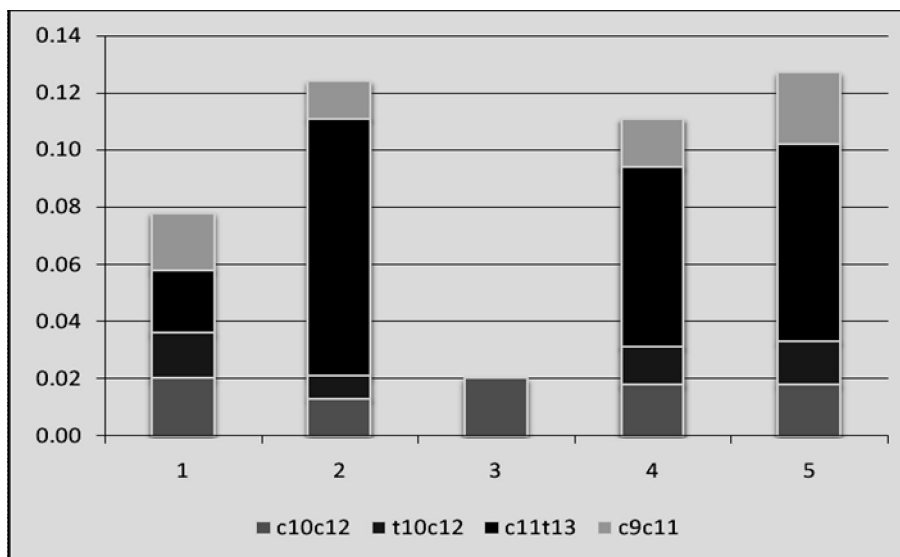


Рис. 2. Вміст у досліджених зразках йогуртів дієнових кон'югатів дінолевої кислоти (крім ізомеру *цис9,транс11-18:2*)

Отримані результати свідчать про те, що вміст кон'югованої лінолевої кислоти у йогуртах, збагачених живими культурами мікроорганізмів, не відрізняється від середніх показників, встановлених для ліпідів молока, масла тощо. Як і в інших молочних продуктах, у йогуртах основним ізомером олеїнової кислоти є *транс11-18:1*, а лінолевої – *цис9,транс11-18:2*. Однак порівняно із ліпідами, виділеними з молочних продуктів, які не піддавались дії

молочнокислих мікроорганізмів, жир, виділений з йогуртів, характеризується більшим різноманіттям дієнових кон'югатів. Вочевидь, це значною мірою обумовлено видовим складом популяції мікроорганізмів. Зокрема, у зразках № 1 і № 3, які містили лише лактобактерії, спостерігався найнижчий вміст ізомеру *транс10,цис12-18:2*, а у зразку № 3 взагалі не виявлено інших дієнових кон'югатів. Навпаки, у жирі, виділеному із інших зразків, до складу яких входило декілька видів лактобактерій, біфідобактерії та молочнокислі стрептококи, виявлено, крім ізомерів *цис9,транс11-* та *транс10,цис12-18:2* ще 3 дієнові кон'югати.

Результати проведених досліджень узгоджуються із існуючими літературними даними. Здатність перетворювати вільну лінолеву кислоту на дієнові кон'югати була виявлена у лактобактерій, біфідобактерій, пропіоновокислих бактерій [16]. Інтенсивність продукції кон'югованої лінолевої кислоти залежить від особливостей середовища росту, рН та фази росту культури [4]. При додаванні до знежиреного молока вільної лінолевої кислоти 60-90% її перетворювалось на дієнові кон'югатів, з яких 75-93% становив ізомер *цис9,транс11-18:2* [13].

Не зважаючи на цю властивість молочнокислих бактерій, більшість дослідників не спостерігали зростання їх частки у йогуртах [2,5]. Натомість при додаванні до молока соняшникової олії з вмістом лінолевої кислоти 70 % культура *Lactococcus lactis* підвищувала концентрацію кон'югованої лінолевої кислоти в кінцевому продукті у 1,5 рази [3]. Зростання частки ізомеру *цис9,транс11-18:2* більш, ніж у 2 рази, спостерігалось також при застосуванні змішаної закваски, що складалась із штамів *L. acidophilus*, *L. delbrueckii susp. bulgaricus* та *Str. thermophilus* [17].

## **Висновки**

Застосування різних культур молочнокислих бактерій супроводжується утворенням різноманітних дієнових кон'югатів, переважну більшість серед яких становить ізомер *цис9,транс11-18:2*. Для утворення кон'югованої лінолевої кислоти мікроорганізми потребують додавання відповідного субстрату — джерела лінолевої кислоти.

**Перспективи подальших досліджень.** Перспективним напрямом збагачення молочнокислих продуктів дієновими кон'югатами може бути додавання до заквасок вільної лінолевої кислоти або рослинних олій з високим її вмістом.

## **CHARACTERISTICS OF CONJUGATED LINOLEIC ACID FORMATION IN CULTURED MILK FOODS WITH ALIVE CULTURES OF BACTERIA**

*O. Vishchur, R. Golubets, O. Golubets, A. Lasareva, S. Shkaruba, O. Fedko*

### **S u m m a r y**

In article the data on an concentration of trans-isomers of oleic acid and conjugated linoleic acid in lipids from samples of cultured milk foods with alive cultures of bacteria are resulted. The obtained results illustrate that the contents of conjugated linoleic acid in yoghurts, enriched with alive cultures, does not differ from those in lipids from other milk products. Is established, that the ratio of conjugated linoleic acid in a product depends on a species composition of bacterial population. The basic isomer of oleic acid is *trans11-18:1*, and linoleic – *c9,t11-18:2*.

## ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ДИЕНОВЫХ КОНЬЮГАТОВ ЛИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В МОЛОЧНОКИСЛЫХ ПРОДУКТАХ, СОДЕРЖАЩИХ ЖИВЫЕ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

*О. И. Вищур, Р. А. Голубец, О. В. Голубец, А. Н. Лазарева, С. Н. Шкаруба, О. И. Федько*

### А н н о т а ц и я

В статье приводятся данные о соотношении транс-изомеров олеиновой кислоты и диеновых конъюгатов в липидах, выделенных из образцов молочнокислых продуктов, содержащих живые культуры микроорганизмов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что содержание конъюгированной линолевой кислоты в йогуртах, обогащенных живыми культурами микроорганизмов, не отличается от средних показателей, установленных для липидов, выделенных из других молочных продуктов. Установлено, что соотношение диеновых конъюгатов в продукте зависит от видового состава популяции микроорганизмов. Основным изомером олеиновой кислоты является транс11-18:1, а линолевой — цис9,транс11-18:2.

1. *Alonso L.* Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin / L. Alonso, E. P. Cuesta, S.E.Gilliland. — *J. Dairy Sci.* — 2003. — Vol. 86.— P. 1941–1946.

2. *Boylston T. D.* Conjugated linoleic acid and fatty acid composition of yoghurt produced from milk of cows fed soy oil and conjugated linoleic acid / T. D. Boylston, D.C Beitz // *J. Food Sci.* — 2002. — Vol. 67. — P. 1973–1978.

3. Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk / C.P.Van Nieuwenhove, R.Oliszewski, S. N. Gonzalez [et al.] // *Letters in Applied Microbiology*—2007.—Vol.44.—P.467—474.

4. Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk / C.P.Van Nieuwenhove, R.Oliszewski, S.N.Gonzalez [et al.] // *Letters in Applied Microbiology*—2007.—Vol.44.—P.467—474.

5. *Dave R.I.* Changes in fatty acid composition during yoghurt processing and their effects on yoghurt and probiotic bacteria in milk procured from cows fed different diets / R.I. Dave, N.Ramaswamy, R.J. Baer. // , *Aust. J. Dairy Technol.* —2002.—Vol. 57.—P. 197–202.

6. Dietary conjugated linoleic acid modulates phenotype and effector functions of porcine cd8(+) lymphocytes / J. Bassaganya-Riera, R. Hontecillas, D.R. Zimmerman [et al.] // *J Nutr.* — 2001— Vol.131.—P. 2370–2377.

7. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat / K.L.Houseknecht, J.P. Vanden Heuvel, S.Y.Moya-Camarena [et al.] // *Biochem. Biophys.Res.Commun.*—1998.—Vol.244.—P.678—682.

8. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters / R.J.Nicolosi, E.J.Rogers, D.Kritchevsky [et al.] // *Artery.*—1997.—Vol.22.—P.266—277.

9. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating cows / M. L. Kelly, J. R. Berry, D. A. Dwyer [et al.] // *Journal of Nutrition.* — 1998. — Vol. 128. — P. 881—885

10. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately / D. A. Whitlock, D. J. Schingoethe, A. R. Hippen [et al.] // *J. Dairy Sci.* — 2002. — Vol. 85. — P. 234—243.

11. Ha Y. L. Anticarcinogens from fried ground beef heat-altered derivatives of linoleic acid / Y. L. Ha, N. K. Grimm, M. W. Pariza // *Carcinogenesis*. — 1987.— Vol. 8. — P. 1881—1887
12. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of rat mammary gland / C. Ip, M. M. Ip, T. Loftus [et al.] // *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. — 2000. — Vol. 9. — P. 689—696.
13. Jiang J. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures / J. Jiang, L. Bjorck, R. Fonden // *J. Applied Microbiol.* — 1998.—Vol. 85.—P. 95—102.
14. Kepler C.R. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids / C.R. Kepler, S.B. Tove.— *J. Biol. Chem*—1967.— Vol. 242.— P. 5686—5692.
15. Kim Y.K. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid / Y.K. Kim, R.H. Liu, J.K. Rychlik [et al.] // *J Appl Microbiol.*—2002.—Vol. 92.—P. 976—982.
16. Lin T.Y. Conjugated linoleic acid concentrations as affected by lactic cultures and additives / T.Y. Lin // *Food Chem.*—2000.—Vol. 69.—P. 27—31.
17. Lin T.Y. Influence of lactic cultures, linoleic acid and fructo-oligosaccharides on conjugated linoleic acid concentration in non-fat set yogurt / T.Y. Lin // *Aust. J. Dairy Technol.*—2003.—Vol. 58.—P. 11—14.
18. Long-term influence of lipid nutrition on the induction of CD8(+) responses to viral or bacterial antigens / J. Bassaganya-Riera, R. Hontecillas, D.R. Zimmerman [et al.] // *Vaccine*.—2002. — Vol. 20.—P. 1435—1444.
19. Modulation of macrophage cytokine production by conjugated linoleic acids is influenced by the dietary n<sub>6</sub>:n<sub>3</sub> fatty acid ratio / J.J. Turek, Y. Li, I.A. Schoenlein [et al.] // *J Nutr Biochem*. — 1998— Vol. 9.—P. 258—266.
20. Park Y. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA) / Y. Park, M.W. Pariza // *Food Res. Int.*—2007,—Vol. 40.—P. 311—323.
21. Parodi P.W. Conjugated octadecenoic acid of milk fat / P.W. Parodi. // *J. Dairy Sci.*—1977.—Vol. 60.—P. 1550—1553.
22. Rodriguez-Alcala L.M. Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomer composition of commercial CLA-fortified dairy products: evaluation after processing and storage / L.M. Rodriguez-Alcala, J. Fontecha // *J. Dairy Sci.*—2006.—Vol. 90.—P. 2083—2090.
23. Schonberg S. The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives (CLA) on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation / S. Schonberg, H.E. Krokan // *Anticancer Res.* — 1995 — Vol. 15.—P. 1241—1246

**Рецензент:** головний науковий співробітник лабораторії живлення та біосинтезу продукції жуйних, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Вудмаска І. В.