

Rehun rasvahappojen biohydrogenaatio pötsinesteessä *in vitro*

Anne Tuomisto

Kotieläintieteen laitos, PL 28, 00014 Helsingin yliopisto, anne.tuomisto@helsinki.fi

Tiivistelmä

Biohydrogenaatiota tutkitaan, koska pötsissä tapahtuva rehun rasvahappojen biohydrogenaatio vaikuttaa maidon rasvapitoisuuteen ja rasvahappokoostumukseen. Biohydrogenaation seurauksena märehittävän maito ja liha sisältävät runsaasti tyydyttyneitä rasvahappoja sekä jonkin verran *trans*-rasvahappoja.

Pötsissä tapahtuvaa rehun rasvahappojen biohydrogenaatiota on kuitenkin mahdollista säädellä ruokinnallisilla keinoilla niin, että maitoon erittyy konjugoidun linolihapon (CLA) isomeerejä, joiden on todettu ehkäisevän mm. syöpää, sydän- ja verisuonitauteja sekä rasvan kertymistä kudoksiin. Biohydrogenaatiota säätelämällä on mahdollista vaikuttaa myös maidon rasvapitoisuuteen, pötsissä muodostuvien ja maitoon erittyvien *trans*-rasvahappojen määrään sekä metaanin tuotantoon pötsissä.

Biohydrogenaatioissa pötsin mikrobit pelkistävät rehun tyydyttymättömät rasvahapot entsymaattisesti välituotteiden kautta tyydyttyneiksi rasvahapoiksi. Välituotteet sisältävät rasvahappoja, joissa on *trans*-kaksoissidoksia. Myös CLA:t ovat biohydrogenaation välituotteita. Lopputuotteena on yleensä tyydyttynyt rasvahappo. Kaikkia biohydrogenaation välituotteita ja niiden muodostumismekanismeja ei kuitenkaan vielä täysin tunneta. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää panostoiminen *in vitro* –menetelmä, jolla pystytään tutkimaan pötsin rasvahappojen biohydrogenaatiota välivaiheineen. Lisäksi tavoitteena on tutkia linolihapon biohydrogenaatiota neljällä eri annostasolla (1 mg, 2,5 mg, 5 mg ja 10 mg linolihappoa).

Työn tuloksena saatiin rasvahappojen biohydrogenaation kuvaamiseen, välituotteiden tunnistamiseen ja niiden muodostumismekanismien tutkimiseen soveltuva *in vitro* –panosviljelmämenetelmä. Menetelmällä aikaansaadussa optimaalisessa linolihapon biohydrogenaatioprofiilissa linolihappo pelkistyy nopeasti. Välituotteena kertyy CLA:ta, ei-konjugoituja C18:2-rasvahappoja ja C18:1-rasvahappoja, jotka pelkistyvät edelleen steariinihapoksi. Annostason nostaminen hidastaa linolihapon biohydrogenaatiota ja estää lopputuotteena olevan steariinihapon muodostumista. Panostoimista *in vitro* –menetelmää käytettäessä on etsittävä rasvahapon sopiva annostaso.

Menetelmää on mahdollista käyttää myös tutkimuksissa, joissa biohydrogenaatiota halutaan säädellä esimerkiksi estämällä biohydrogenaatiota etenemästä loppuun, jolloin maitoon erittyy CLA:ta tai muuttamalla biohydrogenaatioreittiä siten, että pötsissä muodostuu biohydrogenaation välituotetta, joka esimerkiksi alentaa maidon rasvapitoisuutta. Tuloksia voidaan hyödyntää kehitettäessä eläinten ruokintamenetelmiä, joiden avulla maidon rasvapitoisuutta ja rasvahappokoostumusta pyritään muuttamaan. ihmisravitsemuksen kannalta suotuisammaksi.

Asiasanat: biohydrogenaatio, rasvahappo, panosviljelmä, pötsineste, *in vitro*

Johdanto

Biohydrogenaatiolla tarkoitetaan entsyymaattista aineenvaihduntareittiä, jossa märehitjän pötsin mikrobit muuttavat rehun tyydyttymättömät rasvahapot välivaiheiden kautta tyydyttyneiksi rasvahapoiksi. Esimerkiksi linolihapon biohydrogenaatiossa linolihappo (*cis*-9, *cis*-12 C18:2) muutetaan CLA:n (esim. *cis*-9, *trans*-11 C18:2) kautta C18:1-monoeneiksi (mm. vakseenihapoksi, *trans*-11 C18:1). Nämä pelkistetään edelleen steariinihapoksi (C18:0), joka on tyydyttynyt rasvahappo (Griinari ja Bauman 1999). Kaikkia biohydrogenaation välivaiheita ei vielä täysin tunneta.

Biohydrogenaatiota tutkitaan, koska pötsissä tapahtuva rehun rasvahappojen biohydrogenaatio vaikuttaa maidon ja lihan rasvapitoisuuteen ja rasvahappokoostumukseen. Biohydrogenaation seurauksena märehitjän maito ja liha sisältävät runsaasti tyydyttyneitä rasvahappoja sekä jonkin verran *trans*-rasvahappoja, joiden on todettu lisäävän ihmisten riskiä sairastua sydän- ja verisuonitauteihin. Maidon luonnollista *trans*-rasvapitoisuutta pidetään kuitenkin verrattain alhaisena.

Pötsissä tapahtuvaa rehun rasvahappojen biohydrogenaatiota on kuitenkin mahdollista säädellä ruokinnallisoin keinoin niin, että maitoon erittyy konjugoidun linolihapon (CLA) isomeereja, joiden on todettu ehkäisevän mm. syöpää, sydän- ja verisuonitauteja sekä rasvan kertymistä kudoksiin (Belury ym. 2002). Biohydrogenaatiota säätelemällä on mahdollista vaikuttaa myös maidon rasvapitoisuuteen, pötsissä muodostuvien ja maitoon erittyvien *trans*-rasvahappojen määrään sekä metaanin tuotantoon pötsissä.

Rasvahappojen biohydrogenaatiota pyritään säätelemään niin, että pötsiin kertyy CLA:n esiastetta, vakseenihappoa, jonka maitorauhasen Δ^9 -desatuaasientsyymi muuttaa maitoon erittyväksi CLA:ksi (Griinari ym. 2000). Vakseenihappoa kertyy, kun sen pelkistystä pötsissä estetään esimerkiksi kalaöljyn rasvahapoilla. Kalaöljyn käyttö lehmien ruokinnassa ei kuitenkaan ole kestävä strategia maidon CLA-pitoisuuden tehostamiseksi, ja siksi uusia kalaöljyä korvaavia vakseenihapon pelkistykseen estäjiä tarvitaan. Vaihtoehtoinen strategia maidon CLA-pitoisuuden nostamiseksi perustuu CLA:n pötsipelkistykseen estoon eli CLA:n pötsituoton lisäykseen ilman *trans*-rasvahappojen tuotannon lisäämistä.

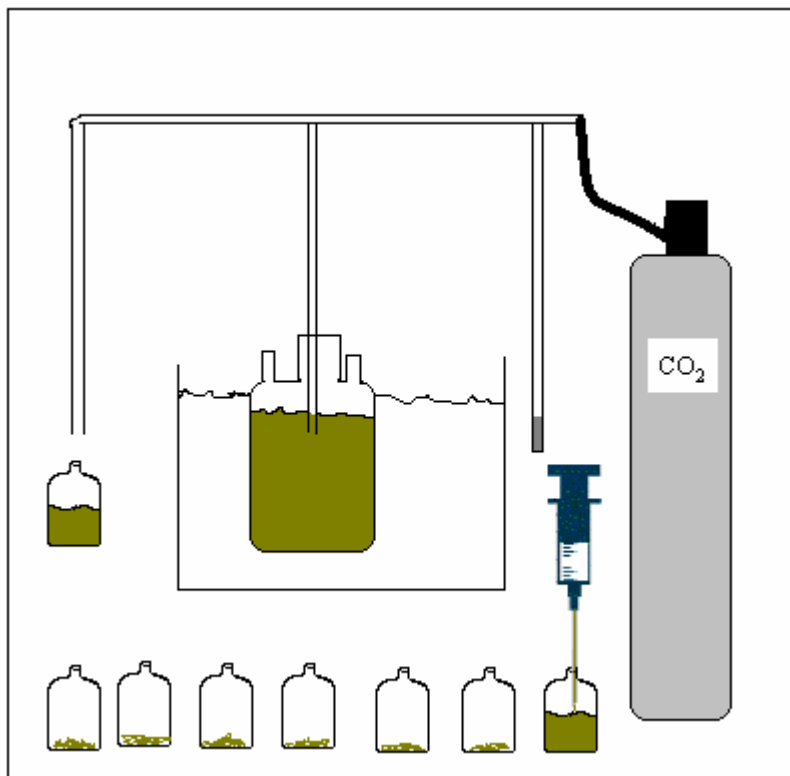
Biohydrogenaation säätelyllä voidaan vaikuttaa myös maidon rasvapitoisuuteen. Voimakas väkirehuruokinta alentaa maidon rasvapitoisuutta. Prosessin taustalla on muutos pötsin biohydrogenaatiossa. Muutosta kuvaa ns. biohydrogenaation *trans*-10 siirtymä, mikä tarkoittaa sitä, että rehun rasvojen biohydrogenaation välituotteena muodostuva vakseenihappo (*trans*-11 C18:1 rasvahappo) korvautuu suurelta osin *trans*-10 C18:1 rasvahapon muodostumisella. *Trans*-10 C18:1 rasvahapon muodostumiseen pötsissä liittyy *trans*-10, *cis*-12 18:2 (10,12 CLA) rasvahapon muodostuminen. Toistaiseksi 10,12 CLA on ainoa tunnettu rasvan synteessin estäjä (Baumgard ym. 2000). Usein 10,12 CLA muodostuu pötsissä niin pieniä määriä, että se ei yksin riitä selittämään maitorasvan alenemistä. Muita maitorasvan synteesiä alentavia biohydrogenaation välituotteita ei ole vielä tunnistettu.

Edellä olevat esimerkit edustavat tutkimusalueita, jotka hyötyvät biohydrogenaation säätelyn parissa tehtävästä tutkimuksesta, jota voidaan tehdä käyttäen *in vitro* -laboratoriomenetelmiä. *In vitro* -menetelmän kehittämistä ja käyttöä biohydrogenaation tutkimiseen puoltavat mittakaavan ja eläinten välisen vaihtelun pienentämiseen liittyvät edut. Laboratoriomittakaavassa tapahtuvan tutkimuksen ansiosta on mahdollista tehdä *in vivo*-ruokintakokeisiin verrattuna moninkertainen määrä potentiaalisesti vaikuttavien aineiden testauksia käyttäen pötsifistelöityjä lemmiä pötsinesteen luovuttajina. *In vitro* -menetelmän käyttö vähentää eläinkokeiden tarvetta ja laboratoriomittakaavassa tapahtuva tutkimus säästää kustannuksia.

Tämän tutkimuksen tavoitteena on kehittää panostoiminen *in vitro* -menetelmä, jolla pystytään tutkimaan biohydrogenaatiotapahtuma välivaiheineen. Tutkimuksessa kuvataan linolihapon biohydrogenaation keskeiset prosessit neljällä eri linolihapon annostasolla.

Aineisto ja menetelmät

Panosviljelmässä erillisiin seerumpulloihin lisätään pötsinestettä, puskuria, heinää ja tutkittavaa rasvahappoa (Kuva 1.). Linoliapon annostasosarjoja on neljä (1 mg, 2,5 mg, 5 mg ja 10 mg linoliappoa). Pulloihin lasketaan hiilidioksidia ja niitä inkuboidaan 39 °C:ssa tasoravistelijassa. Kutakin näytettä inkuboidaan eripituinen aika, jolloin näytteistä muodostuu aikasarja. Näytteistä uutetaan rasvahapot ja ne määritetään kaasukromatografilla. Biohydrogenaatioprofiili esitetään graafisesti rasvahapposubstraatin, väli tuotteiden ja lopputuotteiden pitoisuuksien muutoksina. Tuloksista lasketaan linoliapon suhteellinen pelkistysnopeus alussa (lineaarisen pelkistysvaiheen aikana), väli tuotteiden *trans*-10 C18:1 osuus *trans*-10 ja *trans*-11 C18:1-rasvahapoista sekä lopputuotteiden suhde.



Kuva 1. Pötsinesteen käyttöön perustuva *in vitro* –panosviljelmämenetelmä rasvahappojen biohydrogenaation tutkimiseen. Isossa astiassa on suodatettua pötsinestettä ja puskuria. Pieniin pulloihin annostellaan heinää, pötsinestettä ja puskuria sekä tutkittavaa rasvahappoa ja hiilidioksidia. Pulloja inkuboidaan 39 °C:ssa.

Tulokset ja tulosten tarkastelu

Linoliappo pelkistyi CLA:n ja ei-konjugoitujen *trans* C18:2 –isomeerien (C18:2 t,t) kautta monoeneiksi (C18:1), jotka pelkistyivät kolmella alimmalla tässä kokeessa käytetyllä linoliapon annostasolla (1 mg, 2,5 mg ja 5 mg) edelleen steariinihapoksi (C18:0). Korkeimmalla annostasolla (10 mg) väli tuotteiden pelkistyminen estyi kokonaan, jolloin lopputuotteena syntyvää steariinihappoa ei kertynyt. (Kuva 2.)

Linoliapon annostason nostaminen pienensi linoliapon suhteellista pelkistysnopeutta (mg/h) lisättyä linoliappoa kohti kolmen ensimmäisen tunnin aikana tilastollisesti merkitsevästi (2. asteen vaikutus, $P < 0,01$) (Taulukko 1).

Linoliapon biohydrogenaatiossa syntyvät väli tuotteet olivat pääasiassa C18:1 rasvahappoja. Lisäksi muodostui ei-konjugoituja C18:2 –rasvahappoja ja hieman CLA:ta (Kuva 2). Jokaisella annostasolla muodostui lähes kaikkia C18:1 –rasvahappojen isomeerejä (Taulukko 2.). Matalimmilla annostasoilla pääasiallisia C18:1–isomeerejä olivat *trans*-11 C18:1, *trans*-10 C18:1 ja *trans*-13/14 C18:1 sekä todennäköisinä *in vitro* –artefakteina muodostuneet *cis*-9 C18:1 ja *cis*-12 C18:1. Korkeimmalla annostasolla muodostui lähinnä *trans*-11 C18:1- ja *trans*-10 C18:1 –rasvahappoja sekä *cis*-12 C18:1 –rasvahappoa. Annostason nostaminen lisäsi lineaarisesti ($P < 0,05$) *trans*-10 C18:1 –

rasvahapon prosenttiosuutta *trans*-11- ja *trans*-10 C18:1 –rasvahapoista kolmen tunnin kohdalla (Taulukko 1.).

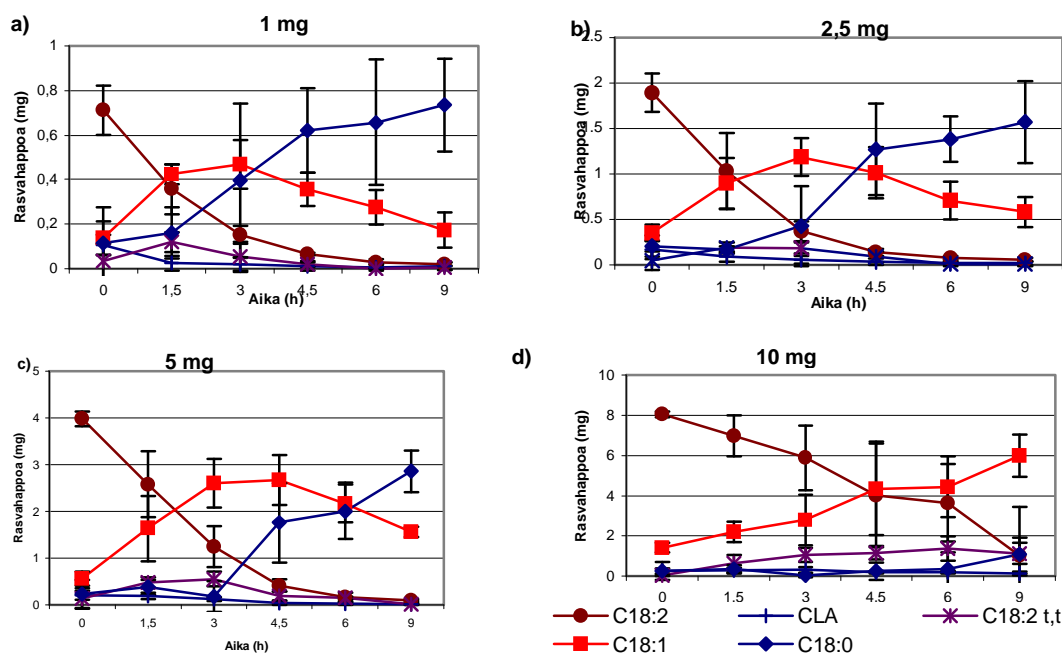
Biohydrogenaation lopputuotteena muodostui matalimmalla annostasolla lähinnä steariinihappoa. Korkeimmalla annostasolla muodostui steariinihapon sijasta C18:1 –rasvahappoja. Kun linolihiapon annostaso nostettiin, lopputuotteiden C18:0-rasvahappojen määrä C18:1-rasvahappoihin nähden väheni lineaarisesti ($P < 0,001$) (Taulukko 1.).

Aikaisemman käsityksen mukaan biohydrogenaatio on esitetty yksinkertaistetusti kuvan 3 mukaisen kaavion avulla (Harfoot & Hazlewood 1997). Tämän *in vitro*-tutkimuksen aineiston perusteella biohydrogenaatiosta on mahdollista esittää kattavampi malli (kuva 4). Pötsinesteessä muodostuu linolihiapon biohydrogenaatioissa CLA:n ja vakseenihapon lisäksi muitakin biohydrogenaation välituotteita, kuten ei-konjugoituja C18:2-rasvahappoja ja useita C18:1-isomeerejä. Jouany ym. (2007) ovat havainneet saman *in vitro* –kokeissaan. Loor ym. (2002) ovat esittäneet ei-konjugoitujen C18:2-rasvahappojen olevan biohydrogenaation välituotteita myös *in vivo* -olosuhteissa. On mahdollista, että biohydrogenaatioissa on ainakin yksi välivaihe, jota ei ole vielä tunnistettu (kuva 4.).

Johtopäätökset

Rasvahapon annostaso vaikuttaa linolihiapon biohydrogenaatioprofiiliin ja muodostuviin välituotteisiin. Linolihiaposta muodostuu ensin nopeasti CLA:ta tai vaihtoehtoisesti ei-konjugoituja dieenejä, jotka pelkistyvät useiksi C18:1 –rasvahapon isomeereiksi ja edelleen steariinihapoksi. Annostason nostaminen hidastaa linolihiapon biohydrogenaatiota ja estää lopputuotteena olevan steariinihapon muodostumista. Sopiva rasvahapon lisäysannos on etsittävä käytettäessä panostointimista *in vitro* –menetelmää.

Tämä panosviljelmämalli toimii kvantitatiivisesti ja sitä voidaan käyttää jatkossa esimerkiksi biohydrogenaation käynnistymisvaiheessa muodostuvien välituotteiden ja ei-konjugoitujen *trans*-C18:2 ja *trans* -C18:3 välituotteiden tunnistamiseen. Panosviljelmää voidaan käyttää myös biohydrogenaation säätelijöiden tunnistamiseen. Tuloksia voidaan hyödyntää kehitettäessä eläinten ruokintamenetelmiä, joiden avulla maidon rasvapitoisuutta ja rasvahappokoostumusta pyritään muuttamaan ihmisravitsemuksen kannalta suotuisammaksi.



Kuva 2. Linolihiapon biohydrogenaatioprofiilien keskiarvot ja keskihajonnat eri annostasoilla. a) 1 mg linolihiappoa, b) 2,5 mg linolihiappoa, c) 5 mg linolihiappoa ja d) 10 mg linolihiappoa. Linolihiappo (C18:2), konjugoitunut linolihiappo (CLA), ei-konjugoitunut C18:2 –isomeerit (C18:2 t,t), C18:1 monoeneit (C18:1) ja steariinihiappo (C18:0).

Taulukko 1. Linolihapon annostason vaikutus linolihapon suhteelliseen pelkistysnopeuteen, välituotteiden *trans*-10 C18:1 osuuteen *trans*-10 ja *trans*-11 C18:1-rasvahapoista (3 h inkubaatio) ja lopputuotteiden C18:0/C18:1 –suhteeseen (9 h inkubaatio).

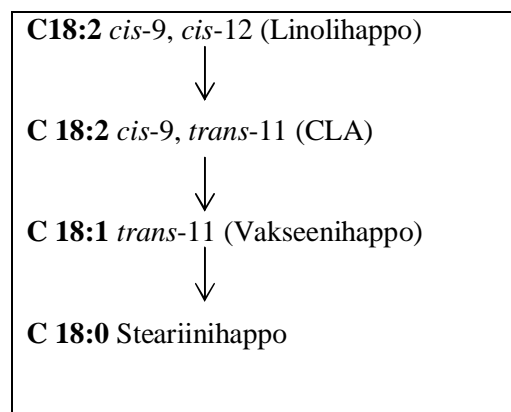
	Linolihapon annostasot, mg				SEM	P - arvo		
	1	2,5	5	10		L	Q	S
Linolihapon pelkistysnopeus, (mg/h)/mg LA	0,19	0,20	0,18	0,07	0,016	***	**	
Välituotteiden t-10 osuus (t-10+t-11):sta, %	69,7	57,6	65,1	83,5	5,42	*	°	
Lopputuotteiden suhde (C18:0 / C18:1)	3.34	2.74	1.85	0.24	0,203	***		

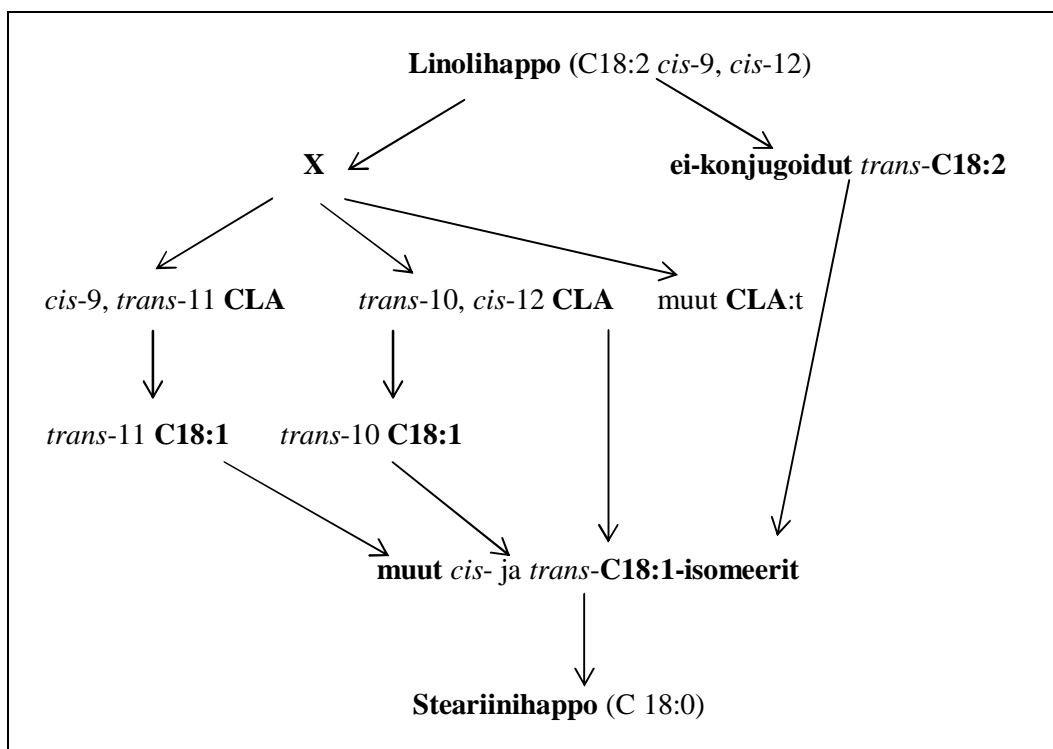
Tilastollinen merkitsevyys: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, ° 0,05 < P < 0,10 ja tyhjä ei merkitsevyyttä. L, Q ja S viittaavat lineaariseen, 2. ja 3. asteen vaikutuksiin.

Taulukko 2. Linolihapon biohydrogenaatiossa muodostuneet C18:1 –rasvahappojen isomeerit (% kokonais-C18:1-rasvahapoista) neljällä eri linolihapon annostasolla, C18:1-rasvahappojen huipun kohdalla (1 mg, 2,5 mg ja 5 mg LA 3 h ja 10 mg LA 9 h).

	Linolihapon annostaso, mg				SEM	P- arvo		
	1	2,5	5	10		L	Q	S
t- 6/7/8	4,3	4,6	4,3	3,7	0,717			
t -9	2,5	3,2	3,2	3,1	0,708			
t-10	9,8	12,0	17,9	13,8	1,374		**	
t-11	5,9	8,5	9,3	28,4	2,725	***	°	
t-12	4,6	4,5	3,2	4,5	0,602			
t-13/14	13,9	10,5	5,7	8,3	0,959	**	***	
c-9	7,7	9,9	13,1	9,3	1,663		*	
t-15	5,5	3,9	1,9	2,6	0,408	***	***	
c-11	3,3	2,0	1,6	1,1	0,654	°		
c-12	38,9	38,9	39,1	23,8	4,616	*		
t-16	3,6	1,9	0,8	1,5	0,733		*	

Tilastollinen merkitsevyys: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, ° 0,05 < P < 0,10 ja tyhjä ei merkitsevyyttä. L, Q ja S viittaavat lineaariseen, 2. ja 3. asteen vaikutuksiin.

**Kuva 3.** Yksinkertaistetusti esitetty linolihapon biohydrogenaatioreitti (Harfoot & Hazlewood 1997).



Kuva 4. Mahdollisia muita linolihapon biohydrogenaatioreittejä. X on mahdollinen vielä tunnistamaton biohydrogenaation välituote.

Kirjallisuus

- Baumgard L. H., Corl, B.A., Dwyer D.A., Saebø A. & Bauman D.E.** 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomers that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol.* 278:R179-R184.
- Belury, M.A.** 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual Reviews of Nutrition* 22: 505-531.
- Griinari, J. M & Bauman, D. E.** 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Yurawecz, M. P., Mossoba, M. M., Kramer, J. K. G., Pariza, M. W. & Nelson, G. J. (eds.), In *Advances in conjugated linoleic acid research*, Volume 1, AOCS Press, Campaign, Illinois. p. 180-200.
- Griinari, J. M, Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela K. V. V. & Bauman D. E.** 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *Journal of Nutrition* 130: 2285-2291.
- Harfoot, C. G., & Hazlewood, G. P.** 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N., & Stewart, C.S. (Eds.), *The rumen microbial ecosystem*, second edition, pp. 382-426. London, UK:Blackie Academic & Professional.
- Jouany J.P. Lassalas, B., Doreau, M. & Glasser, F.** 2007. Dynamic Features of the Rumen Metabolism of Linoleic Acid, Linolenic Acid and Linseed Oil Measured in Vitro. *Lipids* 42:351-360.
- Loor J. J., Bandara A. B. P. A. & Herbein H. J.** 2002. Characterization of 18:1 and 18:2 isomers produced during microbial biohydrogenation of unsaturated fatty acids from canola and soya bean oil in the rumen of lactating cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 86: 422-432.