تولید اسید لینولئیک مزدوج از روغن کرچک توسط پروبیوتیک *L. plantarum ATCC 8014*

الهه سادات حسینی[۱]، روحا کسری[۱] کرمانشاهی[۲]،
سامان حسینخانی[۳]، سیدعباس شجاع الساداتی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۱
تاریخ تصویب: ۹۱/۳/۲۰

چکیده

باکتری L. Plantarum ATCC 8014 که یک پروبیوتیک است، توانایی تولید ایزومرهای cis-9, trans-11-18:2 (CLA1) و trans-10, cis-12- (CLA2) 18:2 را از روغن کرچک حاوی ٪۸۹اسید ریسینولئیک دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن اسید لینولئیک به محیط پیش‌کشت، سبب افزایش بیان آنزیم لینولئات ایزومراز، و در نتیجه، افزایش میزان تولید CLA1 و CLA2 شده است. همچنین مدت‌زمان گرماگذاری و غلظت روغن کرچک در نسبت ایزومرهای CLA1 و CLA2 تولیدشده تأثیر بسزایی داشته است. با در نظر گرفتن این نکات، از مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۰/۱M با pH ۶/۵، روغن کرچک ۸ mg/ml و توئین ۸۰ (۰/۱ ٪)، آنزیم لیپاز L-175 سیگما ۱۰۰U/ml به همراه توده‌ی سلولی مرطوب ۱۲ ٪، در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷ °C، به مدت ۷۲ ساعت، میزان ۰/۴۲۶ mg/ml از CLA1 و ۰/۳۷۱ mg/ml از CLA2 تولید شده است.

۱. دانشگاه الزهرا، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست‌شناسی godess_eh@yahoo.com

این مقاله بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد خانم الهه‌سادات حسینی است که به راهنمایی دکتر روحا کسری کرمانشاهی در دانشگاه الزهرا انجام شده است.

۲. دانشگاه الزهرا، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست‌شناسی
۳. دانشگاه تربیت‌مدرس، دانشکده‌ی علوم زیستی، گروه بیوشیمی
۴. دانشگاه تربیت‌مدرس، دانشکده‌ی فنی-مهندسی، گروه مهندسی شیمی

کلیدواژه‌ها: *اسید لینولئیک مزدوج (conjugated linoleic acid (CLA))، cis-9, trans-11-18:2, trans-10, cis-12-18:2، روغن کرچک، L.plantarum ATCC 8014*

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به میزان و حجم کافی به کار روند، برای حفظ سلامت میزبان بسیار مفیدند (FAO/WHO Expert report., 2001). همچنین از محصولات تولیدشده با آن‌ها برای تکمیل و افزایش مواد مفید غذایی در محصولات مختلف استفاده می‌کنند (Wall et al., 2008). اسید لینولئیک مزدوج Conjugated linoleic acid (CLA) ایزومر فضایی و هندسی اسید لینولئیک (۱۸:۲) است که به علت داشتن خواص منحصر به فرد، در دو دهه‌ی اخیر بسیار به آن توجه شده است (Lin., 2000). CLA به طور طبیعی در چربی شیر و فراورده‌های لبنی یافت می‌شود و متعلق به خانواده‌ی اسیدهای چرب امگا-۶ است (Kimoto et al., 2001). بر خلاف اسیدهای چرب ترانس که مضرات بسیاری برای انسان دارند و منجر به حملات قلبی و سرطان می‌گردند، CLA که یکی از اعضای خانواده اسیدهای چرب مزدوج (Conjugated fatty acids) است، عوارض ناشی از سایر اسیدهای چرب ترانس را بهبود می‌بخشد (Nagao & Yanagita, 200). محققان دریافته‌اند که حضور ایزومرهای (cis-9, trans-11-18:2) و (trans-10, cis-12-18:2)، به ترتیب CLA1 و CLA2 در رژیم غذایی سبب کاهش ابتلا به سرطان و آترواسکلروزیس، کاهش کلسترول و کاهش چربی‌های اضافی بدن می‌گردد و سطح ایمنی بدن انسان را ارتقا می‌دهد (Wall et al., 2008). اکنون CLA تجاری موجود حاصل از ایزومریزاسیون قلیایی اسید لینولئیک است.

از آنجا که این محصول مخلوطی از ایزومرهای فضایی (۸،۱۰- و ۱۱،۹- و ۱۲،۱۰- و ۱۳،۱۱-) و هندسی سیس و ترانس CLA است و تأثیر تمامی این ایزومرها بر بدن انسان شناخته شده نیست، جایگزین کردن روش‌های زیستی‌ای که سبب تولید ایزومرهای مؤثر و خالص در سلامتی انسان می‌گردند، ضروری خواهد بود. یکی از این روش‌ها استفاده از میکروارگانیسم‌هایی است که قابلیت تولید CLA دارند (Hass et al., 1999; Mounts et al., 1970). برای مثال، تولید CLA در جنس‌هایی از گروه باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و با استفاده از آنزیم لینولئات ایزومراز در حضور یک منبع اسید لینولئیک رخ می‌دهد (Ewaschuk et al., 2006). همچنین ایزومر cis-9, trans-11-18:2 اولین ترکیب حد واسط در مسیر زیستی هیدروژناسیون اسید لینولئیک توسط باکتری‌های بی‌هوازی شکمبه‌ی نشخوارکنندگان *Butyrivibrio fibrisolvents* است (Wallace et al., 2007) و

نیز تولید ایزومر trans-10, cis-12-18:2 توسط *Propionibacterium freudenreichii* به منزله‌ی آغازگر محصولات لبنی از اسید لینولئیک گزارش شده است (Wang et al., 2007). Ogawa و همکاران دریافتند که مسیر تولید CLA از اسید لینولئیک توسط باکتری‌های *Lactobacillus acidophilus* و *L.plantarum* تک‌مرحله‌ای نیست، بلکه ۱۰-هیدروکسی -۱۲- اکتادکائنوئیک اسید (HY) ترکیب حد واسط این مسیر است. به همین دلیل، تولید CLA می‌تواند از منابع تأمین‌کننده‌ی هیدروکسی - اسیدهای چرب، مانند روغن کرچک صورت گیرد. روغن کرچک پیش‌ماده‌ی مقرون به صرفه‌ی تولید CLA است که حدود ۸۸٪ کل محتوای آن (Ricinoleic (RA acid(۱۲- هیدروکسی- سیس-۹- اکتادکائنوئیک اسید) است. از آنجا که باکتری‌های مولد اسید لاکتیک توانایی تولید CLA از اسید ریسینولئیک به فرم تری گلیسرید (روغن کرچک) را ندارند ، اسید ریسینولئیک باید به فرم آزاد تبدیل شود (Kishino et al., 2002). مطالعات بسیار زیادی در زمینه‌ی اثرهای ایزومرهای CLA بر بدن انسان صورت گرفته است، با این همه کمبودهایی در زمینه‌ی شرایط بهینه‌ی تولید ایزومرهای CLA، وجود دارد (Wall et al., 2008). در این مطالعه به بررسی تولید ایزومرهای CLA از روغن کرچک توسط پروبیوتیک *L. plantarum ATCC 8014* و تأثیر عوامل مختلف در میزان تولید این ایزومرها پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و میکروارگانیسم‌ها

نمونه‌ی استاندارد CLA methyl esters، آنزیم لیپاز No. L-1754 و اسید لینولئیک (LA) از شرکت سیگما (St. Louis,MO) و محیط کشت MRS broth از شرکت مرک آلمان خریداری شد. روغن کرچک (اسید ریسینولئیک ۸۹٪) از شرکت فدک ایران تهیه شد.

L. plantarum ATCC 8014 از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد و در ۱۰ ml محیط کشت MRS broth، به مدت ۴۸ ساعت، در شرایط میکروآئروفیل (درون جار بی‌هوازی) درون انکوباتور ۳۷°C گرماگذاری شد.

آماده‌سازی سلول‌های شسته‌شده و مخلوط واکنش

به منظور دستیابی به توده‌ی سلولی در حال استراحت، به ۱۰۰ml محیط کشت MRS broth مخلوطی از اسید لینولئیک با غلظت نهایی (w/v ۰/۰۶ ٪) و توئین ۸۰ (w/v ۱٪) اضافه شد. سپس از پیش‌کشت تازه سویه *L. plantarum ATCC 8014* (v/v ۱٪) به این محیط تلقیح شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت (به منظور رسیدن سلول‌ها به انتهای فاز لگاریتمی و تولید آنزیم لینولئات ایزومراز) گرماگذاری شد. سپس توده‌ی سلولی به‌وسیله‌ی سانتریفیوژ (g× ۱۲۰۰۰، ۱۰ دقیقه) جمع‌آوری شد و دو مرتبه با سرم فیزیولوژی (۰/۸۵٪) شست‌وشو شد. سپس، از آن به عنوان توده‌ی سلولی در حال استراحت (انتهای فاز

لگاریتمی) استفاده شد. مخلوط واکنش، شامل ۱ ml بافر فسفات پتاسیم (۶/۵ pH، ۰/۱M)، روغن کرچک با غلظت نهایی ۴ mg/ml مخلوط‌شده با توئین ۸۰ (۰/۱٪)، آنزیم لیپاز ۱۰۰U/ml و توده‌ی سلولی مرطوب ۱۲٪ بوده است. این واکنش در لوله‌ی آزمایش (۱۲۵mm×۱۶/۵mm) تحت شرایط میکروآئروبیک، در دمای ۳۷°C و دور آرام شیکر (۱۲۰rpm) به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. به منظور تعیین نقش پارامترهای مختلف در میزان تولید هر یک از ایزومرها، واکنش فوق با تغییر فاکتور مورد نظر بررسی شد (Ando et al., 2004).

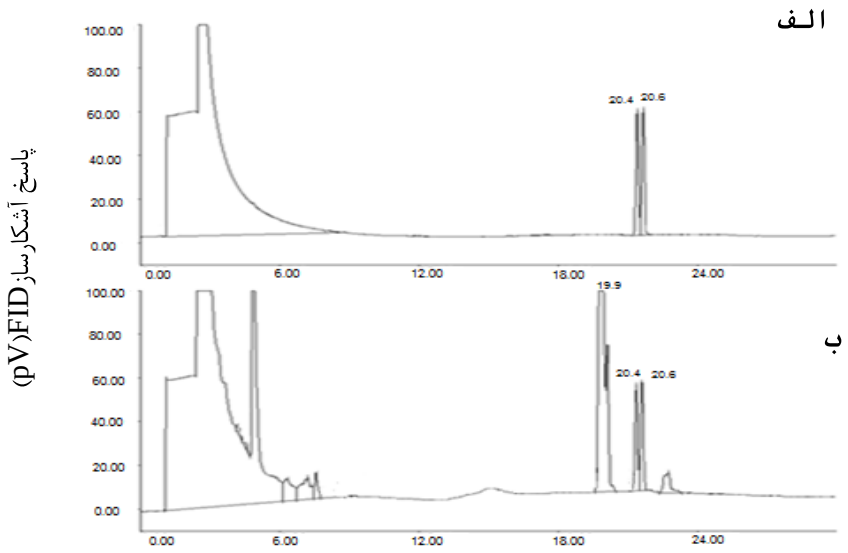
آنالیزهای شیمیایی برای استخراج و جداسازی CLA

مطابق روش Bligh و Dyer استخراج اسیدهای چرب از ۱ ml مخلوط واکنش انجام شد. به ازای هر ۱ml از نمونه، مخلوط متانول و کلروفرم ۳/۷۵ ml (۱:۲) اضافه و به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد. سپس مجدداً از کلروفرم ۱/۲۵ml اضافه و به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد. در نهایت، ۵ دقیقه در دمای اتاق برای رسیدن به دو فاز سانتریفیوژ (۱۰۰۰rpm) انجام شد. مخلوط سانتریفیوژشده سه لایه تشکیل داد که لایه‌ی رویی (آبی)، لایه‌ی میانی (توده‌ی سلولی) و لایه‌ی زیرین (آلی) بود.

لایه‌ی زیرین پس از افزودن سولفات سدیم ۰/۳g به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد. در این مرحله ، لایه‌ی رویی حذف و لایه‌ی میانی با عمل دکانته کردن از سولفات سدیم جدا و با تبخیرکننده‌ی دورانی تغلیظ شد. سپس به منظور تهیه‌ی متیل استر اسید چرب، محلول NaOH(۱N) در متانول ۱ml، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰°C و خنک شدن در دمای محیط، محلول ۴٪ اسید کلریدریک در متانول ۶ ml به محلول فوق اضافه شد و ۲۰ دقیقه در حمام آب ۶۰°C قرار گرفت تا عملیات صابونی شدن و متیله‌شدن اسیدهای چرب انجام شود (روحی و همکاران. ۱۳۸۶). سپس با افزودن هگزان نرمال ۲ml و ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (۴۰۰۰rpm)، متیل استر از لایه آبی وارد فاز آلی گردید. یک میکرولیتر از لایه‌ی آلی به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شد (ستون کاپیلاری BP10، طول و قطر ستون ۲۵ متر و ۰/۲۲mm و ضخامت فیلم ۰/۲۵mm، دمای ابتدایی ستون ۱۵۰ °C و مدت زمان ۱ دقیقه، دمای تزریق ۲۵۰°C، دمای نهایی ستون ۲۳۰°C و مدت زمان ۱۰ دقیقه، شیب دمایی ۵°C در دقیقه) (روحی و همکاران، ۱۳۸۶). تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شد و برای بررسی آماری نتایج از نرم‌فزار SPSS16.0 استفاده شد.

نتایج و بحث

نتیجه‌ی تولید CLA از روغن کرچک توسط باکتری *L. plantarum ATCC 8014* تیمارشده با اسید لینولئیک تحت شرایط مذکور در قسمت مواد و روش ها، در شکل شماره‌ی (۱) نشان داده شده است.

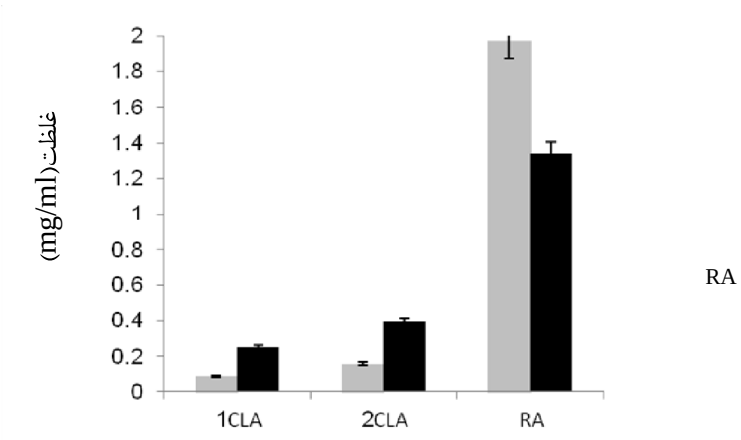


شکل شماره‌ی ۱. کروماتوگرام نمونه‌ی CLA حاصل از فعالیت آنزیم لینولئات ایزومراز باکتری *L. plantarum ATCC 8014*، زمان ماند ۱۹/۹ (RA)، ۲۰/۴ (CLA1)،۲۰/۶ (CLA2). شکل ۱- الف: نمونه استاندارد CLA methyl ester تهیه‌شده از شرکت سیگما (شاهد)، شکل ۱- ب: ایزومرهای CLA تولیدشده در مخلوط بافر فسفات پتاسیم (۰/۱M با pH ۶/۵)، روغن کرچک ۴mg/ml، لیپاز U/ml ۱۰۰، توده‌ی سلولی مرطوب ۱۲٪، طی ۷۲ ساعت و دمای ۳۷°C، تحت شرایط بی‌هوازی. CLA1: cis-9, trans-11-18:2، RA: ricinoleic acid ،CLA2: trans-10, cis-12-18:2

Ando و همکاران تولید CLA از روغن کرچک توسط باکتری *L. plantarum JCM 1551* را بررسی کرده‌اند. این سویه توانایی تولید ایزومرهای cis-9, trans-11-18:2 و trans-9, trans-11-18:2 را در شرایط مشابه با سویه‌ی بررسی‌شده در این مطالعه داشته است. با مقایسه‌ی این دو سویه می‌توان نتیجه گرفت سویه‌های مختلف یک گونه در شرایط مشابه، توانایی تولید ایزومرهای متفاوت را دارند.

تأثیر تیمار توده‌ی سلولی با اسید لینولئیک در میزان CLA تولیدشده

با توجه به اینکه اسید لینولئیک اثر بازدارندگی در رشد باکتری ها دارد، استفاده از توده‌ی سلولی در حال استراحت ضروری است (Byeon et al., 2009). همان‌طور که در شکل شماره‌ی (۲) مشخص شده است، آزمایش‌ها نشان داد که توده‌ی سلولی تیمارشده با اسید لینولئیک توانایی تولید ایزومرهای CLA1 و CLA2 بیشتری داشته است. همچنین پیش‌تیمار اولیه‌ی سلول‌های باکتری *L. plantarum ATCC 8014* با اسید لینولئیک به میزان ۰/۰۶ ٪، سبب افزایش بیان آنزیم لینولئات ایزومراز می‌گردد و با افزایش این آنزیم غلظت CLA1 به ۰/۲۴۸ mg/ml و غلظت CLA2 به ۰/۳۹۶mg/ml رسید.

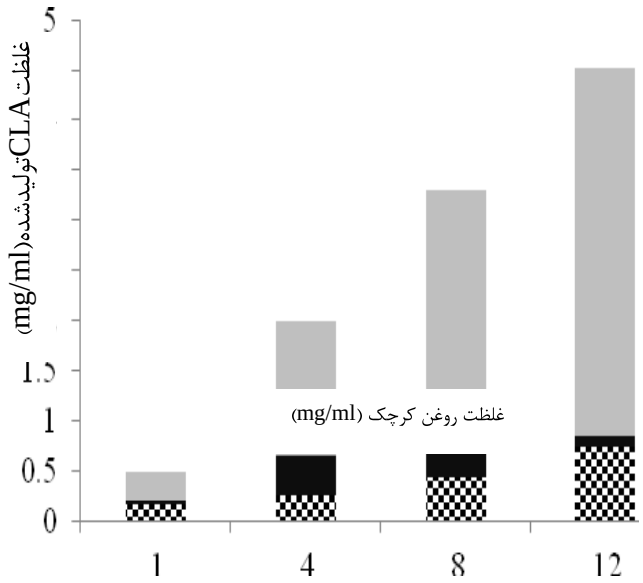


شکل شماره‌ی ۲. مقایسه‌ی میزان ایزومرهای تولیدشده CLA2 و CLA1 توسط *L. plantarum* 014 تیمارشده با اسید لینولئیک (v/v) ۰/۰۶٪ (سیاه) و بدون تیمار اولیه (خاکستری) در مخلوط بافر فسفات پتاسیم (۰/۱M با pH ۶/۵)، روغن کرچک ۴mg/ml، لیپاز ۱۰۰ U/ml، توده‌ی سلولی مرطوب (w/v) ۱۲٪، طی ۷۲ ساعت و دمای ۳۷°C،تحت شرایط بی‌هوازی. CLA1: cis-9, trans-11-18:2، CLA2: trans-10, cis-12-18:2، RA: ricinoleic acid

تأثیر غلظت روغن کرچک در میزان CLA تولیدشده

همان‌طور که در شکل شماره‌ی (۳) مشاهده می‌شود، میزان CLA کل تولیدشده (مجموع CLA1 و CLA2) با افزایش غلظت روغن کرچک از ۱mg/ml به ۴mg/ml افزایش نسبتاً زیادی داشته است، اما با ازدیاد بیشتر غلظت روغن کرچک از ۴ mg/ml به بالا، چندان تغییری در کل میزان CLA تولیدشده مشاهده نشد. Ando و همکاران در مطالعه‌ای که در زمینه‌ی تولید CLA از روغن کرچک توسط *L. plantarum JCM 1551* داشتند، دریافتند که تغییر در شرایط واکنش، در سهم تولید هر یک از ایزومرهای CLA تأثیرگذار است. در غلظت‌های پایین روغن کرچک، میزان تولید ایزومر trans-9,trans-11-18:2 از ایزومر cis-9, trans-11-18:2 (CLA1) بیشتر بوده است.

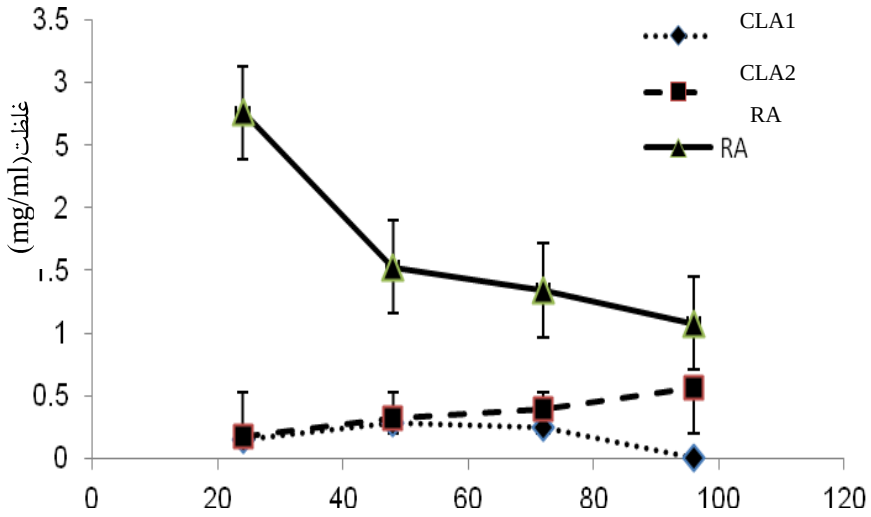
نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که در غلظت‌های ۱۲و۱ mg/ml از روغن کرچک نسبت ایزومرهای CLA1 و CLA2 یکسان نیست؛ به ترتیب، (۵:۱) و (۷:۱) بود. درحالی‌که در غلظت‌های ۸ mg/ml و ۴ از روغن کرچک، نسبت میان ایزومرهای CLA1 و CLA2 تولیدشده حدوداً (۱:۱) است. ایزومر trans-10, cis-12-18:2 (CLA2) به تنهایی اثرهای جانبی منفی بر بدن مصرف‌کننده دارد، اما تحقیقات نشان داده است زمانی که با ایزومر cis-9, trans-11-18:2 (CLA1) همراه می‌شود، اثرهای منفی آن کاملاً خنثی می‌گردد (Tricon et al., 2004). نتایج این پژوهش نشان داد که سویه‌ی *L. plantarum ATCC 8014* از نادرترین سویه‌هایی است که توانایی تولید این دو ایزومر را هم‌زمان تحت شرایط ذکرشده دارد.



شکل شماره‌ی ۳. تأثیر غلظت روغن کرچک در میزان CLA1 (شطرنجی) و CLA2 (مشکی) تولیدشده و RA (خاکستری) مصرف‌شده، در مخلوط بافر فسفات پتاسیم (۰/۱M با pH ۶/۵)، لیپاز ۱۰۰ U/ml، توده‌ی سلولی مرطوب (w/v)۱۲٪، طی ۷۲ ساعت و دمای ۳۷°C، تحت شرایط بی‌هوازی. CLA1: cis-9, trans-11-18:2، CLA2: trans-10, cis-12-18:2، RA: ricinoleic acid

تأثیر زمان در میزان تولید CLA

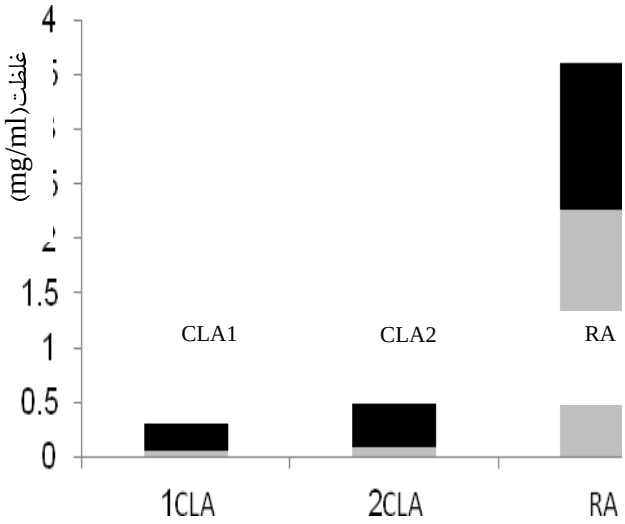
با توجه به شکل شماره‌ی (۴) میزان CLA کل تولیدشده در ۷۲ ساعت به بیشترین میزان می‌رسد، و بعد از آن، غلظت CLA رو به کاهش می‌گذارد، درحالی‌که بررسی جزء به جزء ایزومرها نشان داد که غلظت CLA1، با گذشت زمان، افزایش می‌یابد، در ۷۲ ساعت به حداکثر غلظت می‌رسد و پس از ۹۶ ساعت به صفر می‌رسد، اما CLA2 با گذشت زمان روند افزایشی را در غلظت خود نشان می‌دهد. با توجه به اینکه آنزیم لینولئات ایزومراز توانایی تبدیل ایزومرها به یکدیگر را دارد، به نظر می‌رسد بعد از گذشت ۷۲ ساعت از زمان واکنش، CLA1 به CLA2 تحت فعالیت آنزیم ایزومراز تبدیل شده است. Ando و همکاران با مطالعه‌ی تأثیر زمان در میزان کل CLA تولیدشده از روغن کرچک (۵ mg/ml) تحت تیمار با لیپاز M آمانو(U/ml ۱۰۰) و توده‌ی سلولی مرطوب (۱۲٪) توسط باکتری *L. plantarum JCM 1551* دریافتند، ۹۹ ساعت گرماگذاری منجر به بیشترین میزان تولید CLA (۲.۷ mg/ml) می‌شود. همچنین به اهمیت تأثیر نوع لیپاز در میزان تجزیه روغن کرچک، و در نتیجه، میزان ایزومرهای تولیدشده پرداخته‌اند.



شکل شماره‌ی ۴. تأثیر زمان در غلظت CLA1 و CLA2 تولیدشده و RA مصرف‌شده در مخلوط بافر فسفات پتاسیم (۰/۱M با pH ۶/۵) ، روغن کرچک ۴mg/ml ، لیپاز U/ml ۱۰۰، توده‌ی سلولی مرطوب (w/v)۱۲٪، دمای ۳۷°C،تحت شرایط بی‌هوازی. CLA1: cis-9, trans-11-18:2، CLA2: trans-10, cis-12-18:2، RA: ricinoleic acid

سنجش تأثیر اکسیژن در فعالیت آنزیم لینولئات ایزومراز از طریق میزان ایزومرهای CLA تولیدشده

به منظور تأمین شرایط بی‌هوازی واکنش، از جار بی‌هوازی و گازپک نوع A استفاده شد و به منظور هوادهی واکنش، دور شیکر از ۱۲۰ rpm به ۱۸۰ rpm تغییر داده شد و از جار بی‌هوازی استفاده نشد. همان‌طور که در شکل شماره‌ی (۵) مشاهده می‌شود، اکسیژن در فعالیت آنزیم لینولئات ایزومراز اثر بازدارندگی دارد، یعنی میزان ایزومرهای CLA1 و CLA2 کاهش یافته است. نتایج اثر مهاری اکسیژن در فعالیت آنزیم لینولئات ایزومراز باکتری *L. plantarum JCM 1551*، که توسط Ando و همکاران صورت انجام شده بود، در شرایط مشابه با مطالعه‌ی ما، مؤید این مطلب است که فعالیت آنزیم لینولئات ایزومراز در حضور اکسیژن کاهش می‌یابد. حضور اکسیژن ممکن است سبب تحریک راه‌اندازی متابولیسم اکسیداتیو، مانند مسیر β-اکسیداسیون شود و در نتیجه، CLA کمتری تولید گردد (Ogawa et al., 2001). Kishino و همکاران با بررسی تولید CLA از اسید لینولئیک توسط *L. plantarum AKU 1009a* دریافتند که اکسیژن چندان تأثیری در فعالیت آنزیم لینولئات ایزومراز نداشته است و دلیل آن را ناتوانایی این سویه در تجزیه‌ی اکسیداتیو اسید لینولئیک ذکر کرده‌اند.



شکل شماره‌ی ۵. تأثیر اکسیژن در میزان تولید ایزومرهای CLA1 و CLA2 در حضور اکسیژن (خاکستری) و عدم حضور اکسیژن (مشکی) در مخلوط بافر فسفات پتاسیم (۰/۱M با pH ۶/۵) ، روغن کرچک ۴mg/ml ، لیپاز ۱۰۰ U/ml، توده‌ی سلولی مرطوب ۱۲٪ ، طی ۷۲ ساعت و دمای ۳۷°C. CLA1: cis-9, trans-11-18:2 ،CLA2: trans-10, cis-12-18:2 RA: ricinoleic acid

از آنجا که اثر بازدارندگی CLA بسیار کمتر از اسید لینولئیک یا اسید ریسینولئیک در باکتری‌های گرم مثبت است، می‌توان هدف از تولید CLA توسط میکروارگانیسم‌ها را به کاهش سمیت اسیدهای چرب بلند زنجیره‌ی غیراشباع بر باکتری‌ها نسبت داد (Rainio et al. 2001). از این رو، در این مطالعه از سلول‌های در حال استراحت، در واقع، به‌منزله‌ی کاتالیست استفاده شد. با توجه به نتایج حاصل، غلظت روغن کرچک در نقش پیش‌ماده و زمان گرماگذاری بر تغییر غلظت و نسبت ایزومرهای CLA1 و CLA2 تولیدشده بسیار تأثیرگذار بوده است.

فهرست منابع

روحی، پ. نیکپور، ه. واشقانی فراهانی و ا. خسروی دارانی، ک. (۱۳۸۶). «علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران». شماره‌ی ۴، ۴۹-۵۷.

روحی، پ. نیکپور، ه. واشقانی فراهانی، ا. خسروی دارانی، ک. (۱۳۸۶). متغیرهای موثر بر فرایند تولید اسید لینولئیک مزدوج در ماست پروبیوتیک با استفاده از طراحی تاگوچی. علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. ۴: ۴۹-۵۷.

Ando, A. Ogawa, J. Kishino, S. Shimizu, S; (2004) Conjugated linoleic acid production from castor oil by *Lactobacillus plantarum JCM 1551*. Enzyme Microb Tech 35: 40-45.

Byeon, J. Song, H. Kim, Y. Choi, B. Kim, H. Kim, J. Shim, K; (2009) Growth Inhibition of Food borne and Pathogenic Bacteria by Conjugated Linoleic Acid. Agric Food Chem 57: 3164-3172.

Ewaschuk, J. Walker, J. Diaz, H.L. Madse, K; (2006) Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. Nutrition 136: 1483-1487.

Hass, M.H. Kramer, J.K.G. McNeill, G. Scott, K. Foglia, TA. Sehat, N; (1999) Lipase-catalyzed fractionation of conjugated linoleic acid isomers. Lipids 34: 979-987.

Kimoto, N. Hirose, M. Futakuchi, M. Iwata, T. Kasai, M. Shirai, T; (2001) Site-dependent modulating effects of conjugated fatty acids from safflower oil in a rat two-stage carcinogenesis model in female Sprague-Dawley rats. Cancer Lett 168: 15-21.

Kishino, S. Ogawa, J. Ando, A. Omura, Y. Shimizu, S; (2002) Ricinoleic acid and castor oil as substrates for conjugated linoleic acid production by washed cells of *Lactobacillus plantarum.* Biosci Biotechnol Biochem 66: 2283-2286.

Lin, T.Y; (2000) Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. Food Chem 69: 27-31.

Mounts, T.L. Dutton, H.J. Glover, D; (1970) Conjugation of polyunsaturated acids. Lipids 5: 997-1005.

Nagao, K. Yanagita, T; (2005) Conjugated fatty acids in food and their health benefits. Biosci Bioeng 100: 152-157.

Ogawa, J. Matsumura, K. Kishino, S. Omura, Y. Shimizu, S; (2001) Conjugated Linoleic Acid Accumulation via 10-Hydroxy- 12-Octadecaenoic Acid during Microaerobic Transformation of Linoleic Acid by *Lactobacillus acidophilus*. Appl Environ Microbiol 67: 1246-1252.

Rainio, A. Vahvaselka, M. Suomalainen, T. Laakso S; (2001) Reduction of linoleic acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii.* Can J Microbiol 47: 735-740.

Tricon, S. Burdge, G. Kew, S; Opposing effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. (2004) Am J Clin Nutr 80: 614-620.

Wall, R. Ross, P. Fitzgerald, G. Stanton, C; (2008) Microbial conjugated linoleic acid production – a novel probiotic trait? Food Sci Technol 4: 87-97.

Wallace, R. McKain, N. Shingfield, K. Devillard, E; (2007) Isomers of

conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. Lipid Res 48: 2247-2254.

Wang, L. Lv, J. Chu, Z. Cui, Y. Ren, X; (2007) Conjugated linoleic acid induces apoptosis through estrogen receptor alpha in human breast tissue.Food Chem 103: 313-318.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.