อิทธิพลของพีเอชต่อความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* NB324 ในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก

Influence of pH on the Ability of *Lactobacillus plantarum* NB324 to Produce Conjugated Linoleic Acid

พรกนก คีรีวัลย์[1] เทพปัญญา เจริญรัตน์[1] กอบกุล เหล่าเท้ง[2] และ นิติ พานิชเกษม[1]*

Pornkanok Keereewan[1], Theppanya Charoenrat[1], Kobkul Laoteng[2] and Niti Panichkasame[1]*

[1]*ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต*

[2]*หน่วยวิจัยเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ*

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

[1]*Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University (Rangsit Center)*

[2]*Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,*

National Science and Technology Development Agency (NSTDA)

Received : 15 September 2015

Accepted : 8 December 2015

Published online : 2 February 2016

บทคัดย่อ

การผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก (CLA) ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการทรานฟอร์มกรดไขมันไลโนเลอิก (LA) ด้วยปฏิกิริยาไบโอไฮโดรจิเนชั่นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไลโนเลเอตไอโซเมอเรส (linoleate isomerase, LAI) ซึ่งพีเอชถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อโครงสร้างและความเสถียรของเอนไซม์นี้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกของ *Lactobacillus plantarum* NB324 โดยการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* NB324 ภายใต้สภาวะที่ควบคุมพีเอชที่ค่าต่างๆ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญมีค่าอยู่ในช่วง 5.5-6.5 โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 4.4 กรัมต่อลิตร และพีเอช 5.5 เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิต CLA โดยให้ผลผลิต CLA ทั้งหมด 28.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไอโซเมอร์หลักของ CLA ที่เซลล์ผลิตได้ คือ 9-CLA1 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 77 ของ CLA ทั้งหมด

คำสำคัญ : กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก กรดไขมันไลโนเลอิก แบคทีเรียกรดแลคติก ไลโนเลเอตไอโซเมอเรส *Lactobacillus plantarum* NB324

*Corresponding author. E-mail : mail_ha_nae@hotmail.com

Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA) production of lactic acid bacteria by biotransformation of linoleic acid (LA) through biohydrogenation requires the activity of linoleate isomerase (LAI). pH is known to be an important factor affecting structure and stability of this enzyme. In this research, the influence of pH on CLA production of *Lactobacillus plantarum* NB324 was studied, using various pH for cultivating the lactic acid bacteria. The results showed that the optimum pH for cell growth was in a range of 5.5-6.5, with a maximal cell dry weight of about 4.4 $g.L^{-1}$. The highest total CLA concentration (28.2 $mg.L^{-1}$) was obtained when the culture was grown at pH 5.5 The major isomer of the produced CLA was 9-CLA1, accounting for 77% of total CLA isomers.

Keywords : conjugated linoleic acid, linoleic acid, Lactic acid bacteria, linoleate isomerase, *Lactobacillus plantarum* NB324

บทนำ

กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก (*cis*-9, *trans*-11 C18:2, conjugated linoleic acid; CLA) เป็นกรดไขมันซึ่งประกอบไปด้วยคาร์บอน 18 อะตอม และมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่งภายในโมเลกุล ที่มีการจัดเรียงพันธะคู่แบบคอนจูเกต กล่าวคือพันธะคู่ทั้ง 2 ตำแหน่งในโมเลกุล ห่างกันสองอะตอมคาร์บอน ซึ่งต่างจากกรดไขมันไลโนเลอิก (*cis*-9, *cis*-12 C18:2, Linoleic acid; LA) ที่ตำแหน่งของพันธะคู่ห่างกัน 3 อะตอมคาร์บอน โดยโครงสร้างแบบคอนจูเกตของ CLA สามารถพบได้ทั้งในแบบ *cis* หรือ *trans* เช่น *cis, cis; cis, trans; trans, cis* และ *trans, trans* (Mulvihill, 2001) นอกจากตำแหน่งของพันธะคู่ที่อะตอมคาร์บอน 9 และ 11 แล้ว ยังพบ CLA ที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งต่างๆ เช่น *trans*-6, *trans*-8; *cis*-7, *trans*-9; *trans*-8, *cis*-10; *cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *cis*-11, *trans*-13 และ *cis*-12, *cis*-14 เป็นต้น ในปัจจุบันมีการรายงานว่าชนิดของ CLA ที่มีความสำคัญและมีคุณสมบัติทางชีวภาพ คือ *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (9-CLA1) และ *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (10-CLA) โดยมีคุณสมบัติในด้านเภสัชศาสตร์และเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ เช่น เป็นสารต้านการเกิดมะเร็ง (Ip *et al*., 1991) เป็นสารป้องกันโรคเบาหวาน หรือช่วยรักษาระดับน้ำตาลในเลือดและอินซูลินให้ปกติ (Belury *et al*., 2002; Houseknecht *et al*., 1998) ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันหรือส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Hayak *et al*., 1999) ป้องกันภาวะหลอดเลือดแดงอุดตัน (Kritchevsky *et al*., 2002) และมีส่วนช่วยในระบบการเผาผลาญไขมัน (Huang *et al*., 1994)

CLA สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น น้ำนม ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากน้ำนม และผลิตภัณฑ์เนื้อจากสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น เนื้อโค เนื้อแกะ ซึ่ง CLA ที่พบในสัตว์เคี้ยวเอื้องส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปของ 9-CLA (ประมาณ 75-90% ของ CLA ทั้งหมด) ส่วน 10-CLA พบมากในน้ำมันที่ได้จากพืชเป็นหลัก (Liu *et al*., 2011) จากคุณประโยชน์และความต้องการของ CLA ที่มากขึ้น ส่งผลให้งานวิจัยต่างๆ มุ่งเน้นพัฒนาการผลิต CLA มากยิ่งขึ้น โดยมีรายงานการผลิต CLA ด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวให้ผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-product) ที่อยู่ในรูปไขมันทรานส์ (*trans*, *trans*; Trans fatty acid) ปริมาณมาก (Yurawecz *et al*.,1999) และมีต้นทุนในกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ที่สูง ดังนั้น

จึงทำให้การผลิต CLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษามากขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยกระบวนการผลิต CLA ทางชีวภาพด้วยวิธีไบโอไฮโดรจีเนชั่น (biohydrogenation) นั้น ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไลโนเลเอตไอโซเมอเรส (linoleate isomerase หรือ linoleic acid isomerase; LAI) (EC 5.3.1.5) จากแบคทีเรีย (Sieber *et al*., 2004; Coakley *et al*.,2003; Oh *et al*., 2003; Rainio *et al*.,2001; Jiang *et al*.,1998) เริ่มจากการเปลี่ยนกรดไขมันไลโนเลอิกในรูปอิสระให้เป็น 10-Hydroxy C18:1 ด้วยปฏิกิริยาการเติมน้ำ (hydrogenation) หลังจากนั้นสารนี้จะถูกเปลี่ยนเป็น CLA ด้วยปฏิกิริยาการกำจัดน้ำออก จากความสำคัญของเอนไซม์ LAI จึงมีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ LAI ต่อการผลิต CLA ทั้งการหาสภาวะที่เหมาะสมที่ช่วยส่งเสริมการผลิต CLA การพัฒนากระบวนการผลิต และ/หรือการศึกษาสภาวะที่เกี่ยวข้องในการผลิต CLA ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก

พีเอชเป็นปัจจัยหลักที่มีความสำคัญต่อการผลิต CLA พบว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ LAI อยู่ที่ช่วง 5.5-8.5 (Kim *et al*., 2000) โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA แตกต่างกัน เช่น *B. fibrisolvens* อยู่ในช่วงพีเอช 7.0-7.2, *L. reuteri* อยู่ในช่วงพีเอช 7.4-8.8, *L. plantarum* อยู่ในช่วงพีเอช 6.5, *L. acidophilus* อยู่ในช่วงพีเอช 5.0 (Li *et al*., 2013; Chen *et al*., 2012; Lin *et al*., 2002; Kepler & Tove, 1976) โดยค่าพีเอชที่ไม่เหมาะสมจะส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ LAI ในขั้นตอนการไอโซเมอไรเซชั่น (isomerization) และปฏิกิริยาการเติมน้ำในกระบวนการไบโอไฮโดรจีเนชั่น (AbuGhazaleh & Jacoson, 2007; Troegeler-Meynadier *et al*., 2003) และการดำเนินการเพาะเลี้ยงที่ค่าพีเอชในการเจริญใกล้เคียงกับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ LAI จะช่วยส่งเสริมให้การผลิต CLA จาก LA เพิ่มมากขึ้น (Hennessy *et al*., 2009) นอกจากนี้ ค่าพีเอชยังมีผลต่อการผลิตไอโซเมอร์ของ CLA โดยผลต่อการผลิตไอโซเมอร์นี้จะขึ้นอยู่กับสมบัติของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (Choi *et al*., 2005; Kim *et al*., 2002) จากความสำคัญของพีเอชต่อการผลิต CLA งานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาปัจจัยเนื่องจากพีเอชเป็นหลัก

แบคทีเรียที่สามารถสร้าง CLA ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria, LAB) โดยสายพันธุ์ที่เคยมีการรายงานว่าสามารถผลิต CLA ได้ คือ *Lactobacillus reuteri, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis, Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis, Propionibacterium freudenrehichii, Bifidobacterium* sp. และ *Streptococcus* sp. (Chung *et al*., 2008; Van Nieuwenhove *et al*. 2007; Kim & Liu, 2002) อีกทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกยังมีบทบาทสำคัญที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร คือเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (generally regarded as safe, GRAS) ทั้งนี้ แบคทีเรียกรดแลคติก จีนัส *Lactobacillus* สามารถผลิต CLA ได้ในปริมาณค่อนข้างสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. plantarum* (Rodríguez-Alcalá *et al*., 2011; Gorissen *et al.,* 2011; Ogawa *et al*., 2005; Xu *et al*., 2004; Kishino *et al.,* 2002) โดยจากงานวิจัยก่อนหน้า คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์กรดแลคติก *L. plantarum* ที่มีความสามารถในการผลิต CLA จาก *L. plantarum* ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักของไทย จำนวน 44 สายพันธุ์ ซึ่งเชื้อ *L. plantarum* NB324 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิต CLA ได้ดี ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สายพันธุ์ NB324

จากความสำคัญของ CLA และความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ในการผลิต CLA รวมถึงอิทธิพลเนื่องจากพีเอชต่อการผลิต CLA งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิต CLA โดย *L. plantarum* NB324 ซึ่งองค์ความรู้และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปสู่การพัฒนากระบวนการผลิต CLA จากแบคทีเรียกรดแลคติก สำหรับอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์และการเก็บรักษา

แบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* NB324 ที่ใช้ในการศึกษา คัดแยกได้จากอาหารหมักของไทย ซึ่งสายพันธุ์นี้ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ซึ่งจากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่ามีความสามารถในการผลิต CLA จาก LA

การเก็บรักษาสายพันธุ์ทำโดยชะโคโลนีของ *L. plantarum* ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็งชนิด de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) ด้วยสารละลายกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บสารแขวนลอยเซลล์ และแบ่งใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร และเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Modified Man Rogosa Sharp (Modified MRS : MMRS) ที่ดัดแปลงจากสูตรอาหาร MRS (De Man *et al*., 1960) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม มีทเปปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม โซเดียมอะซิเตรต 5 กรัม โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม แอมโมเนียมซิเตรต 2 กรัม ทวีน 80 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม และแมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที

3. การเตรียมสับสเตรทกรดไขมันไลโนเลอิก

วิธีการเตรียมสับสเตรทกรดไขมันไลโนเลอิก (LA) ดัดแปลงจากวิธีของ Liu *et al*. (2011) การเตรียมสับสเตรททำโดยเตรียมในรูปอิมัลชั่น ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ LA (99% LA, Sigma-Aldrich, USA) ผสมกับสารละลาย ทวีน 80 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอิมัลชั่นที่เตรียมได้ถูกเก็บรักษาในภาชนะทึบแสงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *L. plantarum* ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MMRS 80 มิลลิลิตร นำไปไล่อากาศออกโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน (99.995% N_2, Linde, Thailand) และพันจุกสำลีด้วยแผ่นพลาสติกห่ออาหารให้แน่น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

5. กระบวนการหมักแบบแบทช์

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเด็ดไลโนเลอิก ดำเนินการในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร รุ่น Biostat® B plus twin (Satorius Stedim Biotech, Germany) โดยใช้กระบวนการหมักแบบแบทช์ ซึ่งเริ่มจากการเติมกล้าเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ลงในถังที่มีอาหาร MMRS ปริมาตร 1.5 ลิตร ควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยง คือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และแปรผันค่าพีเอชควบคุมในแต่ละชุดการทดลองที่ 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 (ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์

และกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์) จากนั้นเมื่อเซลล์เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ทำการเติมกรดไขมันไลโนเลอิกเพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ และดำเนินการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 48 ชั่วโมง (ระยะในการเพาะเลี้ยงทั้งหมดประมาณ 55-59 ชั่วโมง) ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 1.5 ชั่วโมง จนเข้าสู่ระยะคงที่ เพื่อวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย หลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะการผลิตซึ่งเป็นระยะหลังการเติมกรดไขมันไลโนเลอิกได้ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของ CLA

6. การวิเคราะห์

6.1. การวิเคราะห์การเจริญของเซลล์

การวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ดำเนินการใน 3 รูปแบบ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความขุ่นของเซลล์ และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งหาได้จากการนำตัวอย่างเซลล์ที่ได้จากน้ำหมักมาทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าความขุ่นของเซลล์หาได้โดยการนำน้ำหมักมาเจือจางในอัตราที่เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหาได้โดยใช้เทคนิค colony plate count

6.2. การสกัดลิปิด (Lipid extraction)

วิธีการสกัดลิปิดจากตัวอย่างน้ำหมักที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Liu *et al*. (2011) และ Coakley *et al*. (2003) ทำโดยนำน้ำหมักปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฝาเกลียว เติมกรดไขมันเพนตะเดคาโนอิก (pentadecanoic acid, C15:0) เพื่อใช้เป็นกรดไขมันมาตรฐานภายใน (internal fatty acid standard) และสกัดลิปิดโดยใช้ตัวทำละลายผสมที่มีไอโซโพรพานอล (isopropanal) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ ดูดของเหลวส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียว และนำไประเหยเฮกเซนภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

6.3. การเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl esters, FAMEs)

นำลิปิดที่สกัดได้ มาใช้ในการเตรียมกรดไขมันอนุพันธุ์เมธิลเอสเทอร์ โดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในเมทานอล) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน เติมเฮกเซนที่มี butylated hydroxyltoluene (BHT, 0.01เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเขย่าผสมให้เข้ากันนาน 60 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างสมบูรณ์ ดูดส่วนใสด้านบนกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ (anhydrous sodium sulphate; Na_2SO_4) เพื่อกำจัดความชื้นที่เหลือ แยกส่วนใสนำไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography; GC) โดยใช้คอลัมน์ HP-INNOWax (polyethylene glycol (PEG) capillary) (Algilent, California, USA)

6.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี

นำสารละลายเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมได้จากข้อ 6.3 มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี โดยใช้กรดไขมันเพนตะเดคาโนอิก 0.2012 มิลลิกรัม เป็นกรดไขมันมาตรฐานภายใน ใช้ฮีเลียมที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นแก๊สตัวพา (carrier gas) อุณหภูมิส่วนฉีดสาร (injector temperature) เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิของอุปกรณ์ตรวจวัด (detector temperature) เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการวิเคราะห์ (total program time) 36 นาที และอุณหภูมิของคอลัมน์ (column temperature) เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่ม 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่ม 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ที่ 200 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่ม 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ที่ 230 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

6.5 การคำนวณปริมาณกรดไขมัน

นำข้อมูลโครมาโตแกรมที่ได้ของแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของของกรดไขมันที่ผลิตได้กับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานภายใน (internal standard; Pentadecanoic acid, Prod. No. P6125 (SIGMA)) โดยวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันตาม retention time ของกรดไขมันมาตรฐาน (SupelcoTM 37 Component FAME Mix, Catalog No. 18919-1AMP (SUPELCO); Octadecadienoic acid, Conjugated, Methyl Ester, Sigma Prod. No. O5632 (SIGMA) และ Linoleic acid, Prod. No. W338001 (SIGMA)) โดย retention time ของกรดไขมันที่เกี่ยวข้องในงานวิจัยนี้แสดงดังตารางที่ 1 และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (Total fatty acids; TFA) ปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิด (Individual fatty acids; IFA) และร้อยละของการเปลี่ยน LA เป็น CLA (% conversion) จากสมการที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

$$\mathrm{TFA} = \frac{\text{SUM Area of IFAs}}{\text{Area of Internal Std.}} \times \frac{\text{Weight of Internal Std.}}{\text{Weight of Sample}} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

$$\mathrm{IFA} = \frac{\text{Area of IFAs}}{\text{Area of Internal Std.}} \times \frac{\text{Weight of Internal Std.}}{\text{Weight of Sample}} \qquad \text{สมการที่ 2}$$

$$\%\mathrm{Conversion} = \frac{\text{Area of CLA}}{\text{Area of CLA+Area of LA}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 3}$$

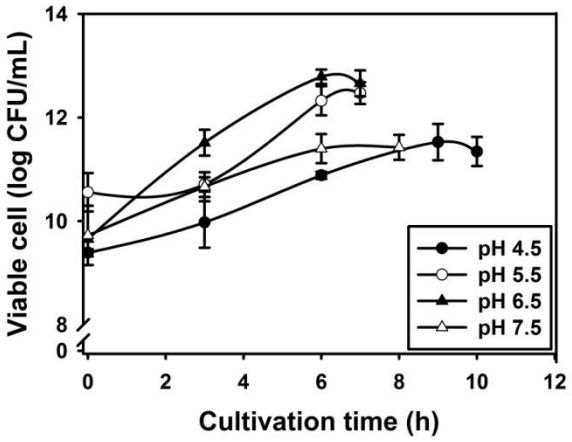
ตารางที่ 1 ค่า retention time ของกรดไขมันที่เกี่ยวข้องในงานวิจัยนี้

Retention time (นาที)	ชนิดของกรดไขมัน
8.362	Butylated hydroxytoluene (BHT)
12.418	Pentadecanoic acid (Internal Standard, IS, C15:0)
21.465	*c*9, *c*12-Octadecadienoic acid (Linoleic Acid, LA, C18:2)
23.097	*c*9, *t*11-Octadecadienoic acid (9-CLA1, C18:2)
23.329	*t*10, *c*12-Octadecadienoic acid (10-CLA, C18:2)
24.367	*t*9, *t*11-Octadecadienoic acid (9-CLA2, C18:2)

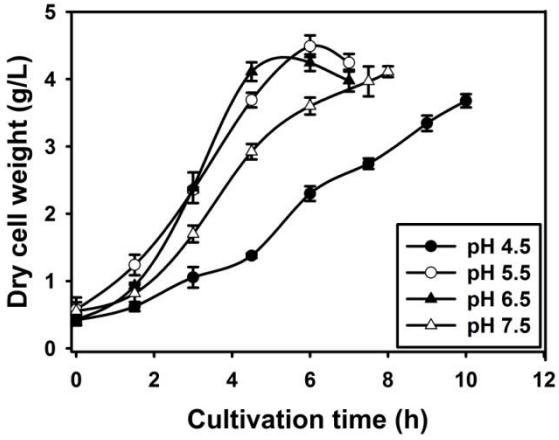
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. อิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญของ *L. plantarum* NB324

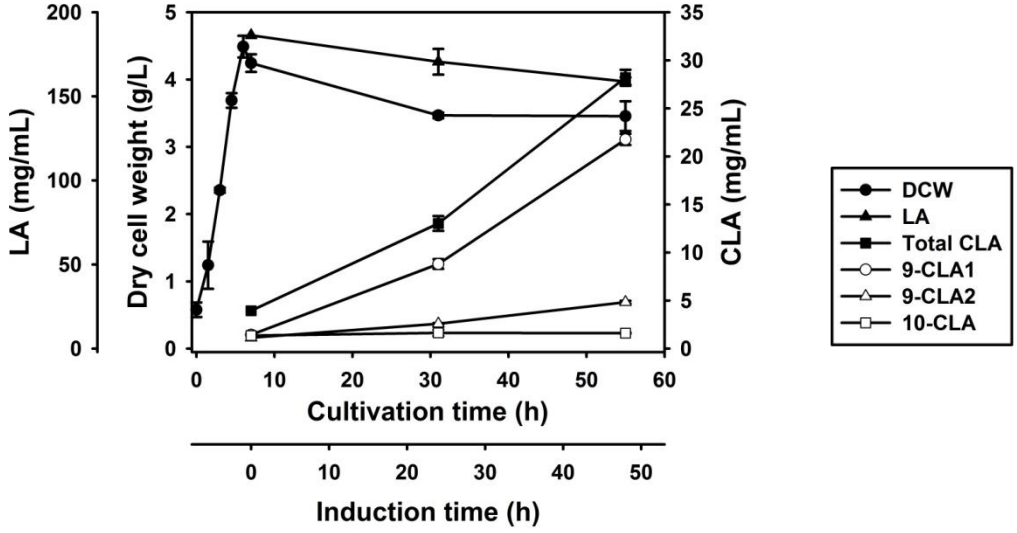
การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญของ *L. plantarum* NB324 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS และมีการแปรผันค่าพีเอชควบคุมที่ 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 1 ภาพที่ 2 และตารางที่ 2 พบว่าการเจริญในแต่ละพีเอชแตกต่างกัน โดยการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.5 และ 6.5 มีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ที่ 7.0 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 7.5 และ 4.5 ที่ใช้เวลาเข้าสู่ระยะคงที่ที่ 8.0 และ 10.0 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.5 ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าที่ค่าพีเอชอื่น ๆ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.5 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) พบว่าที่พีเอช 5.5 และ 6.5 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดใกล้เคียงกัน (12.5 และ12.8 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และอัตราการเจริญของเชื้อ (μ = 0.6 ต่อชั่วโมง) สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.5 จากผลการทดลองพบว่า *L. plantarum* NB324 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่พีเอช 5.5-6.5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ LeBlanc *et al*. (2004); Mataragas *et al*. (2003) และ Fu & Mathews (1999) ที่รายงานว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญของ *L. plantarum* มีค่าอยู่ในช่วงพีเอช 5.0-6.0 และ Soto (2013) ยังกล่าวว่า *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหาร MRS มีความสามารถในการปรับตัวและเจริญเติบโตในช่วงพีเอช 5.5-6.5 โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามค่าพีเอช



ภาพที่ 1 ผลของพีเอชต่อปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. plantarum* NB324



ภาพที่ 2 ผลของพีเอชต่อการเจริญของ *L. plantarum* NB324



ภาพที่ 3 รูปแบบการเจริญและการผลิต CLA ทั้งหมดของ *L. plantarum* NB324 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MMRS ภายใต้สภาวะที่ควบคุมพีเอชที่ 5.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (สัญลักษณ์วงกลมทึบแทนน้ำหนักเซลล์แห้ง; สัญลักษณ์สามเหลี่ยมทึบแทนกรดไขมันไลโนเลอิก; สัญลักษณ์สี่เหลี่ยมทึบแทน Total CLA; สัญลักษณ์วงกลมโปร่งแทน 9-CLA1; สัญลักษณ์สามเหลี่ยมโปร่งแทน 9-CLA2 และสัญลักษณ์สี่เหลี่ยมโปร่งแทน 10-CLA)

ตารางที่ 2 ข้อมูลการเจริญและการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB324 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ควบคุมค่าพีเอชต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

	พีเอชที่ควบคุม			
	พีเอช 4.5	**พีเอช 5.5**	**พีเอช 6.5**	**พีเอช 7.5**
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	3.7±0.1	4.5±0.2	4.2±0.1	4.1±0.1
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร)	11.5±0.4	12.5±0.2	12.8±0.1	11.4±0.3
อัตราการเจริญของเชื้อ (ต่อชั่วโมง)	0.3±0.0	0.4±0.0	0.6±0.0	0.4±0.0
กรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	7.4±1.1	28.2±0.8	18.7±0.5	3.8±0.3
9-CLA1 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	2.4±0.8	21.8±0.6	12.4±0.2	1.4±0.0
9-CLA2 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	4.1±0.2	4.8±0.2	4.2±0.3	1.1±0.0
10-CLA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	1.1±0.1	1.6±0.3	2.1±0.0	1.3±0.2
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัม$_{เซลล์}$)	2.4±0.1	8.2±0.6	6.2±0.2	1.1±0.0
ร้อยละของ CLA ต่อกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกทั้งหมด	2.0±0.4	8.0±1.0	5.0±1.1	1.2±0.1
อัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ (เปอร์เซ็นต์)	4.3±0.5	15.1±0.2	12.1±0.3	1.7±0.2
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	58.0	55.0	55.0	56.0
ระยะการเจริญก่อนการเหนี่ยวนำ (ชั่วโมง)	10.0	7.0	7.0	8.0

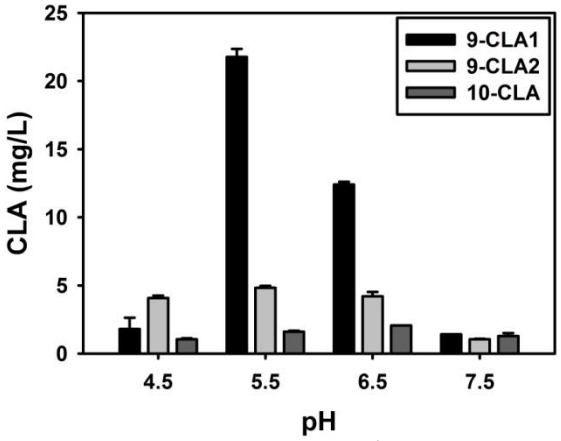
2. ผลของพีเอชต่อการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจาก *L. plantarum* NB324

ในการศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิต CLA ของ *L. plantarum* NB324 ดำเนินการโดยเติม LA ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเมื่อเซลล์เจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์หยุดการเจริญหรือมีการเจริญต่ำ การเลือกเติม LA ในระยะที่เซลล์เจริญเติบโตจนมีความเข้มข้นของเซลล์สูง เพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญเนื่องจาก LA (Desbois & Smith, 2010; Kankaanpää *et al*., 2004;Partanen *et al*., 2001) จากการทดลองภายใต้สภาวะการหมักที่ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ พบว่าเซลล์แบคทีเรียสามารถผลิต CLA ได้ที่ทุกค่าพีเอชควบคุม (ภาพที่ 3 และตารางที่ 2) โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA คือ พีเอช 5.5 ทั้งนี้ หลังจากเติม LA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลผลิต CLA ทั้งหมดเท่ากับ 28.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim & Liu (2002) ที่กล่าวว่าพีเอชเป็นปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ CLA ของแบคทีเรียที่ไม่ได้คัดแยกมาจากกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (non-ruminal bacteria) นอกจากนี้ Chen *et al*. (2012) ได้ทำการศึกษา

สมบัติของเอนไซม์ไลโนเลเอทไอโซเมอเรสที่ได้จาก *L. plantarum* ZS2058 พบว่าเซลล์สามารถผลิต CLA ได้สูงที่สุดที่พีเอช 6.5 หรือที่ พีเอชต่ำกว่า ในขณะที่ผลผลิต CLA ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อพีเอชมีค่ามากกว่า 7.0 โดยผลผลิต CLA สูงสุดสามารถตรวจพบหลังจากเหนี่ยวนำการผลิตด้วยการเติม LA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการทำงานของเอนไซม์ LAI ไม่จำเป็นต้องใช้ cofactor หรือแหล่งพลังงานอื่นมาช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน LA ไปเป็น CLA ทำให้สามารถผลิต CLA ได้ถึงแม้ว่าเซลล์จะมีกิจกรรมลดลงหรือความมีชีวิตลดลงก็ตาม (Chen *et al*., 2012)

3. ผลของพีเอชต่อการผลิตไอโซเมอร์ของ CLA จาก *L. plantarum* NB324

การศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตไอโซเมอร์ของ CLA จาก *L. plantarum* NB324 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและสัดส่วนของกรดไขมันของเซลล์ที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่ควบคุมค่าพีเอชต่างๆ ในระยะเหนี่ยวนำการผลิตหลังจากเติม LA ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 4) พบว่า CLA ส่วนใหญ่ที่เซลล์ผลิตได้อยู่ในรูปไอโซเมอร์ 9-CLA1 และ 9-CLA2 ซึ่งให้ผลผลิตสูงสุดที่พีเอช 5.5 โดยมีค่าเท่ากับ 21.8 และ 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเมอร์ 10-CLA ให้ผลผลิตสูงสุดที่พีเอช 6.5 (2.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.5 มีสัดส่วนการผลิตไอโซเมอร์ 9-CLA1, 9-CLA2 และ 10-CLA เท่ากับ 77, 17 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ของ CLA ทั้งหมด ตามลำดับ ทั้งนี้ผลผลิตส่วนใหญ่อยู่ในรูป 9-CLA1 จึงสามารถสรุปได้ว่า *L. plantarum* NB324 จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตไอโซเมอร์ 9-CLA1 และค่าพีเอชมีผลต่อการผลิต 10-CLA น้อยมาก ซึ่งแตกต่าง/ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li *et al*. (2013) และ Choi *et al*. (2005) ที่กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่ค่าพีเอชมากกว่า 5.5 จะสามารถผลิต 9CLA-1 ได้เป็นไอโซเมอร์/ฟอร์มหลัก และจะผลิต 10-CLA ได้เป็นไอโซเมอร์หลักเมื่อเพาะเลี้ยงที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 5.0



ภาพที่ 4 ผลของพีเอชต่อไอโซเมอร์ของ CLA ที่ผลิตโดย *L. plantarum* NB324

สรุปผลการวิจัย

พีเอชเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิต CLA โดย *L. plantarum* NB324 ซึ่งพีเอชในช่วง 5.5-6.5 เป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากที่สุด โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด และอัตราการเจริญของเชื้อเท่ากับ 4.35±0.15 กรัมต่อลิตร, 12.65±0.15 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร และ 0.5±0.00 ต่อชั่วโมง สำหรับ

การผลิต CLA พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA คือ พีเอช 5.5 โดยให้ปริมาณ CLA สูงสุดเท่ากับ 28.2±0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ การลดพีเอชควบคุมเป็น 4.5 และการเพิ่มพีเอชควบคุมเป็น 6.5 ส่งผลให้ปริมาณ CLA ที่ผลิตได้ลดลงถึง 74% และ 34% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต CLA เป็นค่าที่จำเพาะเจาะจงไม่ใช่ช่วงพีเอช รวมถึงแสดงให้เห็นว่าพีเอชเป็นปัจจัยที่สำคัญเป็นอย่างมากต่อการผลิต CLA ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* NB324 เพื่อเพิ่มมูลค่าหรือเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์อาหาร และ/หรืออาหารสัตว์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2556 (เลขที่ 1/12/2556) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย โดยการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ประจำปีงบประมาณ 2556 และขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ส่งเสริมบุคลากรในสังกัดให้ได้ทำงานวิจัย ขอขอบคุณ ดร. วรรณพ วิเศษสงวน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ในการให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *L. plantarum* NB324

เอกสารอ้างอิง

AbuGhazaleh, A.A., & Jacobson, B.N. (2007). The effect of pH and polyunsaturated C18 fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acids in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. *Animal Feed Science and Technology*, *136*, 11-22.

Belury, M.A., (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, *22*, 505-531.

Chen, H., Yang, B., Gu, S., Zhang, B., Xu, Q., Ye, Q., Song, Y., Chen, Y.Q., Zhang, H., & Chen, W. (2012). Purification and characterization of linoleate isomerase from *Lactobacillus plantarum* ZS2058. *African Journal of Biotechnology*, *11*, 4579-4587.

Choi, N.J., Imm, J.Y., Oh S., Kim, B.C., Hwang, H.J., & Kim, Y.J. (2005). Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. *Animal Feed Science and Technology*, *123-124 part 2*, 643-653.

Chung, S.H., Kim, I.H., Park, H.G., Kang, H.S., Yoon, C.S., Jeong, H.Y., Choi, N.J., Kwon, E.G., & Kim, Y.J. (2008). Synthesis of conjugated linoleic acid by human-derived Bifidobacterium breve LMC 017: utilization as a functional starter culture for milk fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 3311-3316.

Coakley, M., Ross, R.P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R., & Stanton, C. (2003). Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived Bifidobacterium species. *Journal of Applied Microbiology*, *91*, 138-145.

De Man, J.C., Rogosa, M., & Sharpe, M.E. (1960.) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Bacterioogy*, *23*, 130.

Desbois, A.P., & Smith, V.J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*, 1629-1642.

Fu, W., & Mathews, A.P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal, 3*, 163–170.

Fuentes, M.C., Calsamiglia, S., Cardozo, P.W., & Vlaeminck, B. (2009). Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, *92*, 4456-4466.

Gorissen, L., Weckx, S., Vlaeminck, B., Reas, K., Vuyst, D., Smet, D., & Leroy, F. (2011). Linoleate isomerase activity occurs in lactic acid bacteria strains and is affected by pH and temperature. *Journal of Applied Microbiology*, *111*, 593-606.

Hayek, M.G., Han, S.N., Wu, D., Watkins, B.A., Meydani, M., & Dorsey, J.L. (1999). Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrlBR mice. *Journal of Nutrition*, *129*, 32-38.

Hennessy, A.A., Ross, R.P., Devery, R., & Stanton, C. (2009). Optimization of a reconstituted skim milk based medium for enhanced CLA production by bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *106*, 1315-1327.

Houseknecht, K.L., VandenHeuvel, J.P., Moya-Camarena, S.Y., Portocarrero, C.P., Peck, L.W., & Nickel, K.P. (1998). Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *244*, 678-682.

Huang,Y.C., Luedecke, L.O., & Shultz, T.D. (1994). Effect of cheddar cheese consumption on plasma conjugated linoleic acid in men. *Nutrition Research*, *14*, 373-386.

Hutkins, R.W., & Nannen, N.L. (1993). pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, *76*, 2354–2365.

Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J.A., & Pariza, M.W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Research, 51*, 6118-6124.

Jenskins, J.K., & Courney, P.D. (2003). *Lactobacillus* growth and membrane composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. *Canadian Journal of Microbiology, 49*, 51-57.

Jiang, J., Bjorck, L., & Fonden, R. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *Journal of Appllied Microbiology, 8*, 95-102.

Kankaanpää, P., Yang, B. ,Kallio, H., Isolauri, E., & Salminen, S. (2004). Effect of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of *Lactobacilli*. *Appllied and Environmental Microbiology*, *70*, 129-136.

Kepler, C.R. & Tove, S.B. (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate 12-*cis*, 11-*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolven*. *Journal of Biological Chemistry*, *242*(24), 5686-5692.

Kim, Y.J., Liu, R.H., Bond, D.R., & Russell, J.B. (2000). Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(12), 5226-5230.

Kim, Y.J., Liu, R.H., Rychlik, J.L., & Russell, J.B. (2002). The enrichment of ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology*, *92*, 976-982.

Kim, Y.J. & Liu, R.H. (2002). Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, *67*(5), 1731-1737.

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*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, *66*, 2283-2286.

Kritchevsky, D., Tepper, S.A., Wright, S., & Czarnecki, S.K. (2002). Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Nutrition Research*, *22*, 1275-1279.

LeBlanc, J.G., Garro, M.S., & Savoy, de Giori G., (2004). Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, α-galactosidase activity and fermentation product. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*, 265-271.

Li, J., Zhang, L., Han, X., Yi, H., Guo, C., Zhang, Y., Du, M., Luo, X., Zhang, Y., & Shan, Y. (2013). Effect of incubation conditions and possible intestinal nutrients on *cis*-9, t*rans*-11 conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* F0221. *International Dairy Journal*, *29,* 93-98.

Lin, T.Y., Lin, C.W., & Wang, Y.J. (2002). Linoleic acid isomerase activity in enzyme extracts from *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Journal of Food Science*, *67*, 1502-1505.

Liu, P., Shen, S.R., Ruan, H., Zhou, Q., Ma, L.L., & He, G. Q. (2011). Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented Chinese pickles. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* (*Biomedicine & Biotechnology*), *12*(11), 923- 930.

Matagaras, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., & Drosinos, EH. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, *64*, 265-271.

Mulvihill, B. (2001). Ruminant meat as a source of conjugated linoleic acid (CLA). *Nutrition Bulletin*, *26*, 295-299.

Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K., & Shimizu, S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *100*, 355-364.

Oh, D.K., Hong, G.H., Lee, Y., Min, S.G., Sin, H.S., & Cho, S.K. (2003). Production of conjugated linoleic acid by isolated Bifidobacterium strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*, 907-912.

Partanen, L., Marttinen, N., & Alatossava, T. (2001). Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. Syst. *Appliled Microbiology*, *24*, 500-506.

Rainio, A., Vahvaselkä, M.,Suomalainen, T., & Laakso, S. (2001). Reduction of linoleic acid inhibition inproduction of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Canadian Journal of Microbiology*, *47*, 735-740.

Rodríguez-Alcalá, L.M., Braga, T., Xavier Malcata, F., Gomes, A., & Fontecha, J. (2011). Quantitative and qualitative determination of CLA produced by Bifidobacterium and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag +-HPLC techniques. *Food Chemistry*, *125*(4), 1373-1378.

Schmid, A., Collomb, M., Sieber, R., & Bee, G. (2006). Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. *Meat Science*, *73*, 29-41.

Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P., & Eyer, H. (2004). Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products- a review. *International Dairy Journal*, *14*, 1-15.

Soto, C. (2013). *Lactobacillus plantarum* as source of conjugated linoleic acid: Effect of pH, incubation temperature and inulin incorporation. *Journal of Biochemical Technology*, *5*, 649-653.

Troegeler-Meynadier, A., Nicot, M.C., Bayourthe, C., Moncoulon, R., & Enjalbert, F. (2003). Effect of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediated of ruminal biohydrogenation in vitro. *Journal of Dairy Science*, *86*, 4054-4063.

Van Nieuwenhove, C.P., Oliszewski, R., Gonzalez, S.N., & Perez Chaia, A.B., (2007). Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. *Letters in Applied Microbiology*, *44*(5), 467-474.

Xu, S., Boylston, T., & Glatz, B. (2004). Effect of lipid source on probiotic bacteria and conjugated linoleic acid formation in milk model systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *81*, 589-595.

Yurawecz, M., Mossoba, M., Kramer, J., Pariza, M., & Nelson, G. (1999). Advances in conjugated linoleic acid research. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.