بهینه‌سازی شرایط تولید اسید لینولئیک مزدوج (9c,11t) از روغن کرچک با استفاده از KOH

مریم جعفری ولدانی/ دانشجوی مقطع دکتری، دانشگاه صنعتی اصفهان
Email: mjafari@ag.iut.ac.ir
مهدی کدیور، سید امیرحسین گلی/ دانشیار دانشگاه صنعتی اصفهان، استادیار دانشگاه صنعتی اصفهان
Email: kadivar@cc.iut.ac.ir, amirgoli@cc.iut.ac.ir

چکیده

ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس فراوانترین ایزومر CLA در طبیعت و فعالترین شکل از نظر بیولوژیکی می‌باشد. در این تحقیق بهینه‌سازی شرایط واکنش از نظر مقدار کاتالیزور ، دما و مدت زمان واکنش بر تولید ایزومر ۹-سیس،۱۱-ترانس با استفاده از طرح RSM و آبگیری از روغن کرچک(دارای رسینولئیک اسید به عنوان اسید چرب غالب) و نیز جایگزین کردن KOH به عنوان عامل آبگیری کننده ارزان قیمت به جای DBU انجام شده و تاثیر عوامل مختلف بر راندمان تولید ارزیابی شده است. نتایج نشان داد که دما و مقدار کاتالیزور عوامل بسیار مهمی در ترکیب و راندمان تولید CLA هستند. با افزایش دما و مقدار کاتالیزور راندمان تولید ایزومر مورد نظر به ترتیب کاهش و افزایش می یابد ولی زمان تاثیر قابل توجهی در این زمینه نشان نداد. دمای $50^{\circ}C$، مقدار کاتالیزور ۱/۸ گرم و زمان ۵/۲۵ ساعت به عنوان شرایط اپتیمم برای حصول حداکثر تولید ایزومر ۹-سیس،۱۱ترانس (۵۳/۹۳٪) مشخص شد.

کلمات کلیدی

اسید لینولئیک مزدوج، روغن کرچک، رسینولئیک اسید، RSM

۱. مقدمه

امروزه بیماریهایی مانند چاقی، هایپرلیپیدمی، تصلب شرایین، دیابت و فشار خون بالا روند صعودی یافته و شیوع آن در کشورهای صنعتی رو به افزایش است. اگرچه مکانیسم دقیق این بیماریها در ارتباط با شیوه زندگی افراد چندان روشن نمی باشد، اما به نظر می‌رسد که کیفیت چربی‌های غذایی می تواند یک عامل بسیار مهم در این زمینه به شمار آید. در حال حاضر اسیدهای چرب مزدوج به دلیل تاثیرات مثبت که در جهت پیشگیری از ابتلا به این بیماریها دارند، توجه زیادی را به خود معطوف کرده اند. اسیدهای چرب مزدوج مخلوطی از ایزومرهای موقعیتی و فضایی اسیدهای چرب چند غیر اشباعی با پیوندهای دوگانه مزدوج بوده و یکی از اسیدهای چرب شاخص در این گروه، CLA می باشد [۸].

اسید لینولئیک مزدوج (CLA)، مخلوطی از ایزومرهای هندسی و موقعیتی اسید لینولئیک بوده و در مطالعات صورت گرفته فعالیتهای بیولوژیکی متنوع و منحصر به فردی از خود نشان داده‌اند. مهمترین منابع CLA چربی شیر و گوشت حاصل از نشخوارکنندگان است. البته روغنهای گیاهی و مارگارین نیز دارای مقادیر کمی CLA هستند که در طی فرایند رنگبری، بوگیری و هیدروژناسیون در روغن ایجاد می‌شود [۲،۶].

ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس به طور طبیعی از طریق بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیر اشباع توسط باکتری روده ای *Butyrvibrio fibrisolvens* در نشخوارکنندگان مانند گاو، گوسفند ، بز و شتر تولید می شود و در تحقیقات از نظر بیولوژیکی به عنوان فعالترین فرم CLA شناخته شده است. دریافت روزانه CLA برای کشورهای مختلف محاسبه شده و حدود چند صد میلی گرم در یک رژیم غذایی معمول بوده است که بسیار کمتر از مقدار مفید و موثر آن برای بدن می‌باشد (۳/۵-۳ گرم برای یک شخص ۷۰ کیلوگرمی) و بنابراین امروزه تحقیقات گسترده ای در زمینه سنتز و استفاده از CLA در صنعت غذا (به عنوان یک ترکیب زیست فعال) انجام گرفته است. CLA تجاری از طریق ایزومریزاسیون قلیایی روغنهای غنی از اسید لینولئیک به دست می‌آید. روشهای مطرح دیگر برای تولید CLA شامل ایزومریزاسیون اسید لینولئیک با استفاده از باکتریهایی مانند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و یا آبگیری از روغن کرچک می باشد. البته روشهای دیگری مانند فتواکسیداسیون اسید لینولئیک نیز بکار برده شده است که در آنها راندمان تولید چندان قابل توجه نبوده است [۳، ۴، ۶]. به منظور مطالعه بیشتر مسیرهای متابولیکی و تاثیرات فیزیولوژیکی ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس، مطلوب است که مقادیر قابل توجهی از آن به شکل نسبتاً خالص و به طور ایده آل با استفاده از روشهای ساده و مواد اولیه قابل دسترس تولید شود و به نظر می‌رسد که روغن کرچک برای این منظور ماده اولیه مناسبی باشد.

روغن کرچک روغنی ویسکوز با رنگ زرد کم رنگ و غیر فرار، طبیعی، ارزان و دوست محیط زیست است. طعم خاصی ندارد و در مقایسه با سایر روغنهای گیاهی عمر نگهداری خوب دارد. صادرکنندگان این روغن در وهله اول هند و سپس چین و مکزیک هستند. واریته های مختلف بین ۴۶ تا ۵۵ درصد روغن دارند. ریسینولئیک اسید (12-hydroxy-9-octadecenoic acid) اسید چرب اصلی در این روغن و سایر اسیدهای چرب شامل لینولئیک، اولئیک، استئاریک، پالمیتیک، لینولنیک و ایکوزانوئیک اسید است. از کل روغن کرچک تولیدی در دنیا کمتر از ۱٪ آن برای تولید محصولات مفید برای سلامتی کاربرد دارد در حالیکه با توجه به اینکه حاوی ۹۰-۸۵٪ اسیدرسینولئیک می‌باشد می‌تواند به عنوان منبع مستعدی برای تولید CLA در نظر گرفته شود [۷].

با توجه به اینکه تولید CLA از طریق آبگیری از رسینولئیک اسید واکنش موثری بوده اما عوامل زیادی بر تولید CLA با این روش تاثیرگذارند، هدف در این تحقیق بهینه سازی شرایط واکنش از نظر مدت زمان انجام واکنش، درجه حرارت و مقدار کاتالیزور مورد استفاده با استفاده از طرح RSM به منظور دستیابی به حداکثر راندمان تولید ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس بوده است. برای تولید ایزومرهای CLA از روغن کرچک از ترکیبی به نام DBU (1,8- diazabicyclo-(5.4.0)-undec-7-ene) به عنوان عامل آبگیری کننده استفاده می شود که ترکیب گران قیمتی است و در این تحقیق سعی شده است که بهینه سازی واکنش با جایگزین کردن KOH (ترکیبی با قیمت به مراتب کمتر) به جای DBU انجام شود.

۲. مواد و روشها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک تهیه شده و نمونه های روغن کرچک از بازار خریداری شدند.

۱.۲. تهیه متیل استر اسیدهای چرب در روغن کرچک و تعیین پروفایل اسید چرب با GC

متیله کردن روغن کرچک مطابق با روش Yang و همکاران (۲۰۰۲) و با استفاده از BF3 14% در متانول انجام شد [۱۰]. دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent 6890N ساخت آمریکا، مجهز به ستون مویینه HP-5 (۳۰ متر، قطر ۳۲/۰ میلی‌متر و فاز ثابت ۲۵/۰ میکرومتر) به منظور تعیین پروفیل اسیدهای چرب نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آشکارساز دستگاه از نوع FID در دمای ۲۵۰°C بوده و از گاز ازت به عنوان گاز حامل استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده به این شرح بود: شروع برنامه با دمای ۱۸۰ °C و باقی‌ماندن در همین دما به مدت ۱ دقیقه، سپس افزایش دما تا ۲۱۰ °C با سرعت ۱/۳ درجه سانتیگراد در دقیقه، مجدداً دما با سرعت ۵ درجه سانتیگراد در دقیقه تا ۲۵۰°C افزایش یافته و در نهایت ۱۰ دقیقه در این دما باقی ماند. نمونه متیله شده در حجم ۱ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد. بررسی تولید ایزومرهای CLA با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی نیز تحت شرایط مشابه انجام شد.

۲.۲. خالص سازی رسینولئیک اسید متیل استر

خالص سازی رسینولئیک اسید با استفاده از روش Berdeaux و همکاران (۱۹۹۷) و از طریق شستشوهای متعدد با استفاده از دو حلال متانول ۹۰٪ و هگزان انجام شد [۱]. میزان رسینولئیک اسید مجدداً با دستگاه GC مورد بررسی قرار گرفت.

۳.۲. تولید CLA از رسینولئیک اسید

برای تولید CLA از رسینولئیک اسید مطابق با روش Yang و همکاران (۲۰۰۲) ابتدا methyl 12- mesyloxy- octadec- 9- enoate (MMOE) تهیه شده و تولید آن با طیف FTIR مورد تایید قرار گرفت و سپس برای تولید CLA مورد استفاده قرار گرفت [۱۰]. طبق نتایج Berdeaux و همکاران (۱۹۹۷) انجام واکنش به مدت ۴ ساعت با استفاده از DBU به عنوان کاتالیزور برای حذف کامل methyl 12- mesyloxy- octadec- 9- enoate و تبدیل آن به ایزومرهای CLA کافی است. با توجه به اینکه در این تحقیق از KOH که قیمتی به مراتب کمتر دارد به عنوان کاتالیزور استفاده شد، برای بررسی تاثیر مدت زمان واکنش، دما و میزان کاتالیزور بر تولید ایزومر مورد نظر، هر کدام از این سه متغیر در سه سطح مورد بررسی قرار گرفتند.

۴.۲. طراحی آزمایش

با استفاده از طرح سطح پاسخ و به منظور بهینه سازی شرایط تولید CLA، سه فاکتور دما، زمان، مقدار کاتالیزور در سه سطح، طبق جدول شماره ۱ تعیین شدند و برای بهینه سازی شرایط واکنش جهت حصول حداکثر مقدار ایزومر ۹-سیس، ۱۱-ترانس از طرح D- optimal استفاده شد. تیمارهای انتخابی توسط نرم افزار شامل ۱۸ تیمار بود.

جدول ۱ : سطوح کدگذاری شده متغیرهای مستقل مورد استفاده در طرح RSM

سطوح کد گذاری شده	کدها		
	دما (^oC)	زمان (h)	مقدار کاتالیزور (گرم)
α-= -۱	۵۰	۴	۱
۰	۸۰	۸	۱/۴
۱	۱۱۰	۱۲	۱/۸

طراحی آزمایش انجام شده و نتایج در نرم افزار Design Expert 7.1.6 برای ارزیابی مدلها آنالیز شدند.

۳. نتایج

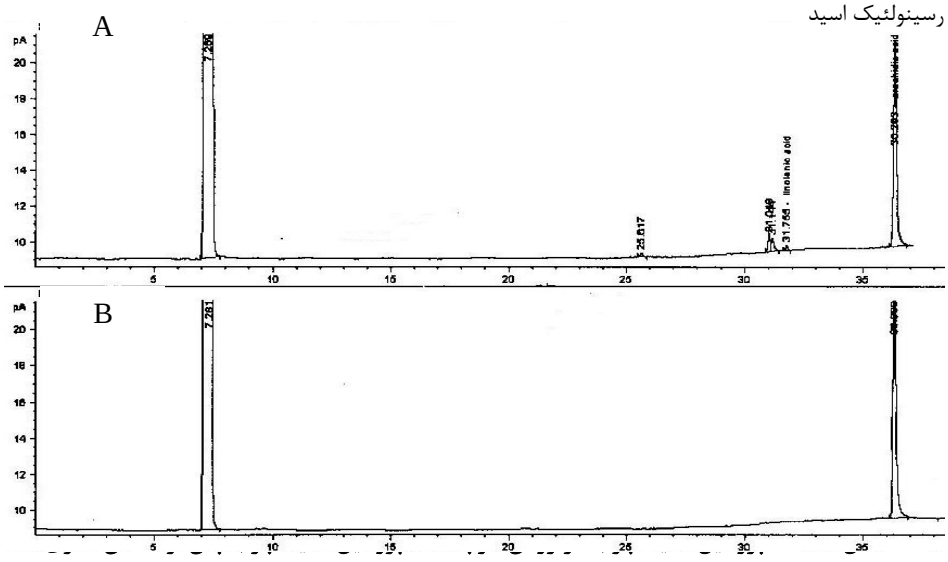
۱.۳. نعیین پروفایل اسید چرب در روغن کرچک قبل و بعد از خالص سازی

میزان اسید رسینولئیک در روغن کرچک می تواند تحت تاثیر فاکتورهای مختلف قرار بگیرد. از نمونه های خریداری شده از بازار، نمونه‌ای که درصد بالاتری از این اسید چرب را دارا بود جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب شد. پروفایل اسید چرب این نمونه در جدول شماره ۲ قابل مشاهده است.

جدول ۲ : درصد اسید چرب در نمونه روغن کرچک انتخاب شده

نوع اسید چرب	مقدار (٪)
اسید پالمتیک	۱/۳۲
اسید استئاریک	۰/۵۱
اسید اولئیک	۵/۱۶
اسید لینولئیک	۴/۲۹
اسید لینولنیک	۱/۱۲
اسید رسینولئیک	۸۷/۵۷

بعد از تبدیل اسیدهای چرب موجود در روغن کرچک به متیل استر آنها، مراحل خالص سازی رسینولئیک اسید متیل استر مطابق با روش ذکر شده در بخش مواد و روشها انجام شد. این خالص سازی می‌تواند بر روی ستون سیلیکا و با استفاده از حلال مناسب و یا با استفاده از ستون HPLC انجام شود اما این روشها می‌تواند برای مقادیر کم نمونه در حد میلی گرم و گرم مفید باشد. ولی روش مورد استفاده در این تحقیق می‌تواند برای خالص سازی مقادیر زیاد نمونه نیز کاربرد داشته باشد. پس از خالص‌سازی مجدداً پروفایل اسید چرب در نمونه روغن مورد بررسی قرار گرفت. از ۵۰ گرم روغن کرچک متیله شده در نهایت ۴۳/۷ گرم متیل رسینولئات با خلوص بالای ۹۸٪ حاصل شد(شکل ۱). Berdeaux و همکاران (۱۹۹۷) با اعمال همین روش خالص سازی در نهایت به خلوص ۹۸/۵٪ از رسینولئیک اسید متیل استر دست یافتند و Yang و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از ستون کروماتوگرافی توانستند خلوص این اسید چرب را به ۹۹٪ برسانند.



۲.۳. مدل‌سازی

پس از آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار ، آنالیز آماری مدل‌ها به صورت جدول ارائه می‌شود که در جدول شماره ۳ قابل مشاهده است.

جدول ۳ : آنالیز آماری مربوط به اعتبار مدل

مدل	S.D.	R^2	R^2 تعدیل شده	R^2 پیش‌بینی شده	Press
خطی	۰/۸۰	۰/۹۵۰۵	۰/۹۳۹۸	۰/۹۱۵۴	۱۵/۳۱
فاکتور متقابل دوگانه	۰/۸۹	۰/۹۵۱۹	۰/۹۲۵۷	۰/۸۶۳۱	۲۴/۷۸
درجه دوم	۱/۰۱	۰/۹۵۴۹	۰/۹۰۴۲	۰/۸۲۳۹	۳۱/۸۸
درجه سوم	۱/۲۹	۰/۹۶۳۲	۰/۸۴۳۶	-	-

نرم افزار مدلی را پیشنهاد می‌کند که دارای انحراف استاندارد(S.D.) و مجموع مربعات باقیمانده برآورد شده(Press) کم و ضریب همبستگی(R^2) زیاد باشد که نرم افزار در این تحقیق مدل خطی را به دلیل داشتن این ویژگی‌ها پیشنهاد کرد. در این بررسی مدل مربوط به تولید ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس در سطح احتمال ۹۵ درصد تعیین شد و مدل مربوط به آن در معادله ۱ آورده شده است(X_1، X_2، X_3 به ترتیب دما بر حسب درجه سانتیگراد، زمان بر حسب ساعت و مقدار کاتالیزور بر حسب گرم می‌باشند):

$$Y=۴۴/۲۷۲۰۴ -۰/۰۶۵۸۷۸X_1+۰/۰۳۲۲۸۵X_2+۷/۱۰۳۳۲X_3 \quad (۱)$$

همانگونه که از معادله نیز مشخص است اثر هر سه متغیر بر تولید CLA به صورت خطی معنی دار می‌باشد.

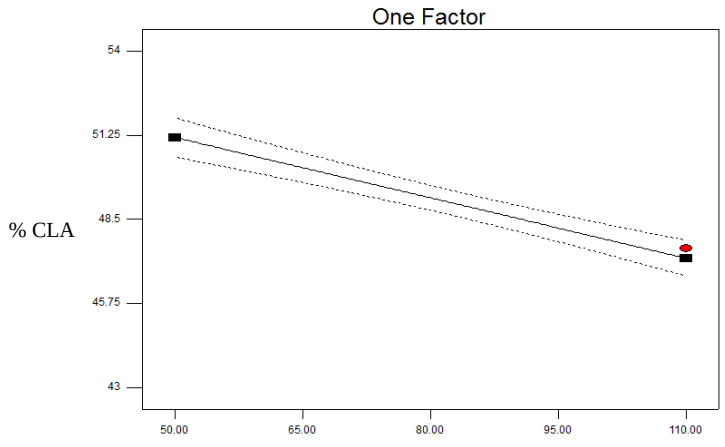
۳.۳. بررسی اعتبار مدل

یکی از روش‌های بررسی اعتبار مدل استفاده از R^2 (ضریب همبستگی یا ضریب تبیین) و یا R^2 تعدیل شده است. مقدار R^2 بین صفر و یک متغیر است و مقادیر بیشتر مطلوب‌تر می باشد. دقت مدل از طریق ضرایب R^2 وR^2 تعدیل شده مورد ارزیابی قرار گرفت که به ترتیب ۰/۹۵۰۵ و ۰/۹۳۹۸ بودند. این مقادیر نشان می‌دهند که مدل از اعتبار قابل قبولی برخوردار است. از دیگر روش‌های تعیین اعتبار مدل و تأیید اولیه آن رسم منحنی مقادیر واقعی به دست آمده از انجام تیمارها در مقابل مقادیر پیش بینی شده توسط مدل پیشنهادی می‌باشد. هر چه شیب منحنی داده شده و ضریب همبستگی به عدد یک نزدیک‌تر باشد بیانگر مناسب بودن مدل انتخابی است که در این تحقیق نیز چنین چیزی مشاهده شد(R^2= ۰/۹۶).

۴.۳. بررسی اثر پارامترهای بررسی شده بر میزان تولید ایزومر۹- سیس،۱۱- ترانس

۱.۴.۳. تأثیر دما

همانگونه که از معادله شماره ۱ مشخص است تاثیر دما بر میزان تولید ایزومر ۹- سیس ۱۱- ترانس CLA به صورت معادله درجه یک و خطی می باشد. اگر چه کلیه اثرات را باید در کنار یکدیگر بررسی کرد ولی می‌توان فرض کرد که از بین سه متغیر، دو مورد ثابت هستند و به این ترتیب اثر متغیر باقیمانده را به طور مستقل مورد بررسی قرار داد. به منظور بررسی اثر دما بر روی مقدار تولید این ایزومر، سایر فاکتورها را ثابت فرض کرده و مقدار متوسط آن‌ها را که سطح مرکزی(کد صفر) دارند در نظر گرفته و منحنی شکل شماره ۲ به دست می‌آید. بر اساس این منحنی با افزایش دما، مقدار CLA تولید شده به صورت خطی کاهش می‌یابد؛ به عبارتی دیگر مقدار تولید CLA با افزایش دما نسبت عکس دارد.

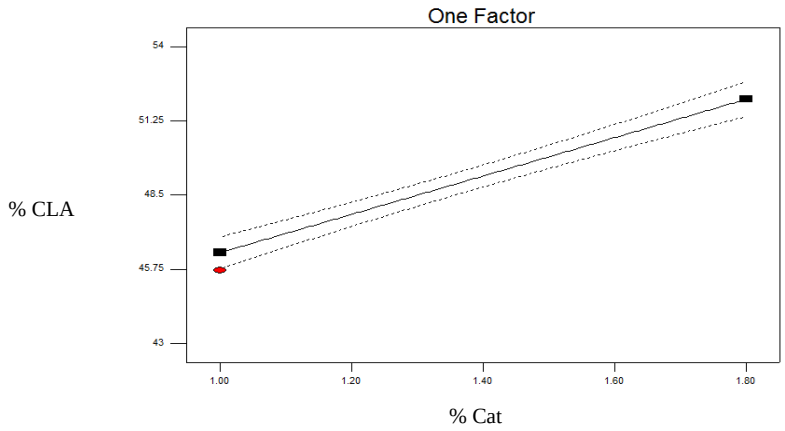


شکل ۲ : تأثیر دما بر تولید ایزومر9c,11t

با توجه به اینکه افزایش دما باعث افزایش تولید ایزومرهای متعددی از CLA و خصوصا ایزومرهای ترانس- ترانس می‌شود بنابراین کاهش ایزومر مورد نظر در اثر افزایش دما را می‌توان با تولید سایر ایزومرها مرتبط دانست. Yang و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که با افزایش دما به ۱۲۰ درجه سانتیگراد، دو ایزومر اضافی تحت عنوان ۱۰- ترانس،۱۲- ترانس و ۹- ترانس،۱۱- ترانس نیز تولید می‌شوند.

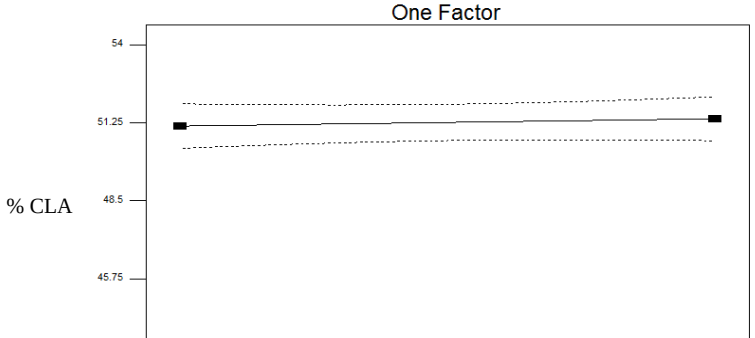
۲.۴.۳. مقدار کاتالیزور

مقدار کاتالیزور نقش بسیار مهمی را در آبگیری از MMOE و در نهایت راندمان تولید CLA دارد. همانگونه که در شکل شماره ۳ نیز قابل مشاهده است با افزایش در مقدار KOH مقدار ایزومر ۹-سیس، ۱۱- ترانس افزایش می‌یابد. به این نکته باید اشاره کرد که علی رغم قیمت ارزانتر KOH در مقایسه با DBU، نباید صرفه اقتصادی را نادیده گرفت. به علاوه افزایش مقدار کاتالیزور باعث رنگی شدن محصول می‌شود که مطلوب نمی‌باشد.



۳.۴.۳. زمان

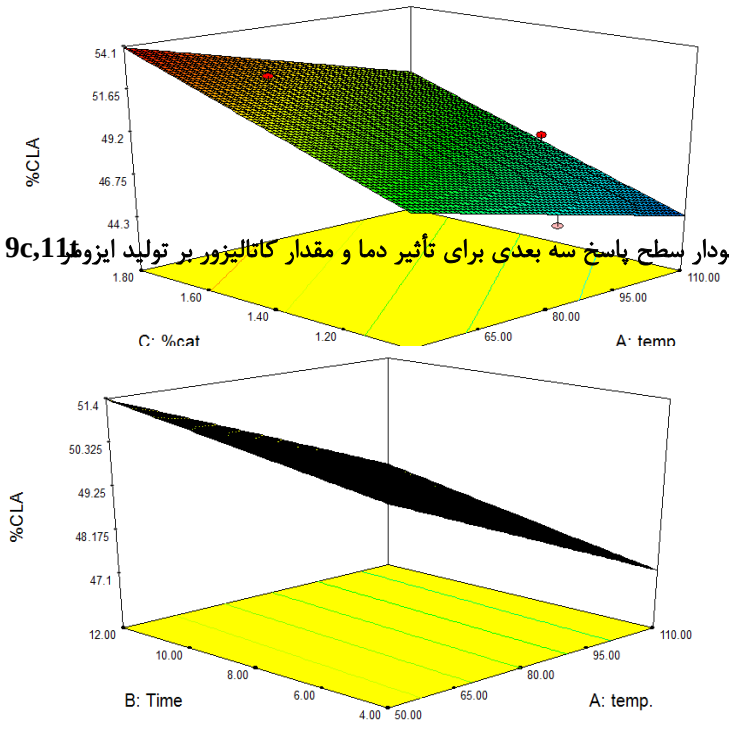
با داشتن P value بیشتر از ۰/۰۵، زمان تاثیر معنی داری بر تولید ایزومر مورد نظر ندارد. در شکل شماره ۴ مشاهده می‌شود که زمان تاثیر مثبت خطی بر تولید CLA داشته و یک افزایش جزئی در مقدار CLA با افزایش زمان قابل مشاهده است. Berdeauxa و همکاران(۱۹۹۷) اعلام کردند که پس از ۴ ساعت حرارت دهی در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد با DBU در تولوئن، مخلوطی که عمدتاً شامل ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس می‌شود حاصل شده و البته ایزومرهای دیگر به صورت سیس- سیس و سیس- ترانس نیز تولید می‌شوند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که افزایش در مدت زمان واکنش به بالای ۴ ساعت نسبت بین ایزومرهای مختلف را تغییر نمی‌دهد و فقط یک افزایش جزئی در مقدار ۹- سیس،۱۱- ترانس قابل توجه می‌باشد که در این تحقیق نیز چنین نتیجه‌ای حاصل شد.



شکل ۴ : تأثیر زمان بر تولید ایزومر9c,11t

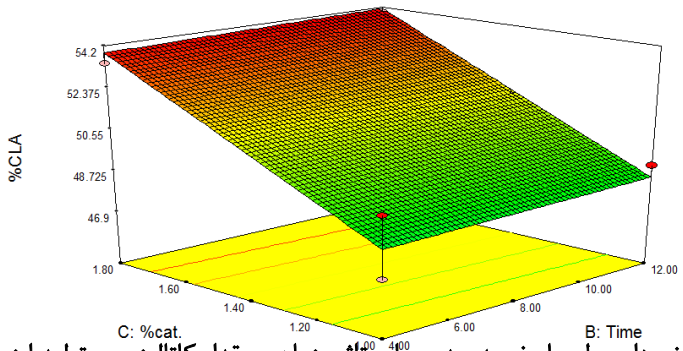
۵.۳. بهینه سازی فرایند

شرایط واکنش زمانی می‌تواند بهینه در نظر گرفته شود که ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس به حداکثر مقدار خود برسد. نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی برای هر دو پارامتر (از سه پارامتر) در شکلهای شماره ۵ تا ۷ قابل مشاهده است. بر اساس نمودار سطح پاسخ ایجاد شده برای سطح مرکزی زمان(شکل شماره ۵)، سطح مرکزی کاتالیست(شکل شماره ۶) و سطح مرکزی دما (شکل شماره ۷) مشاهده می‌شود که درصد CLA در دماهای بالاتر و مقدار کاتالیزور و زمان کمتر، کاهش می‌یابد. شرایط بهینه تعیین شده توسط مدل برای تولید CLA شامل دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، زمان ۱۱/۴۴ ساعت و مقدار کاتالیزور ۱/۸ گرم است. در نقطه بهینه حداکثر مقدار CLA پیش بینی شده ۵۴/۱۳٪ درصد می‌باشد. از طرف دیگر تحت شرایط مشابه ولی زمان ۵/۲۵ ساعت، مقدار پیش بینی شده CLA ۵۳/۹۳٪ می‌باشد که در آن میزان ایزومر مورد نظر به میزان جزئی با زمان ۱۱/۴۴ ساعت متفاوت است. همانگونه که ذکر شد زمان تاثیر اندکی بر تولید CLA دارد. بنابراین برای انجام راحت‌تر واکنش و صرفه‌جویی در زمان می‌توان این پارامتر را به طور جزئی تغییر داد به گونه‌ای که راندمان تولید CLA چندان تحت تاثیر قرار نگیرد. بنابراین در نهایت دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، زمان ۵/۲۵ ساعت و مقدار کاتالیزور ۱/۸ گرم به عنوان نقطه بهینه که درآن حداکثر میزان CLA حاصل می شود در نظر گرفته شد.



شکل ۵ : نمودار سطح پاسخ سه بعدی برای تأثیر دما و مقدار کاتالیزور بر تولید ایزومر9c,11t

شکل ۶ : نمودار سطح پاسخ سه بعدی برای تأثیر دما و زمان بر تولید ایزومر 9c,11t



شکل ۷ : نمودار سطح پاسخ سه بعدی برای تاثیر زمان و مقدار کاتالیزور بر تولید ایزومر 9c,11t

۳. نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق روش ساده‌ای برای تولید ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس از روغن کرچک به عنوان یک منبع نسبتاً ارزان و در دسترس مورد استفاده قرار گرفته است که می‌تواند برای تولید مقادیر زیاد این ایزومر جهت مطالعات بیشتر به کار رود. نتایج نشان داد که تبدیل MMOE به CLA با استفاده از KOH واکنش موثری است و بر خلاف ایزومریزاسیون قلیایی اسید لینولئیک که منجر به تولید دو ایزومر اصلی CLA با مقادیر نسبتاً برابر می‌شود در این روش روغن حاصل حاوی ایزومر ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس به عنوان ایزومر غالب (حدود ۵۴٪) است. در نهایت قابل ذکر است که با استفاده از روش خالصسازی با اوره و حذف برخی از ایزومرهای دیگر تولید شده در محیط واکنش می‌توان مقدار این ایزومر را در روغن تولیدی افزایش داد.

۴. منابع و مراجع

[1] Berdeaux, O., Christie, W. W., Gunstone, F. D. and Sebedio, J. L. Large scale synthesis of methyl cis-9, trans-11 octadecadienoate from methyl ricinoleate. JAOCS. 1997, 74 (8):1011-1015.

[2] Kim, Y. J., Lee, K. W., Lee, S., Kim, H., Lee, H. J. The production of high purity conjugated linoleic acid(CLA) using two step urea- inclusion crystallization and hydrophilic arginine- CLA complex. Journal of Food Science. 2003, 68(6): 1948- 1951.

[3] Koba, K., Belury, M. A., Sugano, M. Potential health benefits of conjugated trienoic acids. Lipid Technology. 2007, 19(9): 200- 203.

[4] Kyralan, M., Golukcu, M., Tokgoz, H. Oil and Conjugated Linolenic Acid Contents of Seeds from Important Pomegranate Cultivars (Punica granatum L.). Grown in Turkey. 2009, JAOCS. 86(10): 985- 990.

[5] Leaver, M. J., Tocher, D. R., Obach, A., Jensen, L., Henderson, R. J., Porter, A. R and Krey, G. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on lipid composition, metabolism and gene expression in Atlantic salmon (Salmo salar) tissues. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 2006, 145:258–267.

[6] Nagao, K., Yanagita, T. Conjugated Fatty Acids in Food and Their Health Benefits. Journal oF Bioscience and Bioengineering Biotechnology. 2005, 100 (2): 152–157.

[7] Ogunniy, D. S. Castor oil: A vital industrial raw material. Bioresource Technology. 2006, 97: 1086–1091.

[8] Sato, Y. Y., Watanabe, Y., Nagao, T., Negishi, S., Kobayashi, T., Shimada, Y. Production of diglycerol conjugated linoleic acid monoester by esterification with penicillium camembertii lipase. Journal of Oleo Science. 2005, 54(9): 481- 486.

[9] Villeneuve, P., Lago, R., Barouh, N., Barea, B., Piombo, G., Dupré, J. Y., Le Guillou, A. and Pina, M. Production of conjugated linoleic acid isomers by dehydration and isomerization of castor bean oil. JAOCS. 2005, 82(4): 261- 269.

[10] Yang, L., Huang, Y., Wang, H. Q., Chen, Z. Y. Production of conjugated linoleic acids through KOH- catalyzed dehydration of ricinoleic acid. Chemistry and Physics of Lipids. 2002, 119: 23-31.