

SPOSOBNOST BIOHIDROGENACIJE LINOLNE KISLINE PRI VAMPNI BAKTERIJI *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

Tadej ČEPELJNIK^{a)} in Estelle DEVILLARD^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, asist., dr., e-pošta: tadej.cepeljnik@bfro.uni-lj.si.

^{b)} Division of Gut Microbiology and Immunology, Rowett Research Institute, Aberdeen, Škotska, dr.

Delo je prispelo 22. avgusta 2006, sprejeto 20. novembra 2006.

Received August 22, 2006, accepted November 20, 2006.

IZVLEČEK

Konjugirane linolne kisline (CLA) so skupina pozicijskih in geometrijskih izomer oktadekadienojske kisline (18:2) in imajo vrsto ugodnih učinkov pri ljudeh in živalih. Glavni tvorci CLA so vampne bakterije, predvsem iz rodu *Butyrvibrio*. Vse več je raziskav, s katerimi se preiskujejo načini za povečanje vsebnosti CLA v prehranskih proizvodih živalskega izvora, kar bi lahko dosegli z uporabo primernih probiotičnih sevov bakterij. Eden izmed njih je tudi *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T. Ta sev je sposoben rasti v gojišču, kjer je prisotna linolna kislina (LA, to je prekursor CLA) vsaj do koncentracije 200 µg ml⁻¹. Pri takih pogojih se rast sicer upočasni, a bakterije še vedno ohranijo svojo aktivnost. Po 24 urah gojenja v gojišču z LA proučevani sev izvede biohidrogenacijo LA do *trans*-vaccenske kisline, ki jo tkivni encim Δ⁹-desaturaza, prisoten v tkivu živali, lahko pretvori nazaj do CLA. Z uporabo seva Mz5^T kot probiotika v prehrani živali bi tako lahko povečali kakovost končnih živil živalskega izvora.

Ključne besede: mikrobiologija / anaerobne bakterije / *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* / konjugirana linolna kislina / biohidrogenacija / vamp

CAPABILITY OF BIOHYDROGENATION OF LINOLEIC ACID IN RUMEN BACTERIUM *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

ABSTRACT

Conjugated linoleic acids (CLA) are positional and geometrical isomers of octadecadienoic acid (18:2) and have a variety of beneficial effects for the humans and animals. Main producers of CLA are rumen bacteria, mainly from the genus *Butyrvibrio*. Many researches are directed towards increasing the concentration of CLA in food products of animal origin. This could be achieved also with the application of suitable probiotic strains of bacteria. One of those is also *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T. This strain is capable to grow in the presence of linoleic acid (LA, *ie.* the CLA precursor), at least up to concentrations of 200 µg LA/ml. Under these conditions, the lag phase is prolonged, and the growth is slowed down, too. Consequently the bacteria retain their activity. After 24 hour incubation in the medium with LA, the studied strain biohydrogenates the LA to *trans*-vaccenic acid, which can be then transformed back to CLA by tissue Δ⁹-desaturase, which is present in the animal tissue. The strain Mz5^T could be used as a probiotic in animal nutrition in order to increase the quality of the food products of animal origin.

Key words: microbiology / anaerobic bacteria / *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* / conjugated linoleic acid / biohydrogenation / rumen

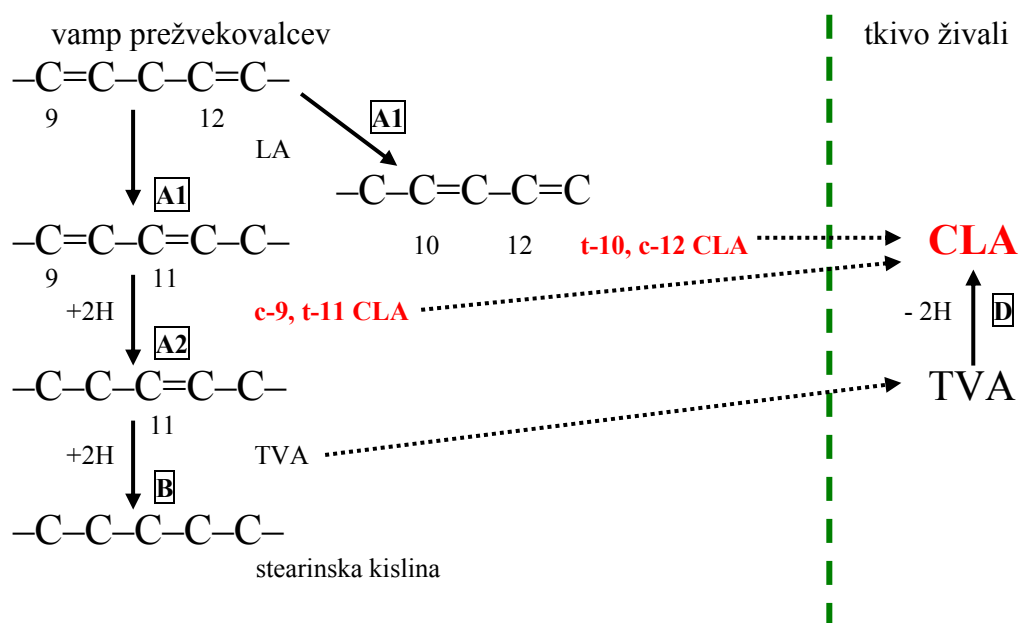
UVOD

Konjugirane linolne kisline (CLA) so skupina pozicijskih in geometrijskih izomer oktadekadienojske kisline (18:2). V mlečni maščobi je večina v *cis*-9, *trans*-11 (c-9, t-11) obliki (80–90 % skupne CLA), nekaj je *trans*-10, *cis*-12 (t-10, c-12) izomere, medtem ko se druge pojavljajo le v sledovih (Bauman in sod., 2000). Najbolj proučena je izomera c-9, t-11, ki ima dokazano antikancerogeno delovanje (preprečuje rak dojke pri modelnih podganah, ki so jo zaužile kot naravno sestavino masla; zavira rast tumorjev prostate in prebavil). Poleg tega ugodno vpliva tako na potek ateroskleroze pri modelnih živalih kot tudi na imunski sistem pri ljudeh in živalih, medtem ko je izomera t-10, c12 vključena v metabolizem maščob pri živalih in ljudeh, kjer povečuje razgradnjo lipidov in oksidacijo maščob (Bauman in sod., 2000; McGuire in McGuire, 2000; Wahle in sod., 2004). Nekatere raziskave pri izomeri t-10, c-12 nakazujejo tudi možne negativne učinke, npr. prooksidativno delovanje. Teh učinkov pri izomeri c-9, t-11 niso zaznali (Wahle in sod., 2004), zato je nujno nadaljnje proučevanje. Vsekakor koristne lastnosti CLA opravičujejo njeno širšo uporabo za izboljšanje kakovosti hrane, pa tudi zdravstvenega stanja pri ljudeh. Trenutno potekajo intenzivne raziskave, kako povečati njeno tvorbo v vampu in nadalje zdravstvenega stanja pri ljudeh (Bauman in sod., 2000; Lipgene, 2004).

Konjugirane linolne kisline najdemo le v mesu prežvekovalcev in njihovem mleku, ne pa tudi v mesu drugega izvora. To pomeni, da je za tvorbo CLA odgovorna mikroflora v vampu (Bauman in sod., 2000). Ko lipidi iz krme dospejo v vamp prežvekovalcev, jih tam prisotne mikrobnne lipaze razgradijo in sprostijo proste maščobne kisline, ki jih bakterije nadalje biohidrogenirajo. Najpogosteje je končni produkt nasičena stearinska kislina (18:0) (slika 1). V krmi prežvekovalcev (predvsem olja v semenih iz koncentrirane krme) največji delež maščobnih kislin predstavljata nenasičeni obliki: linolna (18:2, LA) in linolenska (18:3) kislina, ki se večinoma biohidrogenirata v *trans*-vaccensko (18:1, TVA) in stearinsko (18:0) kislino (Harfoot in Hazlewood, 1997). *Butyrivibrio fibrisolvens* je bila prva bakterija, za katero so ugotovili, da je sposobna biohidrogenacije LA (Kepler in sod., 1966). Kasneje so ugotovili, da so v ta proces vključene še druge vampne bakterije (Harfoot in Hazlewood, 1997). Kemp in Lander (1984) sta bakterije na osnovi poteka biohidrogenacije razdelila v dve skupini: skupina A (*Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Micrococcus*, *Borrelia*, *Eubacterium*) je lahko reducirala LA do TVA, medtem ko je skupina B (*Fusocillus*) lahko izvršila celotno biohidrogenacijo do stearinske kisline.

Prvi korak v procesu biohidrogenacije je izomerizacija LA, ki jo katalizira linoleat-izomeraza (EC 5.2.1.5; A1 v sliki 1) (Kepler in Tove, 1967). Naslednja stopnja je redukcija CLA do TVA, ki jo katalizira reduktaza (A2 v sliki 1) in je počasnejša od predhodne izomerizacije (Kim in sod., 2000). Popolne redukcije so sposobni le nekateri sevi bakterij (skupina B; B v sliki 1) (Chaudhary in sod., 2004). Popolna hidrogenacija ni zaželena, saj na ta način ne pride do kopičenja koristnih CLA v maščobah živali. CLA se sintetizira iz prekursorja (TVA) tudi v živalskem tkivu, kjer encim Δ^9 -desaturaza (D v sliki 1) oksidira TVA v CLA (Griinari in sod., 2000).

Zaželeno je povečati tvorbo bodisi CLA bodisi TVA v vampu, kar bi dosegli z različnimi načini krmljenja, npr. dodajanjem ribjih olj (Wasowska in sod., 2006), pa tudi s povečanjem števila ali aktivnosti ustreznih mikroorganizmov (Ewaschuk in sod., 2006). Tako se odpira široka možnost uporabe možnih probiotičnih sevov vampnih butirivibrijev v ta namen (Kim, 2003). Ker je tudi proučevani sev *Pseudobutyrovibrio xylanivorans* Mz5^T predstavnik teh mikroorganizmov, smo želeli preveriti, ali je sposoben tvoriti CLA, in določiti njegovo občutljivost za prekursor CLA – to je za linolno kislino.



Slika 1. Biokemijska pot biohidrogenacije linolne kisline v vampu in tvorba CLA v tkivu živali. A1 – izomeraza; A2 – reduktaza; B – reduktaza, D – Δ^9 -desaturaza; LA – linolna kislina, CLA – konjugirana linolna kislina, TVA – *trans*-vaccenska kislina. Povzeto po Bauman in sod. (2000) ter Maia in sod. (2004).

Figure 1. Biochemical pathway of linoleic acid biohydrogenation in rumen and CLA production in animal tissue. A1 – isomerase; A2 – reductase; B – reductase; D – Δ^9 -desaturase; LA – linoleic acid, CLA – conjugated linoleic acid, TVA – *trans*-vaccenic acid. Based on Bauman *et al.* (2000) and Maia *et al.* (2004).

MATERIAL IN METODE

Bakterijska kultura

Vampno bakterijo *P. xylanivorans* Mz5^T smo gojili 24 ur v anaerobnih razmerah v gojišču z vampnim sokom M2 (Hobson, 1969) z različno vsebnostjo linolne kisline (LA, *cis*-9, *cis*-12 oktadekadienojska kislina, Sigma): 0, 50, 100 ali 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gojišča. Rast smo spremljali spektrofotometrično z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 650 nm (OD_{650}). Za analizo vmesnih produktov smo gojenje ustavili pri 15 urah.

Priprava vzorca za plinsko kromatografijo

Ekstrakcija lipidov

1 ml bakterijske kulture smo dodali 1,25 ml 17 mM NaCl v 1 mM žvepleni (VI) kislini ter 100 μl 2 mg ml^{-1} C_{17:0} internega standarda v metanolu (maščobna kislina, ki jo bakterije ne sintetizirajo in jo uporabimo za zanesljivo kvantifikacijo) ter 2,5 ml metanola. Mešanico smo intenzivno stresali 1 minuto. Nato smo mešanici dodali še 2,5 ml 0,2 g l^{-1} butiriliranega hidroksi toluena v kloroformu (BHT prepreči avtooksidacijo dvojnih vezi v maščobnih kislinah) in vorteksirali nadaljnji 2 minuti. Vodno plast smo ločili s centrifugiranjem 10 min pri 2000 g. Vodo v kloroformski frakciji smo odstranili tako, da smo jo spustili skozi plast natrijevega sulfata. Kloroform smo odparili v centrifugalnem izparilniku 30–45 minut. Usedlino smo resuspendirali v 0,5 ml toluena.

Derivatizacija

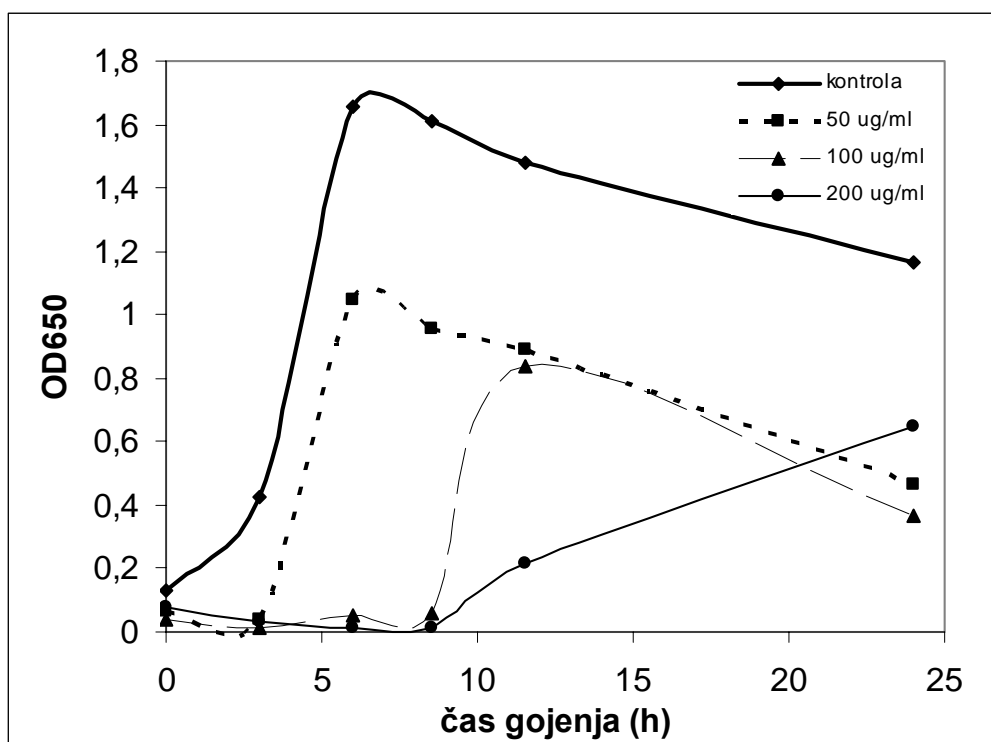
Gornjemu vzorcu smo dodali 100 μl internega standarda v izoheksanu za kontrolo derivatizacije ($\text{C}_{15:0}$, 2 mg ml^{-1}), 1 ml 1 % (v/v) žveplene (VI) kisline v metanolu (za esterifikacijo maščobnih kislin, kjer se metilna skupina zaestri na karboksilno skupino) in ga prepihali z dušikom, da smo preprečili avtooksidacijo, ter inkubirali 1 uro pri 50 °C. Nato smo dodali še 2,5 ml 5 % (m/v) NaCl v vodi, na hitro premešali in estre maščobnih kislin ekstrahirali dvakrat s po 1 ml izoheksana. Nato smo dodali 1,5 ml 2 % (m/v) kalijevega hidrogenkarbonata v vodi, zmešali in gornjo fazo prenesli v novo epruveto ter izoheksan odparili v evaporatorju (~ 1 h). Usedlino smo resuspendirali v 200 μl 0,2 g l^{-1} BHT v izoheksanu, premešali in pripravili za nanos na plinski kromatograf.

Plinska kromatografija

Estre maščobnih kislin smo ločevali na kapilarni koloni (30 m \times 0,25 mm, Supelco) z nosilnim plinom helijem, temperaturami injektorja in detektorja 275 °C in temperaturnim programom 3 min pri 180 °C, nato v 15 min do 220 °C.

REZULTATI

Pri proučevanem sevu *P. xylanivorans* Mz5^T smo preverili, če in do katere stopnje je sposoben biohidrogenirati linolno kislino (LA). Želeli smo uporabiti čim večje koncentracije LA, da bi lažje zaznali končne produkte tega procesa. Zato smo najprej proučili, kako vpliva koncentracija LA na rast izbrane vampne bakterije.



Slika 2. Vpliv povečevanja koncentracije linolne kisline na rast *P. xylanivorans* Mz5^T.

Figure 2. Influence of increasing concentration of linoleic acid on growth of *P. xylanivorans* Mz5^T.

V gojišču M2 brez dodatka LA (kontrola) so se bakterije seva Mz5^T takoj začele namnoževati, skoraj brez zaznavne lag faze (slika 2). Če smo bakterije gojili v gojišču z LA, pa se je občutno povečal čas prilagajanja (lag faza) – pri 50 µg ml⁻¹ na 3 ure, pri 100 in 200 µg ml⁻¹ pa na več kot 8 ur (slika 2). V zadnjem primeru (koncentracija LA 200 µg ml⁻¹) je bila tudi nadaljnja rast občutno počasnejša, kot smo razbrali iz strmine rastne krivulje (slika 2).

Po 24 urah gojenja v gojišču M2 z 200 µg ml⁻¹ LA smo analizirali prisotnost različnih dolgoveriznih maščobnih kislin, ki so bile posledica biohidrogenacije. Ugotovili smo, da so bakterije vso LA reducirale do *trans*-11 vakkenske kisline (TVA), ostale izomere TVA ter CLA smo zaznali le v sledovih. Če smo gojenje ustavili pri 15 urah (na sredini eksponentne faze rasti pri gojišču z 200 µg ml⁻¹ LA, slika 2), smo lahko zaznali še nekaj izomere c-9, t-11 CLA, ki je v teh razmerah le vmesni produkt biohidrogenacije pri sevu Mz5^T (preglednica 1).

Preglednica 1. Koncentracije (µg ml⁻¹) produktov biohidrogenacije linolne kisline pri sevu *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T
 Table 1. Concentration (µg ml⁻¹) of linoleic acid biohydrogenation products for the strain *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

		Kontrola / control	15 h	24 h
18:2	LA	205,8	2,1	0
18:2	CLA (c-9,t-11)	0	32,7	0
	CLA (t-9,c11)	0	3,8	1,8
	CLA (t-10,c12)	0	0	0
18:1	TVA (t-11)	0	139,6	133,3
	TVA (c-9)	0	1,8	1,8
	TVA (c-11)	0	3,7	3,1
18:0	stearinska kislina / stearic acid	0	0	0

Kontrola je neinokulirano gojišče, ostala dva stolpca pa predstavljata vzorce po 15 oz. 24 urah gojenja; LA – linolna kislina; CLA – konjugirana linolna kislina; TVA – *trans*-vakkenska kislina;
 The control is non-inoculated medium, the other two columns represent samples after 15 or 24-h incubation, respectively; LA – linoleic acid; CLA – conjugated linoleic acid; TVA – *trans*-vaccenic acid;

RAZPRAVA IN SKLEPI

Proučevani sev *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T ima več zanimivih lastnosti, ki ga uvrščajo med kandidatne probiotike za uporabo v prehrani živali (Čepeljnik in sod., 2003). Ena izmed teh je tudi sposobnost tvorbe konjugirane linolne kisline (CLA) in *trans*-vakkenske kisline (TVA) med biohidrogenacijo linolne kisline (LA).

LA je za butirivibrije, ki imajo tanko celično steno (Cheng in Costerton, 1977), toksična in jo butirivibriji na ta način »nevtralizirajo« (Maia in sod., 2004). Butirivibriji spadajo v skupino A in ne biohidrogenirajo LA do stearinske kisline (Harfoot in Hazlewood, 1997). Le nekateri novejši izolati, katerih uvrstitev v rod butirivibrijev še ni dokončna, spadajo v skupino B. Ti LA popolnoma reducirajo (McKain in sod., 2004). Za nekatere predstavnike so ugotovili, da prisotnost LA v gojišču zavira rast – npr. pri *Butyrvibrio hungatei* (prej *B. fibrisolvens*) A38 so to opazili že pri majhnih koncentracijah LA (15 µg ml⁻¹). Če so LA dodali, ko so celice že bile v eksponentni fazi rasti, so tolerirale 10-krat večje koncentracije (Kim in sod., 2000). V naših raziskavah smo ugotovili, da prisotnost LA v gojišču pri sevu Mz5^T sicer podaljša fazo

prilaganja, vendar tudi najvišja uporabljena koncentracija LA ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) ne zavre rasti (slika 2). Podobno velja tudi za večino drugih predstavnikov rodu *Pseudobutyrvibrio* (McKain in sod., 2004). Končni produkt biohidrogenacije pri Mz5^T je bila TVA (Preglednica 1), ki se prenese skozi stene vampa in jo encim Δ^9 -desaturaza, prisoten v tkivu živali, lahko pretvori nazaj do CLA (Griinari in sod., 2000). Ugotovili so, da je kar 78–93 % CLA v mleku posledica tega procesa (Piperova in sod., 2002). Različne izomere CLA imajo vrsto ugodnih učinkov in jih najdemo predvsem v proizvodih, ki izvirajo iz prežvekovalcev (Bauman in sod., 2000). Koncentracija CLA in njena stabilnost pa sta se ohranili tudi v nadaljnjih tehnoloških postopkih pridelave masla ali sira (Ryhänen in sod., 2005). Več različnih sevov butirivibrijev so že uporabili, da so povečali koncentracijo TVA pri prežvekovalcih (Fukuda in sod., 2006a) kot tudi kopičenje CLA pri miših (Fukuda in sod., 2006b). Fukuda in sod. (2006b) predlagajo, da bi sev *B. fibrisolvans* MDT-5 lahko uporabili kot probiotik za družne živali, predvsem pse in mačke, morda tudi pri prehrani perutnine in prašičev. Tako bi lahko vsebnost CLA povečali (ali sprožili njeno tvorbo pri neprežvekovalcih) tudi z uporabo probiotikov iz skupine butirivibrijev (Fukuda in sod., 2006a in 2006b), med katerimi je vsestransko zanimiv kandidat tudi proučevani sev *P. xylanivorans* Mz5^T.

VIRI

- Bauman, D.E./ Baumgard, L.H./ Corl, B.A./ Griinari, J.M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. V: Proceedings of the American Society of Animal Science. Indianapolis, 2000, 8 str.
<http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf> (5. avg. 2006), 15 str.
- Chaudhary, L.C./ McKain, N./ Richardson, A.J./ Barbier, M./ Charbonnier, J./ Wallace, R.J. Screening for *Fusocillus*: factors that affect the detection of ruminal bacteria which form stearic acid from linoleic acid. Reproduction Nutrition Development, 44(2004)Suppl. 1, S65.
- Cheng, K.J./ Costerton, J.W. Ultrastructure of *Butyrvibrio fibrisolvans*: a Gram-positive bacterium? Journal of Bacteriology, 129(1977)3, 1506–1512.
- Čepeljnik, T./ Zorec, M./ Kostanjšek, R./ Nekrep, F.V./ Marinšek-Logar, R. Is *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T suitable as a probiotic? An *in vitro* study. Folia Microbiologica, 48(2003)3, 339–345.
- Ewaschuk, J.B./ Walker, J.W./ Diaz, H./ Madsen, K.L. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs *in vitro* and *in vivo* in mice. Journal of Nutrition, 136(2006), 1483–1487.
- Fukuda, S./ Suzuki, Y./ Murai, M./ Asanuma N./ Hino, T. Augmentation of vaccenate production and suppression of vaccenate biohydrogenation in cultures of mixed ruminal microbes. Journal of Dairy Science 89(2006a), 1043–1051.
- Fukuda, S./ Suzuki, Y./ Murai, M./ Asanuma, N./ Hino, T. Isolation of a novel strain of *Butyrvibrio fibrisolvans* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. Journal of Applied Microbiology, 100(2006b), 787–794.
- Griinari, J.M./ Corl, B.A./ Lacy, S.H./ Chouinard, P.Y./ Nurmela, K.V.V./ Bauman, D.E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. Journal of Nutrition, 130(2000), 2285–2291.
- Harfoot, C.G./ Hazlewood, G.P. Lipid metabolism in the rumen. V: The rumen microbial ecosystem (Eds.: Hobson, P.N./ Stewart, C.S.). London, Thomas Science, 1997, 382–426.
- Hobson P.N. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. Vol 3B. (Eds.: Norris J.R./ Ribbons, D.W.). New York, Academic Press, 1969, 133–149.
- Lipgene, The Rowett Research Institute. 2004. Dublin, Trinity College Dublin (24. maj 2004)
<http://www.lipgene.tcd.ie/consortium/rri.php> (14. avg. 2006).
- Kemp, P./ Lander, D.J. Hydrogenation *in vivo* of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. Journal of General Microbiology, 130(1984), 527–533.
- Kim, Y.J./ Liu, R.H./ Bond, D.R./ Russell, J.B. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrvibrio fibrisolvans*. Applied and Environmental Microbiology, 66(2000), 5226–5230.
- Kim, Y.J. Partial inhibition of biohydrogenation of linoleic acid can increase the conjugated linoleic acid production of *Butyrvibrio fibrisolvans* A38. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(2003), 4258–4262.
- Kepler, C.R./ Hiron, K.P./ McNeill, J.J./ Tove, S.B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrvibrio fibrisolvans*. The Journal of Biological Chemistry, 241(1966)6, 1350–1354.
- Kepler, C.R./ Tove, S.B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12} -*cis*, Δ^{11} -*trans*-isomerase from *Butyrvibrio fibrisolvans*. The Journal of Biological Chemistry, 242(1967)24, 5686–5692.

- Maia, M./ Ribeiro, J.M.C.R./ Wallace, R.J. Conjugated linoleic acids are formed in a detoxification mechanism which protects *Butyrvibrio fibrisolvens* from the effects of polyunsaturated fatty acids. *Reproduction Nutrition Development*, 44(2004)Suppl. 1, S59.
- McGuire, M.A./ McGuire, M.K. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. V: *Proceedings of the American Society of Animal Science*. Indianapolis, 2000, 8 str.
<http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0938.pdf> (15. avg. 2006).
- McKain, N./ Chaudhary, L.C./ Walker, N.D./ Pizette, F./ Koppova, I./ McEwan, N.R./ Kopečný, J./ Vercoe, P.E./ Wallace, J. Relation between phylogenetic position and fatty acid metabolism of different *Butyrvibrio* isolates from the rumen. *Reproduction Nutrition Development*, 44(2004)Suppl. 1, S64.
- Piperova, L.S./ Sampugna, J./ Teter, B.B./ Kalscheur, K.F./ Yurawecz, M.P./ Ku, Y./ Morehouse, K.M./ Erdman, R.A. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, 132(2002), 1235–1241.
- Ryhänen, E.-L./ Tallavaara, K./ Griinari, J.M./ Jaakkola, S./ Mantere-Alhonen, S./ Shingfield, K.J. Production of conjugated linoleic acid enriched milk and dairy products from cows receiving grass silage supplement with a cereal-based concentrate containing rapeseed oil. *International Dairy Journal*, 15(2005), 207–217.
- Wahle, K.W.J./ Heys, S.D./ Rotondo, D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Progress in Lipid Research*, 43(2004), 553–587.
- Wasowska, I./ Maia, M.R.G./ Niedzwiedzka, K.M./ Czauderna, M./ Ribeiro, J.M.C.R./ Devillard, E./ Shingfield, K.J./ Wallace, R.J. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition*, 95(2006), 1199–1211.