

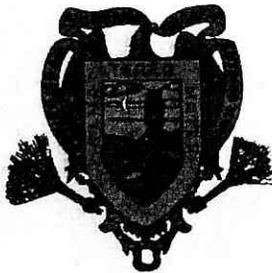
# **INTERACCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO**

**PATRICIA RAMÍREZ BACA**

**TESIS**

**Presentada como requisito parcial para  
obtener el grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

Subdirección de Posgrado

Torreón, Coahuila, México.

Abril de 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**

**INTERACCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS PARA LA  
PRODUCCION DE ÁCIDO LINOLÉICO  
CONJUGADO**

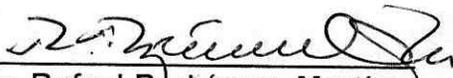
**POR**

**PATRICIA RAMÍREZ BACA**

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría  
y aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

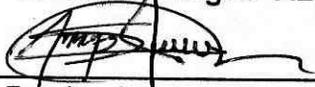
Asesor principal \_\_\_\_\_

  
Dr. Rafael Rodríguez Martínez

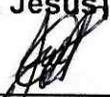
Asesor: \_\_\_\_\_

  
Dr. Raúl Villegas Vizcaino

Asesor: \_\_\_\_\_

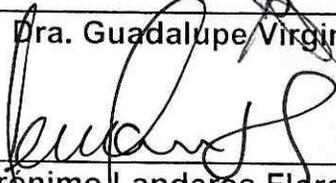
  
Dr. Jesús Vásquez Arroyo

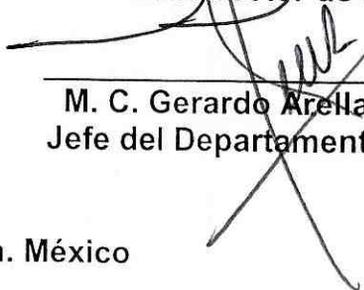
Asesor: \_\_\_\_\_

  
Dr. Joel López Pérez

Asesor: \_\_\_\_\_

  
Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón

  
Dr. Jerónimo Landeros Flores  
Subdirector de Posgrado

  
M. C. Gerardo Arellano Rodríguez  
Jefe del Departamento de Posgrado

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

**INTERACCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS  
PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO  
LINOLÉICO CONJUGADO**

POR

PATRICIA RAMÍREZ BACA

Elaborado bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría  
y aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Asesor

  
Dr. Rafael Rodríguez Martínez

## AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo se debe en gran parte al apoyo proporcionado por Fundación Produce, Durango, A. C., sin el cual hubiera sido muy difícil de realizar ya que el montaje de la técnica, material y reactivos para la determinación del Ácido Linoléico Conjugado es costosa y compleja.

Un reconocimiento especial a las H. Autoridades de Universidad Juárez del Estado de Durango, el C. P. Rubén Calderón Luján, Rector de la UJED así como a la M. E. María de Jesús Cedillo Gómez, Directora de la Facultad de Ciencias Químicas por el apoyo siempre incondicional para el desarrollo de este proyecto.

A las Autoridades de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por el apoyo proporcionado para la continuación del programa.

A mis asesores del programa del Posgrado en Ciencias Agropecuarias, Dr. Rafael Rodríguez Martínez y al Dr. Miguel Arenas Vargas, por su tiempo, paciencia y dedicación para mi formación durante estos años.

A mis compañeros del Posgrado por sus lecturas, críticas y consejos para el mejoramiento de todos los manuscritos presentados

Al Ing. Concepción Reyes Alvarado laboratorista de la FCQ-UJED por soporte técnico para el análisis cromatográfico en el HPLC.

# DEDICATORIA

## **A mi familia y amigos**

Por el apoyo y paciencia brindados durante todo este tiempo.

## **Especialmente a mis padres**

Antonio y Bertha

## PREFACIO

**El camino te desafía y es un misterio pero, al mismo tiempo que te hace preguntas, también te brinda respuestas. Presta atención porque durante el trayecto adquieres experiencia y descubres horizontes desconocidos, además de plantearte nuevos interrogantes.**

**Inédito**

La principal función de la dieta es aportar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas, sin embargo, día a día incrementan el número pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que ciertos alimentos, o algunos de sus componentes, tienen efectos benéficos a la salud, gracias al aporte de los nutrientes básicos.

La ciencia de la nutrición ha evolucionado desde un concepto inicial de "nutrición adecuada" hasta uno de "nutrición óptima" desarrollando nuevos alimentos capaces de mejorar las condiciones físicas, así como también reducir el riesgo de contraer ciertas enfermedades, lo que ha ocasionado que recientemente, las investigaciones se hayan centrado más hacia la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos.

El interés que despierta en los consumidores la relación entre la dieta y la salud, aumenta la demanda de información sobre los alimentos funcionales. Los rápidos adelantos en la ciencia y la tecnología de alimentos, el aumento en los costos de los servicios de salud, los cambios en la legislación sobre el etiquetado de alimentos, una población que envejece y el aumento en el interés por lograr el bienestar a través de la

dieta, son algunos de los factores que motivan a la industria de los alimentos y a los investigadores para informar sobre los alimentos funcionales y existen innumerables investigaciones científicas confiables que indican que los componentes de los alimentos están relacionados con los beneficios potenciales para la salud.

De un tiempo a esta parte, las leches fermentadas se vienen presentando al público como productos especialmente saludables, por considerárseles como vehículos para el transporte de los probióticos hacia los consumidores. Sin embargo, en absoluto se trata de algo novedoso o sorprendente porque esta característica es bien conocida en el mundo científico. Los microorganismos responsables de estos derivados lácteos constituyen la base para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales. A estos productos se les denomina alimentos probióticos, definiendo como probiótico a "aquellos microorganismos vivos que se ingieren como suplemento alimenticio y que tienen efectos positivos para los consumidores al actuar sobre la microbiota intestinal".

Dentro de los componentes funcionales, el ácido linoléico conjugado se ha estudiado extensamente en Estados Unidos, Francia, Japón, Italia y Noruega, generando más incógnitas sobre el mismo, especialmente, en lo que se refiere a los mecanismos por los cuales promueve la salud. Esta notoriedad e incremento en la información científica sobre los beneficios del CLA no debe ser menospreciada por los nutriólogos, ya que el CLA es un protector de la salud humana que se encuentra naturalmente en los alimentos de origen animal (ruminantes) y no

es una entidad química pura, sino que es una mezcla de isómeros de 18 carbonos con dos insaturaciones dobles. Por esto mismo, y dado que la viabilidad de la industria láctea depende de la producción de productos que hagan frente a las demandas del consumidor, es importante realizar estudios en donde se incremente el contenido del CLA.

Debido a lo expuesto anteriormente, el propósito de este trabajo fue contribuir a la formación de este compuesto en el procesamiento de productos fermentados derivados de la leche a través del uso de bacterias lácticas a las que se les atribuyen propiedades probióticas.

Se puede decir que el interés por el CLA, parte de la búsqueda de la información científica en bases de datos como el Current Contents, con el uso del Endnote, Ebsco Host y/o Pubmed. Durante esta búsqueda, llamó la atención el gran número de artículos, revisiones, comunicaciones cortas o notas técnicas con respecto al CLA, ya sea en el área de la manipulación de las dietas de los animales, en el área de la salud (describiendo los múltiples beneficios que se le atribuyen e intentando explicar sus posibles mecanismos de acción) o bien en el área de la tecnología de los alimentos (cambios durante el procesamiento, enriquecimiento, evaluaciones sensoriales, etc.).

Este proyecto empieza a gestarse con el acopio de la información a través de internet abierto, solicitud de la misma a los autores via email, solicitud de información con conocidos en universidades del extranjero, suscripciones a revistas por parte de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Universidad Autónoma de Chihuahua, suscripción personal

(como estudiante al J. Dairy Science) entre otros. Conforme se va recolectando y leyendo la información, se van elaborando ensayos bajo diferentes temas relacionados con el CLA con el objeto de adentrarse al tema, lo que da origen al planteamiento de proyecto.

Con toda esta información, se advierte la dificultad para el análisis de ácidos grasos, aunque se tiene la facilidad de contar con el equipo recién adquirido por la Facultad de Ciencias Químicas-UJED, el proceso es laborioso y costoso, por lo cual se solicita apoyo financiero a Fundación Produce, Durango, A. C.

La realización de del proyecto fue complicada tanto por lograr el dominio de las técnicas para la cromatografía (HPLC), preparación de la muestra y las técnicas para diferenciar las bacterias lácticas, por ser organismos difíciles de diferenciar ya que crecen en forma muy similar en los diferentes medios de cultivo, así como por el estilo de este nuevo modelo educativo, mismo, que si bien favorece la formación integral del individuo, porque no se siguen las instrucciones específicas de un asesor, sino que el propio estudiante es el encargado de establecer el problema, gestionar la información, definir las variables y gestionar el apoyo, existen muchos momentos en los cuales como estudiante no se sabe que decisión tomar. A pesar de todo esto, estoy plenamente convencida de las bondades del modelo en relación a la formación de uno como profesional, aunque es necesario ser responsable del avance de los estudios y presentación de productos escritos.

Este trabajo está estructurado como una tesis en el modelo de artículos científicos, para lo cual se están presentando dos artículos que actualmente se encuentran en revisión para su evaluación por la Revista Journal of Dairy Science y Agraria Nueva Época. Además se incluye un capítulo con resultados complementarios a los que aparecen en los dos artículos seguida de una Discusión general, literatura citada en la sección de la Discusión y el apéndice.

El primer documento muestra los resultados obtenidos de la producción de CLA por el *L. acidophilus* en cultivo mixto con las bacterias del yogurt. El segundo artículo define y describe la diferenciación de las bacterias lácticas utilizadas en el estudio en varios medios de cultivo

Asimismo, como parte del apéndice, se muestran los oficios de recepción de artículos en dos revistas y un artículo ya publicado sobre la importancia del CLA en la dieta del humano. Cabe hacer mención, que todavía existe la posibilidad de escribir otros artículos con los datos que todavía no se han utilizado en estas publicaciones.

# COMPENDIO

## Asociación de las bacterias lácticas para la producción de ácido linoléico conjugado

POR

PATRICIA RAMÍREZ BACA

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Doctorado en Ciencias Agropecuarias

Torreón, Coah. 2006

*...que tu alimento sea tu única medicina*  
*Hipócrates*

El CLA es una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoléico con dos dobles ligaduras separadas por una sencilla. Su isómero más activo y de importancia biológica es el *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoico, denominado también "ácido ruminal". Se le atribuyen beneficios nutricionales demostrados *in vitro* y en modelos animales que incluyen propiedades como agente antiateroesclerótico, anticarcinógeno, modulador del sistema inmune, agente antidiabético, que auxilia en la mineralización del hueso, y como promotor de la formación de masa corporal magra. También existen reportes de que actúa como un agente

antimicrobiano y de que se le atribuye una importante actividad en la disminución del colesterol además de favorecer el crecimiento. La concentración de CLA en los productos lácteos es una función directa de su concentración en la leche cruda, la que puede variar ampliamente ante manipulaciones precisas de la dieta de la vaca. Además, se han realizado enormes esfuerzos para evaluar el contenido de CLA en los diferentes productos lácteos y lograr determinar las causas de su variabilidad, demostrándose que la oxidación está involucrada en la producción de CLA durante la manufactura de diversos productos. El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto de las interacciones del *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* sobre la producción de CLA, ácido láctico y viabilidad de las bacterias. Se realizaron inoculaciones en leche entera reconstituída con bacterias *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* como cultivo sencillo y en sus asociaciones. Se determinó ácido linoléico conjugado por cromatografía de líquidos, contenido de ácido láctico por titulación con NaOH y viabilidad de las bacterias involucradas en los tratamientos a diferentes tiempos de incubación (0, 3, 6 y 9 h) por inoculación en tres diferentes medios de cultivo. Los resultados mostraron una diferencia significativa con respecto a la producción de ácido láctico durante las asociaciones, con mayores valores en la asociación del *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y la asociación de las bacterias del yogurt. Con respecto a la producción de CLA, los tratamientos asociados con *L. acidophilus* fueron los que tuvieron mayor contenido de CLA, y la viabilidad de las bacterias es mayor en el *S. thermophilus* y

menor en el *L. acidophilus*. Este trabajo presenta dos publicaciones que se encuentran en revisión en el Journal of Dairy Science y en la Revista Agraria Nueva Época. La primera es un estudio sobre la interacción del *L. acidophilus* con las bacterias del yogurt para producción de CLA y el segundo es otro estudio sobre la diferenciación y morfología de la bacterias lácticas en diferentes medios de cultivo.

**Palabras clave:** Ácido linoléico conjugado, bacterias lácticas, cultivos mixtos, *S thermophilus*, *L bulgaricus*, *L acidophilus*

# ABSTRACT

## Lactic acid bacteria in Conjugated Linoleic Acid Production

BY

PATRICIA RAMÍREZ BACA

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”  
UNIDAD LAGUNA

Torreón, Coah. 2006

*Let the food be thy medicine...  
Hippocrates*

CLA is a mixture of positional and geometrical isomers of linoleic acid with two double bonds separated by a single one. The most active and of great biological importance is the *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoic acid, also named “ruminal acid”. CLA has some nutritional benefits that have been demonstrated *in vitro* using animal models. CLA has properties as an antisclerosis and anti-carcinogenic agent, besides, it can be considered as a modulator to the immune system and an anti-diabetes agent; it contributes to bones’ mineralization and enhances the production of lean body mass. Some reports assume that CLA acts as an antimicrobial agent, plays an important role in the anti-cholesterol activity and facilitates

the body's growing up. In dairy products, CLA content is directly proportional to the concentration of CLA in raw milk, and it may widely vary because of the animal's diet manipulation. Besides, there are reports of great efforts to evaluate the CLA content in different dairy products so the variation causes can be determined, and some studies report that during the manufacture of dairy products, oxidation is involved in CLA production. The objective of this work was to evaluate the effect of mixed cultures of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. acidophilus* and their interactions in CLA production, lactic acid production and bacteria viability after incubation. Incubations in whole reconstituted milk were elaborated with *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* as simple cultures and as mixed cultures. Amounts of conjugated linoleic acid produced were determined by high performance liquid chromatography, lactic acid content titrating with NaOH and viability of each one of the bacteria involved in the treatments at different incubation times (0, 3, 6 y 9 h) inoculating with three different agars. Results showed a significant difference in the lactic acid production due to microorganism and incubation time. The associations *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. acidophilus* as well as the yogurt bacteria association produced a greater amount of lactic acid. CLA production was higher in treatments involving *L. acidophilus*, which were the treatments that produced more CLA and the viability of bacteria was greater in *S. thermophilus* and grew lower in *L. acidophilus* cultures. This work presents two publications that were sent to the Revista Agraria Nueva Época and the Journal of Dairy Science for their

evaluation. The first one is about the differentiation and morphology of lactic acid bacteria in different culture media, and the second one is about the interaction of *L. acidophilus* and yogurt bacteria in mixed cultures in which CLA production was measured.

**Keywords:** Conjugated linoleic acid (CLA), lactic acid bacteria, mixed cultures, *S thermophilus*, *L bulgaricus*, *L acidophilus*

# Índice de Contenido

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>V</b>
<b>PREFACIO</b> .....	<b>VI</b>
<b>COMPENDIO</b> .....	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	<b>XVII</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XX</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
<b>EL CLA Y EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA</b> .....	<b>4</b>
<i>Nomenclatura del CLA</i> .....	<b>6</b>
<i>Isómeros</i> .....	<b>7</b>
<i>Propiedades Terapéuticas</i> .....	<b>9</b>
<i>El CLA y el cáncer</i> .....	<b>12</b>
<i>El CLA y la modulación del Sistema Inmune</i> .....	<b>14</b>
<i>El CLA y la composición corporal</i> .....	<b>15</b>
<i>El CLA y la capacidad antioxidante</i> .....	<b>17</b>
<b>CONTENIDO DE CLA EN ALIMENTOS</b> .....	<b>19</b>
<i>En grasa butírica</i> .....	<b>20</b>
<i>En grasa de leche de oveja y de cabra</i> .....	<b>20</b>
<i>En carne y productos derivados de la carne</i> .....	<b>21</b>
<i>CLA en derivados lácteos</i> .....	<b>22</b>
<i>CLA en aceites vegetales</i> .....	<b>23</b>
<i>CLA en fórmulas infantiles, leche materna y alimentos para bebé</i> .....	<b>24</b>
<b>CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO</b> .....	<b>25</b>
<i>CLA y tipo de dieta</i> .....	<b>25</b>
<i>Tipo de procesamiento</i> .....	<b>26</b>
<i>Enriquecimiento de productos lácteos con CLA</i> .....	<b>28</b>
<b>BIOHIDROGENACIÓN DEL ÁCIDO LINOLÉICO EN EL RUMEN</b> .....	<b>30</b>
<b>SUPLEMENTOS COMERCIALES Y SÍNTESIS QUÍMICA DE CLA</b> .....	<b>34</b>
<b>MICROORGANISMOS LÁCTICOS EN LA PRODUCCIÓN DE CLA</b> .....	<b>36</b>
<i>Proceso de Fermentación</i> .....	<b>37</b>
<i>Bacterias lácticas</i> .....	<b>39</b>
<i>La acidez en leches fermentadas</i> .....	<b>45</b>
<i>Bacterias productoras de CLA</i> .....	<b>47</b>
<i>Streptococcus salivarius spp thermophilus</i> .....	<b>50</b>
<i>Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus</i> .....	<b>51</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	<b>52</b>
<i>Interacción entre bacterias lácticas y próbióticas</i> .....	<b>53</b>
<b>ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO</b> .....	<b>55</b>
<i>Origen de la cromatografía</i> .....	<b>56</b>
<i>Cromatografía de Gases</i> .....	<b>57</b>
<i>Cromatografía de líquidos de alta presión</i> .....	<b>59</b>
<b>PROSPECTIVAS</b> .....	<b>60</b>
<b>LITERATURA CITADA GENERAL</b> .....	<b>63</b>

<b>ARTÍCULOS EN REVISIÓN.....</b>	<b>83</b>
<b>PRODUCTION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID AND LACTIC ACID BY A MIXED CULTURE OF <i>L. ACIDOPHILUS</i> AND YOGURT BACTERIA .....</b>	<b>84</b>
<i>Artículo 1. Enviado a la Revista Journal of Dairy Science .....</i>	<i>84</i>
<b>MORFOLOGÍA Y DIFERENCIACIÓN DE COLONIAS DE TRES TIPOS DE BACTERIAS LÁCTICAS.....</b>	<b>108</b>
<i>Artículo 2. Enviado a la Revista Agraria Nueva Época.....</i>	<i>108</i>
<b>RESULTADOS COMPLEMENTARIOS EN EL ESTUDIO .....</b>	<b>125</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>128</b>
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA).....	128
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO .....	130
VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS.....	133
<b>LITERATURA CITADA EN LA SECCIÓN DE DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>136</b>
<b>APÉNDICE I.....</b>	<b>140</b>
OFICIOS DE RECEPCIÓN DE LAS PUBLICACIONES A LAS REVISTAS .....	140
<b>APÉNDICE II.....</b>	<b>144</b>
EL ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO Y SU IMPORTANCIA EN LA DIETA. ....	144
<i>Artículo 3. Publicado en Revista AGROFAZ.....</i>	<i>144</i>

## ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Contenido de ácido linoléico conjugado en mg/g de muestra en leches fermentadas con diferentes tipos de bacterias y diferentes tiempos de incubación (h). ..... 125
- Cuadro 2.** Resultados promedio del porcentaje de ácido láctico en leches fermentadas con diferentes tipos de bacterias y diferentes tiempos de incubación (h). ..... 126
- Cuadro 3.** Viabilidad de bacterias (UFC/ml) en leches fermentadas con diferentes tipos de bacterias y diferentes tiempos de incubación (h) 127

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura del ácido linoléico, ácido linoléico conjugado *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis* 12. Adaptada de: Pariza *et al.*, 2001..... 7
- Figura 2.** Estructura del ácido linoléico y dos isómeros del ácido linoléico conjugado. Adaptada de: Lawson, 2001..... 8
- Figura 3.** Contenido de ácido linoléico conjugado en distintos productos lácteos. Adaptada de: Lawson, 2001 .....23
- Figura 4.** Contenido de CLA en leche materna en diferentes regiones. Adaptada de: Reaney *et al.*, 1999.....25
- Figura 5.** Reacción de biohidrogenación del ácido linoléico y ácidos  $\alpha$  linoléicos a estearico por el rumen. Adaptada de: Griinari y Barman, 1999 .....32
- Figura 6.** Metabolismo de los lípidos en el rumen y los orígenes del ácido linoléico conjugado en productos de origen animal. Adaptada de: Tanaka, 2005.....34
- Figura 7.** Perfil cromatográfico de CG de CLA-FAME obtenido utilizando detector de ionización de flama. Fuente: Kramer *et al.*, 2004.....58
- Figura 8.** Separación de isómeros de CLA del mismo producto utilizando en la gráfica anterior por HPLC. Fuente: Kramer *et al.*, 2004 ..... 60

## Introducción

El ácido linoléico conjugado (CLA por sus siglas en inglés) es una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del AL (ácido linoléico por sus siglas en inglés) ( $\Omega$ -6 ácido linoléico *cis*-9, *cis*-12, octadecadienoico) que contienen un sistema de doble ligadura (Parodi, 1999; Bauman *et al.*, 2000; Beaulieu *et al.*, 2002; Belury, 2002; Calder, 2002; Yu *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Coakley *et al.*, 2003; Tricon *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005).

El CLA es un ácido graso de cadena larga poliinsaturada con numerosas propiedades benéficas en la salud y un componente natural de productos alimenticios derivados de la leche de rumiantes, que ha ocasionado un incremento en la atención de los investigadores, al considerársele como una grasa biológicamente funcional (Peterson *et al.*, 2002; Nagao y Yanagita, 2005; Ogawa *et al.*, 2005). En la actualidad al CLA se le considera un regulador metabólico, con efectos hipocolesterolémicos, antiaterogénicos, anticancerígenos y antioxidantes entre otros (Pariza *et al.*, 2001; Aydin, 2005), cuya fuente principal en la dieta humana son la carne y derivados lácteos provenientes de animales rumiantes (Aydin, 2005).

Es bien conocido que los alimentos de origen animal son altos en ácidos grasos saturados (SFA por sus siglas en inglés) y poca cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA por sus siglas en inglés), lo que ha contribuido a que se les asocie con un incremento de la lipoproteína de

baja densidad en plasma (LDL por sus siglas en inglés), un alto nivel de colesterol y por lo tanto riesgo de enfermedades coronarias. Afortunadamente, en años recientes se ha observado que los alimentos derivados de los rumiantes son la fuente natural más rica en CLA, particularmente *cis-9, trans-11* (Tanaka, 2005).

La demanda de los consumidores por productos de mejor calidad ha renovado el interés por modificar la composición de ácidos grasos (FA por sus siglas en inglés) en productos lácteos, lo cual puede ser benéfico para la salud pública al incrementar la concentración de CLA en leche o sus derivados y aumentar el consumo de este tipo de alimentos.

Al visualizar el futuro potencial de los productos lácteos en el mercado de los alimentos funcionales, se pudiera pensar que la tendencia al uso de alimentos probióticos ha abierto una nueva área que busca su consolidación al combinar la alimentación con las propuestas de salud y crear un aproximación holística para proveer de un sistema alimentario que mejore la salud y el mantenimiento de estilos de vida activos (Hilliam, 2003).

Dentro de este grupo de alimentos, un factor importante es la fabricación de productos que incluyan microorganismos viables a los cuales se les ha atribuido un efecto terapéutico, principalmente en productos tales como las leches fermentadas. Por este motivo, es importante, agregar un valor adicional a tales productos, aumentando el contenido de CLA en ellos.

Se encuentran bien establecidos los efectos de las bacterias lácticas, probióticas y de algunos minerales sobre el aumento en la producción de CLA, sin embargo, se carece de suficiente información relativa a la producción de este ácido cuando hay un crecimiento de bacterias en asociación en leches fermentadas, aunque Lin (2003) sugiere un sinergismo entre las bacterias del yogurt y el *L. acidophilus*. Debido a la diferente capacidad proteolítica, de acidificación y de desarrollo de las bacterias lácticas se considera que al crecer en asociación, existe una mayor producción de CLA. Por tanto, el objetivo general de este trabajo fue evaluar *in vitro* la acidez, el crecimiento y la capacidad de inóculos comerciales del tipo *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus* y *L. acidophilus*, para producir CLA al reproducirse por si mismos o bien en asociación a través del tiempo en una leche fermentada.

## Revisión de Literatura

### El CLA y en la alimentación humana

El CLA es un ácido graso producido de manera natural en el rumen por bacterias fermentativas del tipo de *Butyrovibro fibrisolvens*, que isomeriza al ácido linoléico (AL) a CLA, producto de un compuesto intermedio de la biohidrogenación dietética de los ácidos grasos insaturados por las bacterias del rumen (Garcia *et al.*, 2000). Otra fuente de CLA en rumiantes es su síntesis vía la  $\Delta$ -9-desaturasa de *trans*-11 ácido octadecadienoico (Cannella y Giusti, 2000; Evans *et al.*, 2002; Tricon *et al.*, 2004). El CLA se encuentra predominantemente en alimentos de origen animal principalmente de los rumiantes, tales como yogurt, leche y queso o en carne de vacuno y de oveja (Oh *et al.*, 2003; Dongyan *et al.*, 2004). Por esta razón, se puede considerar que la grasa derivada de los rumiantes es fuente natural rica en CLA (Lin, 2003) y que prácticamente todo el CLA de la leche y del queso se encuentra esterificado como triglicéridos variando su cantidad considerablemente debido a diferentes factores como son el tipo de dieta en el animal y el tipo de procesamiento en los alimentos (Cannella y Giusti, 2000).

Los requerimientos mínimos de nutrientes que previenen deficiencias, ayudan al mantenimiento, crecimiento y reproducción así como los excesos perjudiciales se definieron el siglo pasado, y actualmente la investigación nutricional visualiza un campo más amplio en el que además incluye la identificación de ajustes menores que favorezcan

la homeostasis del organismo para promover bienestar y salud. Durante la década de los 80's, la idea de la interdependencia entre nutrición y salud dio origen al concepto de "alimentos funcionales" o "nutracéuticos", los cuales se definen como: cualquier alimento o ingrediente que tiene un efecto positivo en la salud de un individuo, rendimiento físico o estado mental, además de su valor nutricional (Bassaganya-Riera *et al.*, 2002).

En Latinoamérica, las perspectivas en el campo de los alimentos funcionales, tanto para el productor como para el consumidor de alimentos dependerán de manera importante del nivel de información, ingresos de la población, credibilidad hacia estos productos, inversión en la investigación y prácticas de regulación (Lajolo, 2002).

En este aspecto, un punto de enorme interés en la industria de los productos lácteos se encuentra en su grasa, debido al interés por la función de uno de sus componentes: el ácido linoléico conjugado (CLA) y su relación con la salud humana proveniente de la acumulación de evidencias realizadas en estudios animales (Calder, 2002).

La historia del CLA data de los años 30's del siglo pasado cuando se encontró que la grasa butírica contenía compuestos que se absorbían a una radiación UV de 230 nm, y que esta absorción se incrementaba después de una extensiva saponificación alcalina (Kramer *et al.*, 2004; Dhiman *et al.*, 2005; Tanaka, 2005). Años más tarde, en la década de los 50's, se observó que la estructura *cis/trans* de las dobles ligaduras conjugadas de éstos ácidos grasos tenía un doblez único en la región *trans* infrarroja, misma que ha sido subsecuentemente utilizada para su

detección específica. Ambas propiedades todavía se utilizan para el análisis del CLA (Kramer *et al.*, 2004).

Cuarenta años después, Parodi aisló el *cis-9, trans-11* a partir de grasa butírica y sugirió que los ácidos grasos con insaturación conjugada no son parte normal de la dieta de la vaca, pero que aparecen en la leche como resultado de una biohidrogenación de los lípidos. Diez años después, el CLA fue aislado a partir de carne asada y se demostró que el CLA preparado sintéticamente inhibe el inicio de la carcinogénesis en ratones (Kritchevsky, 2000). A partir de ahí, se han desarrollado numerosos estudios de investigación que intentan comprender la síntesis del CLA, sus mecanismos de acción y su contenido en alimentos naturales (Dhiman *et al.*, 2005).

El isómero más activo e importante del CLA es el *cis-9, trans-11* octadecadienoico (Kay *et al.*, 2004), al cual actualmente se le denomina "ácido ruminal", además de que representa cerca de 80-85% del total del CLA mientras que el *trans-trans* del 5-9%, el *trans-cis* del 10-13%, y el *cis-cis* 1% (Pariza, 1999; Jahreis *et al.*, 2000; Thorsdottir *et al.*, 2002; Destailats *et al.*, 2005). Se reconoce que los isómeros del CLA son incorporados a las membranas fosfolipídicas de los tejidos (Moya-Camarena y Belury, 1999).

### **Nomenclatura del CLA**

Bioquímicamente el CLA se define como un compuesto de 18 carbonos (octa-deca), con dos dobles ligaduras (di-en), separados por una ligadura

sencilla (Kelly, 2001; Lawson *et al.*, 2001). Su configuración tridimensional puede tener combinaciones de configuraciones *cis* o *trans* (Figura 1) (Belury, 2002). Su estructura química es la siguiente:

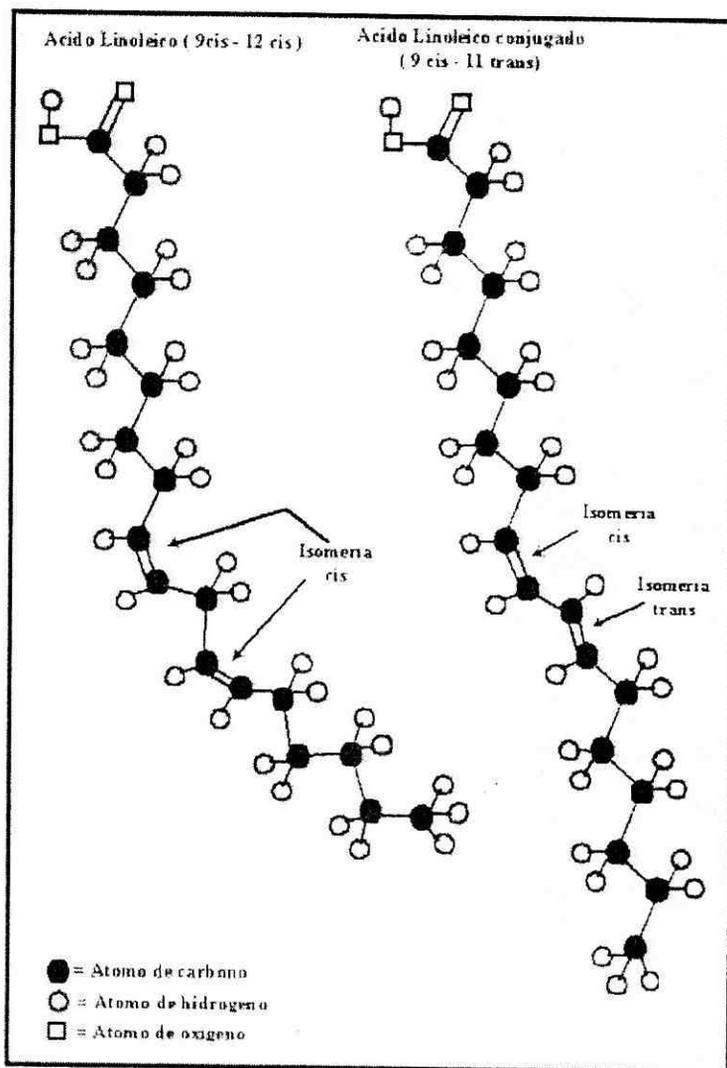


Figura 1. Estructura del ácido linoléico, ácido linoléico conjugado *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis* 12. Adaptada de: Pariza *et al.*, 2001

## Isómeros

Desde hace mucho tiempo que se conocen los isómeros del ácido linoléico (AL), sin embargo el interés por estas moléculas es relativamente reciente (Cannella y Giusti, 2000). El CLA se forma cuando cambia la localización de una o ambas de las dobles ligaduras del AL de tal manera que las dos

dobles ligaduras ya no se encuentran separadas por dos ligaduras sencillas. A diferencia del AL, que es una molécula sencilla, para el CLA existen varias docenas diferentes de isómeros, dependiendo de la colocación de las dobles ligaduras y de la configuración (Figura 2) (Kelly, 2001).

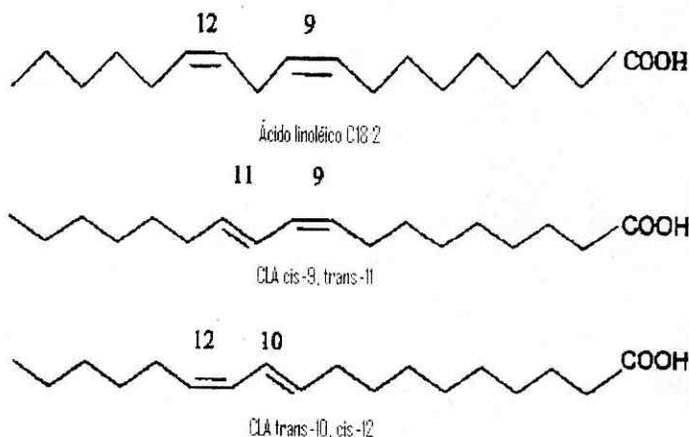


Figura 2. Estructura del ácido linoléico y dos isómeros del ácido linoléico conjugado. Adaptada de: Lawson, 2001

En el CLA, cada isómero posicional tiene cuatro isómeros geométricos (*cis, cis*; *cis, trans*; *trans, cis*; *trans, trans*) para un total de 56 posibles isómeros. Las posibles dobles ligaduras identificadas actualmente en la grasa ruminal varían de 6,8-18:2 a 12,14-18:2 en la mayoría de las posibles configuraciones geométricas dando un total de cerca de 20 isómeros (Roach *et al.*, 2002), y los diferentes isómeros pueden tener diferentes acciones biológicas (Lin, 2003).

El reconocimiento de que ciertos cambios bioquímicos y biológicos se deban a isómeros específicos ha hecho que la investigación actual con isómeros conocidos de CLA se enfoque a dos formas particulares: el *cis 9*,

*trans 11* y del *trans 10, cis 12*, mismos que se encuentran en mezclas de CLA comercialmente disponibles (Banni, 2002; Ip *et al.*, 2002). También se considera que las múltiples actividades del CLA pueden ser resultado de más de un isómero presente en las preparaciones de CLA (Park *et al.*, 2005).

## **Propiedades Terapéuticas**

Aunque no existen evidencias firmes respecto a la utilización de la dieta para controlar o reducir la incidencia de cáncer en humanos, en la década pasada se obtuvieron algunos datos de los nutrientes naturales presentes en los alimentos a los que se le atribuyen efectos benéficos sobre la salud (Dhiman *et al.*, 2005). Así pues, la alimentación ya no solo se debe percibir como una colección de nutrientes, sino también como un factor importante en la salud y prevención de enfermedades. La dieta y el estilo de vida tienen una función crítica para el mantenimiento de la salud en la población ya que una dieta saludable no sólo ayuda a prolongar la vida, sino que también es esencial en la prevención de enfermedades tales como la osteoporosis, la obesidad, o bien el cáncer de próstata y mama (Kim y Liu, 1999).

Desde el punto de vista global, la demanda por productos de origen animal está en aumento, derivado de la combinación del crecimiento de la población, la urbanización y la elevación de los sueldos (Givens, 2005). Éstos productos son una fuente importante de nutrientes en la dieta, por ejemplo, la leche y la carne proporcionan cerca del 60% del consumo

protéico en Estados Unidos y en el Reino Unido (Bauman *et al.*, 1999; Givens, 2005), y aportan un patrón de aminoácidos muy cercano al ideal, además de que son una fuente importante de vitaminas (B12, B6, riboflavina, niacina) y minerales (zinc, fósforo y calcio) (Bauman *et al.*, 1999).

Actualmente, los consumidores se encuentran más conscientes sobre aspectos de nutrición, particularmente en lo que respecta a las grasas, lo cual se observa claramente por el incremento en el mercado de productos bajos en grasa (Griinari *et al.*, 1998).

El interés por incrementar el contenido de CLA en alimentos ha crecido sustancialmente en años recientes debido a sus actividades de aspecto biológico (Banni *et al.*, 2001). Los beneficios nutricionales asociados con el consumo de CLA demostrados *in vitro* y en modelos animales incluyen propiedades como agente antiateroesclerosis, anticancerígeno, modulador del sistema inmune, agente antidiabético, ayuda a la mineralización de huesos, y como facilitador de masa corporal magra (Stanton y Lawless, 1997; Lin *et al.*, 1998; Solomon *et al.*, 2000; Whigham *et al.*, 2000; Calder y Deckelbaum, 2001; Rainio *et al.*, 2001; Raloff, 2001; Banni, 2002; Boylston y Beitz, 2002; Dave *et al.*, 2002; Jung y Jung, 2002; Yu *et al.*, 2002), esto último porque cambia la composición corporal incrementando la cantidad de proteína y agua, y disminuyendo el porcentaje de grasa (Yang y Cook, 2003). También existen reportes de que actúa como un agente antimicrobiano y que se le atribuye una

importante actividad en la disminución del colesterol además de favorecer el crecimiento (Lin, 2003). El CLA regula los problemas de tolerancia a la glucosa, y previene la hiperinsulinemia y baja las concentraciones de ácidos grasos libres en plasma (Calder, 2002; Emken *et al.*, 2002; Burdge *et al.*, 2004).

Estudios en conejos y en hámsteres muestran que el CLA protege contra la acumulación de lípidos en las arterias (Pariza *et al.*, 2001; Calder, 2002), debido a que el CLA tiene propiedades antioxidantes, aunque los mecanismos involucrados en sus acciones biológicas todavía no se encuentran bien explicadas (Yu *et al.*, 2002). Estas propiedades antioxidantes tienen incluso una actividad mayor que la de la vitamina E y similar al butilhidroxitolueno (Dave *et al.*, 2002).

Reportes epidemiológicos sugieren que el consumo de productos lácteos fermentados, específicamente el yogurt, puede reducir el riesgo de cáncer mamario, pudiéndose atribuir ésto a que los productos fermentados estimulan la actividad inmunológica (Campbell *et al.*, 2000). Se considera que el nivel de consumo de CLA extrapolado de estudios en animales que ha demostrado tener propiedades benéficas es de 3.0 mg de CLA/día (Emken *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2003), aunque en Alemania, se ha estimado un consumo diario de CLA 2.3 g/día en 1997 y en Estados Unidos de 0.31 g/día en 1989, variaciones que se deben al consumo de grasa (Fritsche y Steinhart, 1998).

Se ha sugerido que el CLA es capaz de modificar la síntesis de eicosanoides (Moya-Camarena y Belury, 1999) los cuales tienen

numerosos efectos fisiológicos sobre el organismo, y que se les ha descrito como una serie de compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono (de donde deriva su nombre), como el ácido araquidónico. Todos ellos tienen una amplia gama de actividades biológicas, bien como señales químicas (hormonas) o como efectores fisiológicos. Son el prototipo de mediadores locales, liberados *in situ* ante diversos estímulos. En esta categoría se incluyen prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos que juegan un papel importante en los procesos inflamatorios y el desarrollo de lesiones arterioescleróticas y trombosis (Sanhueza *et al.*, 2002).

Los mecanismos reportados sobre la acción del CLA en la salud se pueden definir de la siguiente manera:

### **El CLA y el cáncer**

A partir de estudios con ratones, se ha demostrado que la cancerogénesis es un proceso de múltiples etapas y que el desarrollo de un tumor canceroso involucra tres pasos fundamentales: iniciación, promoción y evolución. Cada una de estas etapas tiene características biológicas y morfológicas únicas en las células, por ejemplo, la etapa de iniciación, es un proceso irreversible y corto atribuido al daño de ADN lo que conduce a una mutagénesis. Durante la promoción se lleva a cabo la expansión de células dañadas para formar una población multicelular activa de células tumorales pre-malignas; proceso reversible y de largo tiempo. La evolución es un proceso que se cree es causado por inestabilidad genética

que alcanza cambios mutagénicos y epigénicos relacionados con la producción de un nuevo clon de células tumorales e incremento en la proliferación de la capacidad para invadir y del potencial metastático. Muchos reportes de investigaciones en donde se utilizaron modelos *in vivo* e *in vitro* han mostrado que el CLA suprime el desarrollo del proceso de carcinogénesis en diferentes sitios. Pariza y colaboradores explican que el CLA inhibe la iniciación, promoción y evolución. Más aún, detiene el proceso completo de desarrollo de cáncer (Lee *et al.*, 2005), al inhibir el DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) y el BP (benzopyreno) (Kritchevsky, 2000).

Los mecanismos de acción del CLA para la inhibición del cáncer pueden incluir la reducción de la proliferación de células, alteraciones en los componentes de la célula e inducción de apoptosis. Además, el CLA modula los marcadores de inmunidad y la formación de los eicosanoides, el metabolismo de los lípidos y la expresión genética (Belury, 2002).

Los reportes de investigaciones *in vitro*, sugieren que esta actividad puede ser el resultado parcial de la disminución de la peroxidación de la grasa y se propuso su efecto antioxidante, aunque no se le ha comprobado esta actividad y posteriormente se propuso que el CLA interfería con la cascada metabólica involucrada en la conversión del AL a eicosanoides (Garcia *et al.*, 2000), ya que las PGE<sub>2</sub> y otros eicosanoides han sido implicados en la tumorigénesis. El efecto anticancerígeno del CLA en parte, se puede explicar por la inhibición de eicosanoides

derivados del ácido araquidónico y por el incremento del nivel de retinol (Jahreis *et al.*, 2000).

### **El CLA y la modulación del Sistema Inmune**

Los efectos del CLA sobre el sistema inmune constituyen conocimientos que se refieren, principalmente al estímulo que ejerce en la síntesis de IgA, IgG, IgM y a la disminución significativa de los niveles de IgE, por lo cual se presume que el ácido graso podría tener efectos favorables en la prevención y/o tratamiento de ciertas alergias alimentarias (Sanhueza *et al.*, 2002). Estudios similares han demostrado, en una relación dosis dependiente, que el CLA aumenta el nivel de linfocitos en el bazo de ratones y la secreción de IgG e IgM por parte de estas células (Hayek *et al.*, 1999)

El CLA disminuye, la producción de interleucina 6 inducida por polisacáridos en macrófagos peritoneales, la producción del factor de necrosis tumoral, y la producción de prostaglandina E en el hígado de ratas (Sanhueza *et al.*, 2002).

La modulación de la función inmune y de la homeostasis de las células y los tejidos por los ácidos grasos poliinsaturados puede ocurrir a través de la regulación del metabolismo del ácido araquidónico, modificación de la fluidez de la membrana y la regulación transcripcional de la expresión genética de receptores activados de la peroxisoma (PPAR's), los cuales son activados directamente por los ácidos grasos o indirectamente a través de mediadores derivados de lípidos. Los efectos

derivados del ácido araquidónico y por el incremento del nivel de retinol (Jahreis *et al.*, 2000).

### **El CLA y la modulación del Sistema Inmune**

Los efectos del CLA sobre el sistema inmune constituyen conocimientos que se refieren, principalmente al estímulo que ejerce en la síntesis de IgA, IgG, IgM y a la disminución significativa de los niveles de IgE, por lo cual se presume que el ácido graso podría tener efectos favorables en la prevención y/o tratamiento de ciertas alergias alimentarias (Sanhueza *et al.*, 2002). Estudios similares han demostrado, en una relación dosis dependiente, que el CLA aumenta el nivel de linfocitos en el bazo de ratones y la secreción de IgG e IgM por parte de estas células (Hayek *et al.*, 1999)

El CLA disminuye, la producción de interleucina 6 inducida por polisacáridos en macrófagos peritoneales, la producción del factor de necrosis tumoral, y la producción de prostaglandina E en el hígado de ratas (Sanhueza *et al.*, 2002).

La modulación de la función inmune y de la homeostasis de las células y los tejidos por los ácidos grasos poliinsaturados puede ocurrir a través de la regulación del metabolismo del ácido araquidónico, modificación de la fluidez de la membrana y la regulación transcripcional de la expresión genética de receptores activados de la peroxisoma (PPAR's), los cuales son activados directamente por los ácidos grasos o indirectamente a través de mediadores derivados de lípidos. Los efectos

de la grasa dietética en la expresión de genes reflejan una respuesta de adaptación a los cambios en la cantidad y composición de la grasa ingerida (Bassaganya-Riera *et al.*, 2002).

Antioxidantes como el tocoferol,  $\beta$  caroteno y glutatión, ejercen efectos en el sistema inmune a través de la supresión de la peroxidasa lípida y/o la producción de PGE<sub>2</sub>, ya que se ha demostrado que la PGE<sub>2</sub> tiene un efecto en la producción de interleucina-2 (IL-2) y proliferación de células-T. (Jahreis *et al.*, 2000). Las enzimas como la superoxidasa, catalasa o la peroxidasa glutatión y vitaminas como el ácido ascórbico y la vitamina E protegen contra el ataque de los radicales libres (Fogelholm, 2003).

### **El CLA y la composición corporal**

Quizás el efecto del CLA que despierta mayor curiosidad y que por tanto tendría también mas impacto nutricional es la acción reductora del peso corporal atribuida al CLA. Esta acción ha derivado en una creciente explotación comercial del ácido graso sin tener, por el momento, un sustento científico sólido. Muchos estudios en varios animales y cultivos celulares han demostrado que el CLA tiene la habilidad de reducir los depósito de grasa en tejido así como el contenido de lípidos a nivel celular y de todo el cuerpo (Wang y Jones, 2004). En ratones que recibieron dietas donde el 15% o el 45% de la energía fue aportado por las grasas y que fueron suplementadas con 1% o 2% de CLA respectivamente, presentaron una disminución de la ingestión de energía, y del depósito de

grasas en el tejido adiposo, y un aumento de la velocidad metabólica y del cociente respiratorio al cabo de seis semanas, efectos que resultan en una disminución significativa del peso de los animales (Sanhueza *et al.*, 2002). Aunque en estudios con voluntarios se reporta que no existen efectos satisfactorios en humanos porque no se cuenta con datos suficientes en estudios controlados que permitan estimar los efectos del CLA en humanos (Jahreis *et al.*, 2000; Wang y Jones, 2004)

La información obtenida respecto al efecto del CLA en la reducción del peso corporal sugiere que el ácido graso afectaría la interconversión metabólica de los ácidos grasos y produciría una activación de la lipólisis, probablemente por una activación de la  $\beta$  oxidación mitocondrial. Produciría, además, una disminución de los niveles de leptina, y una estimulación de la actividad de la enzima carnitina palmitoil-transferasa (Jahreis *et al.*, 2000). En un estudio sobre la disminución de grasa corporal en ratones con una dieta alta en grasa y adicionada de diferentes concentraciones de CLA se encontró que los niveles de leptina tienden a disminuir con dosis del 1% de CLA en base a peso corporal (DeLany *et al.*, 1999). La inhibición de la actividad de la enzima lipasa dependiente de heparina, también podría estar involucrada en el efecto modulador del peso corporal que produce el CLA, ya que disminuiría la biodisponibilidad de los ácidos grasos hacia los tejidos extra hepáticos (Wang y Jones, 2004).

Por otra parte, se reporta que el mecanismo de acción del CLA pudiese estar conectado con el incremento en el gasto energético,

aumento en la lipólisis, disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa aunque desafortunadamente los datos de su efecto en el cuerpo humano son escasos (Fogelholm, 2003).

Existen investigaciones que demuestran que la acumulación de grasa en animales se reduce debido al consumo del CLA, independientemente del tipo o cantidad de grasa consumida (Kelly, 2001; Fogelholm, 2003). En ratones alimentados con una dieta adicionada con el 1.0% de CLA, después de 6 semanas incrementaron sus tasas metabólicas, consumo de oxígeno, contenido de noradrenalina, adrenalina y se redujeron los cocientes respiratorios durante la noche. Este incremento en el consumo de oxígeno se asoció con un incremento significativo en la oxidación de la grasa. Los datos obtenidos por Belury (2002) sugieren que el CLA favorece la actividad del sistema nervioso y conduce a un incremento en el metabolismo energético y una eventual reducción del tejido adiposo.

### **El CLA y la capacidad antioxidante**

Los antioxidantes, los radicales libres y la función inmune están relacionados ya que los neutrófilos producen reactivos que reaccionan con el oxígeno durante la fagocitosis, los que pueden tener un efecto negativo en la actividad citotóxica de las células NK y la función de las células T (Fogelholm, 2003)

La información sobre el posible efecto antioxidante atribuido al CLA es menos clara y más controversial que otras acciones biológicas.

Dependiendo del modelo de estudio, es el efecto observado. En modelos *in vivo* el CLA produce una disminución significativa de los niveles de peróxidos y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, dos procedimientos analíticos utilizados para evaluar efectos de antioxidantes o de inhibidores del estrés oxidativo (Pariza, 1999).

Estudios realizados *in vitro*, han demostrado que el CLA posee una efectiva capacidad para atrapar radicales libres prooxidantes (Sanhueza *et al.*, 2002) lo cual es atribuible a una actividad antioxidante (Yu *et al.*, 2002). El CLA ha sido considerado como un efectivo inhibidor del estrés oxidativo cuando se le compara con los tocoferoles y con antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT), y en numerosas revisiones se menciona su actividad antioxidante como comparable a la de los antioxidantes sintéticos convencionales (Kelly, 2001).

Sin embargo, aunque existe evidencia sobre los efectos antioxidantes del CLA la controversia deriva del hecho que el ácido graso *in vitro* se oxida con mayor velocidad aún que ácidos grasos de mayor poliinsaturación como es el caso de los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico, por lo que hasta podría atribuírsele al CLA un efecto pro-oxidante. La inducción de la oxidación por efecto de la temperatura en aceites vegetales, es más rápida si al aceite se le adiciona CLA, lo cual demostraría su posible efecto pro-oxidante. Como se puede observar, esta es otra área de investigación sobre el CLA que requiere de más información y exactitud en el desarrollo de los modelos de estudio y en la interpretación de los resultados (Sanhueza *et al.*, 2002).

## **Contenido de CLA en alimentos**

El CLA se encuentra ampliamente distribuido en muchos alimentos, incluyendo productos lácteos, carnes y ciertos vegetales. El contenido de CLA en productos de origen animal es más alto que en aceites vegetales, y entre los primeros generalmente se encuentra en cantidades más altas en tejidos de rumiantes que en el de los no rumiantes (Lin *et al.*, 1995; Adlof, 1999).

La imagen negativa que los consumidores asocian con las grasas, particularmente las saturadas, ha incrementado la búsqueda de nuevas tecnologías para la transformación de las grasas a productos con valor agregado, ya sea por la liberación de residuos de ácidos grasos para impartir sabor o propiedades funcionales, o bien convertidas a formas que proporcionan efectos benéficos para la salud (Hill *et al.*, 2001).

La leche y los productos lácteos son una fuente importante de nutrientes que no sólo proporcionan energía sino también proteína de alta calidad y una gran variedad de vitaminas y minerales. Las investigaciones se han enfocado en la alteración del contenido tanto de la grasa como de la proteína de la leche con objeto de mejorar su aspecto nutricional, de tal forma que se ajuste más adecuadamente a las tendencias (Bauman, 2002). La manipulación de la composición de la grasa butírica tiene el potencial para mejorar las propiedades nutricionales y de aceptación a través de modificaciones para reducir la relación de ácidos grasos saturados sobre los insaturados, incrementar el nivel de ácidos grasos

omega-3 e incrementar el contenido de ácido linoléico conjugado (CLA) (Hillbrick y Augustin, 2002).

### **En grasa butírica**

La grasa de la leche es una fuente natural dietética del isómero *cis*-9, *trans*-11 del CLA resultado de la isomerización ruminal durante el proceso de biohidrogenación (Loor *et al.*, 2002). Los niveles de CLA en grasa butírica varían de 2 a 37 mg/g de grasa, variaciones que se pueden atribuir principalmente a la dieta del animal, raza del animal, número de lactaciones, edad del animal o bien por variaciones individuales del animal (Parodi, 2003)

### **En grasa de leche de oveja y de cabra**

La producción de leche de cabra y de oveja es de importancia económica en diversos países, especialmente los de la región del Mediterráneo, donde ésta leche es utilizada en la producción de muchos tipos de quesos finos. En algunas ocasiones, la leche de cabra se utiliza como sustituto de la de vaca en alimentos infantiles y en leches para personas con problemas alérgicos a la leche de vaca o con problemas de orden digestivo. La leche de cabra de las regiones alpinas de Canadá llega a tener contenidos de CLA de hasta 10.5 mg/g de grasa. En Australia por su parte las cabras de la raza Saanen llegan a producir leche con un contenido de 5.8 mg de CLA/g de grasa, mientras que en Alemania el contenido de CLA en cabras en pastoreo llega a ser de 6.5 mg/g de grasa (Parodi, 2003).

En grasa de leche de ovejas en Italia se encontraron contenidos promedio de 11.7 mg de CLA/g de grasa durante el verano y de 29.7 mg CLA/g de grasa durante el invierno cuando se alimentan en pastoreo. En Alemania el contenido es de 10.8 mg/g de grasa, nivel mayor que el de la leche de vaca (10.1 mg/g de grasa) y de leche de cabra (6.5 mg/g de grasa) bajo las mismas condiciones de alimentación (Parodi, 2003)

### **En carne y productos derivados de la carne**

La segunda fuente importante de CLA son los alimentos procesados tales como pasteles, botanas, galletas y chocolates, con valores de 0.5 a 2 mg de CLA/g de grasa, dependiendo de la cantidad de productos lácteos utilizados para su elaboración (Jahreis y Kraft, 2002; Jones *et al.*, 2005; Khanal *et al.*, 2005; Lin, 2006). Los pescados, mariscos, los aceites vegetales comunes y margarinas contienen sólo trazas (Jahreis y Kraft, 2002) y normalmente en la carne de cerdo se encuentran niveles muy bajos de CLA (0.6 mg de CLA/g de grasa) (Dongyan *et al.*, 2004).

En carne la composición de ácidos grasos es un componente importante para determinar la calidad del producto ya que afecta la vida de anaquel, palatibilidad y valor nutricional (Kazala *et al.*, 1999), y en contraste con de número de estudios con contenido de CLA en derivados lácteos, sólo existen algunos reportes que describen los factores que afectan el contenido de CLA en carne (Griinari y Bauman, 1999).

La habilidad para mejorar el contenido de CLA en grasa de carne de vacuno a través de la dieta parece ser menos efectiva que para la

grasa en la leche. Esto puede deberse a la naturaleza de las dietas finales en los animales de carne en Estados Unidos, que contienen cerca del 80 o 90% de granos, lo cual reduce el pH del rumen por debajo de los valores que favorecen la producción de CLA en el rumen (Khanal y Olson, 2004), aunque en ganado vacuno alimentado con dietas con sustitución de los granos de maíz normal por un maíz con alto contenido de aceite incrementaron los niveles de marmoleo y prevalencia de ácidos grasos en músculo sin alterar las características ni los análisis sensoriales de la canal, pero si mejorando su calidad (Andrae *et al.*, 2001).

Reportes existentes sugieren que la concentración de CLA en carne, varía entre los diferentes países; la carne australiana es la que contiene los valores más altos de CLA, representando el 1% de CLA con respecto a la cantidad total de ácidos grasos, las carnes en Alemania, contienen 0.65% de CLA de grasa total y en Estados Unidos la carne posee entre 0.3 a 0.5% de CLA del total de la grasa (Grinari y Bauman, 1999).

### **CLA en derivados lácteos**

El contenido de CLA en la mayoría de los productos lácteos varía de 2.5 a 7.0 mg/g de grasa mientras que en los helados y el yogurt sin grasa son relativamente bajos en CLA de 0.6 y 1.7 mg de CLA/g de grasa respectivamente (Lin *et al.*, 1995). Sin embargo, también se reportan valores de 3 a 6 mg de CLA/g (Kelly *et al.*, 1998) o hasta de 30 mg de CLA/g de grasa. Esta variabilidad parece depender de las condiciones de

proceso y del estado de maduración de los productos. De hecho, existe una relación positiva entre la maduración del queso y el contenido de CLA y en general, el queso procesado contiene más CLA (Cannella y Giusti, 2000), aunque la concentración de CLA en leche puede incrementarse al variar el nivel y fuentes de grasas insaturadas en la dieta de la vaca (Chichlowski *et al.*, 2005). Asimismo se puede afirmar que dentro de los productos lácteos aquellos que son fermentados tienen un mayor contenido de CLA (Figura 3) (Oh *et al.*, 2003).

Alimento	CLA total (g/kg de grasa)	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 (g/100 kg CLA total)
Mantequilla	9.4 -11.9	91.0
Queso procesado	3.2 - 8.9	17.0 - 90.0
Queso natural	0.6 - 7.1	17.0 - 90.0
Yogurt	5.1 - 9.0	82.0
T-bone (cocido)	4.7 - 9.9	65.0
T-bone (crudo)	4.4 - 6.6	59.0
Aceites vegetales	0 - 2	45.0
Grasa de leche	2.0 - 30.0	90.0

**Figura 3. Contenido de ácido linoléico conjugado en distintos productos lácteos. Adaptada de: Lawson, 2001**

### **CLA en aceites vegetales**

Aunque existe un amplio número de ácidos grasos con ligaduras insaturadas conjugadas en aceites de semillas, el CLA no se encuentra presente, sin embargo, se pueden formar pequeñas cantidades de CLA como resultado del calentamiento, blanqueo, deodorización y durante el proceso de refinación. Los contenidos de CLA en aceites de coco, girasol, cacahuete, canola, maíz, olivo, y azafrán varían entre 0.1 mg de CLA/g de grasa en el primero y de 0.7 mg de CLA/g de grasa en el último (Parodi, 2003). En mantecas y margarinas, la hidrogenación parcial del aceite

vegetal para su producción puede producir CLA: en mantecas, el contenido encontrado en aceite procesado de soya fluctúa de 3 a 6 mg de CLA/g de grasa, en margarinas de 3 a 8 mg de CLA/g de grasa (Parodi, 1999)

### **CLA en fórmulas infantiles, leche materna y alimentos para bebé**

Las fórmulas infantiles o la leche materna producen un crecimiento óptimo durante el primer año de vida y pueden ayudar a prevenir enfermedades posteriores y el CLA puede tener una función importante en esta dieta. Los datos reportados del contenido de CLA en leche materna es variable. En las madres australianas se han encontrado valores desde 11.2 hasta 5.8 mg de CLA/g de grasa, atribuyéndose este valor alto a que las mujeres de la secta religiosa Hare Krishna consumen poca carne y grandes cantidades de mantequilla y ghee (grasa pura láctea de origen Indio). Los reportes en mujeres canadienses y alemanas reportan valores de 4.0 mg de CLA/g de grasa, mientras que las investigaciones con diferentes mujeres en Estados Unidos varían entre 1.8 a 3.6 mg de CLA/g de grasa. Estos últimos datos muestran valores más altos en el contenido de CLA en aquellas mujeres que llevan una dieta alta en productos lácteos (Figura 4) y los valores alcanzados en fórmulas infantiles en polvo son muy bajos ( 0 a 0.2 mg de CLA/g de grasa (Parodi, 2003).

País	Región	Contenido
Australia	Madres convencionales	5.8
	Madres Hare Krishna	11.2
Canadá		4.0
Estados Unidos	Madres de Idaho	3.6
	Madres de Connecticut	1.8
	Idaho(dietas bajas lácteos)	2.3
	Idaho (dietas altas lácteos)	3.8
Alemania		4.0
Promedios de muestras a los 1, 7, 14 y 21 días de lactancia		

Figura 4. Contenido de CLA en leche materna en diferentes regiones. Adaptada de: Reaney *et al.*, 1999.

### Cambios en el contenido de ácido linoléico conjugado

#### CLA y tipo de dieta

Existen diversas estrategias para mejorar el valor de la grasa láctea para beneficio del consumidor con características nutricionales mejoradas o bien con atributos físicos deseables. Se asume que la dieta juega un papel importante en la modulación de la composición de los ácidos grasos en la leche de rumiantes tales como ganado vacuno, cabras y ovejas (Addis *et al.*, 2005) y que otras tácticas involucran la alteración de los regímenes alimenticios, el mejoramiento genético de los animales y la aplicación de tecnologías de los procesos post-manejo apropiados para alterar la composición de la grasa butírica. Sin tomar en consideración los cambios que se buscan, la leche debe ser manejada apropiadamente para minimizar el riesgo de reacciones de degradación en grasa que ocurran en la post-ordeña y durante el procesamiento de la leche, ya que el valor de la grasa en la leche depende de la compleja interrelación de múltiples factores (Hillbrick y Augustin, 2002).

En un estudio sobre la variación estacional del contenido de CLA en muestras de leche producida por vacas en los países nórdicos, se reporta que en verano es mayor que en invierno, explicándose por el uso de harina de pescado como alimento de origen animal, y que al compararla con la de países europeos, el contenido de CLA es menor debido a que los veranos son más cortos y por tanto los animales tienen períodos más cortos de alimentación con pastura fresca en los países Nórdicos (Thorsdottir *et al.*, 2002). El estado de madurez y el método de conservación de los forrajes parecen ser un factor importante en el contenido de CLA en vacas. Las vacas alimentadas con forraje inmaduro tienen niveles más altos de CLA que aquellas que consumen forraje maduro (Dhiman *et al.*, 2005)

Asimismo, las raciones con alto contenido de grasa, como las que incluyen soya o linaza incrementan significativamente su contenido de CLA en leche (Jahreis y Kraft, 2002; Zheng *et al.*, 2005). El ganado alimentado con raciones adicionadas de semillas de canola alteran favorablemente el perfil de ácidos grasos en la grasa de su leche y estos cambios no van relacionados con la disminución en la cantidad de leche producida (Chichlowski *et al.*, 2005).

### **Tipo de procesamiento**

Se han realizado enormes esfuerzos para evaluar el contenido de CLA en los diferentes productos lácteos y lograr determinar las causas de su variabilidad, demostrándose que la oxidación está involucrada en la

producción de CLA durante la manufactura de diversos productos, debido a tratamientos tales como el calor y la maduración, y que condiciones tales como el contenido de proteína, grasa, humedad y acidez, pueden estar asociados con los diferentes contenidos de CLA en los productos lácteos (Lin *et al.*, 1995).

Asimismo, en quesos, la variabilidad de CLA parece depender de las condiciones de procesamiento y de la duración del proceso de maduración (Cannella y Giusti, 2000), o bien, por la adición de proteínas de suero (Campbell *et al.*, 2003), aunque recientes reportes indican que no hay variación en la composición de los ácidos grasos en un tiempo de maduración de 24 semanas (Allred *et al.*, 2006)

En quesos procesados, el tratamiento térmico severo que se les proporciona puede contribuir a que éste tipo de productos contenga un valor más elevado de CLA, mientras que en quesos azules y suizos, la incorporación de aire durante su proceso puede afectar el aumento en CLA, atribuido a un alto contenido de oxígeno incorporado en los diferentes pasos del proceso que permiten la exposición al aire, lo que favorece la oxidación de radicales libres del AL para formar CLA (Lin *et al.*, 1995).

Los métodos convencionales de calentamiento no causan en la leche ningún incremento significativo en el contenido de isómeros *trans*, a excepción de la leche tratada a  $63 \pm 1.0^\circ\text{C}$  por 30 min y a la que se le da un tratamiento térmico a través de microondas por 5 min, en donde los incrementos obtenidos son del 19 y 31% respectivamente. Sin embargo,

el calentamiento con microondas en productos elaborados, tales como quesos, se tiene una disminución considerable del contenido de CLA lo que significa que los quesos calentados por microondas pierden uno de sus más valiosos componentes funcionales (Herzallah *et al.*, 2005).

Además de la habilidad de las bacterias del rumen para formar CLA a partir de AL de la dieta, se ha demostrado que ciertos cultivos de las fermentaciones alimenticias poseen la habilidad para generar CLA *cis-9, trans-11* (Jiang y Fonden, 1998; Lin *et al.*, 2002). En las cepas que producen CLA, existe una correlación positiva entre la producción de CLA y la habilidad para tolerar el ácido linoléico libre, lo que sugiere que la conversión del AL libre a CLA pudiera funcionar como un mecanismo de detoxificación (Jiang y Fonden, 1998). Esto mismo puede indicar que las cepas que sobreviven a concentraciones más altas de ácido linoléico tienen mayor habilidad para generar CLA (Coakley *et al.*, 2003).

Un proceso alterno para incrementar el CLA en los alimentos es la utilización de procesos enzimáticos con el fin de incorporar el CLA a los triglicéridos de la grasa butírica por interesterificación a través de reacciones de acidólisis catalizadas por lipasas, aunque esta tecnología todavía no puede ser comercializada hasta que sea aprobada por las agencias reguladoras (García *et al.*, 2000).

### **Enriquecimiento de productos lácteos con CLA**

Una forma de incrementar el contenido de CLA en diversos productos lácteos es a través del enriquecimiento con la adición de suplementos.

Aunque se ha sugerido que dicho enriquecimiento podría alterar los atributos sensoriales de la leche y los productos lácteos (McGuire y McGuire, 2000). Los atributos sensoriales tienen una función importante en la aceptación de un producto alimenticio por el consumidor (Khanal *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos estudios llevados a cabo con leche enriquecida con CLA y mantequilla de animales alimentados con aceite de pescado y soya no mostró ninguna diferencia con productos iguales pero con bajo contenido de CLA (Ramaswamy *et al.*, 2001).

Por otra parte, las adiciones de CLA parecen hacer los productos lácteos más susceptibles a la autooxidación debido a la presencia de dobles ligaduras del CLA (Campbell *et al.*, 2003), además de que las adiciones elevadas de CLA sintético a los productos lácteos parece ser poco probable a causa de la limitación por los costos (Khanal *et al.*, 2005).

Algunos reportes indican que el enriquecimiento de los productos lácteos con CLA, disminuye la aceptación en cuanto al sabor y la percepción de frescura de la leche, ya que ésta se asemeja a una leche adulterada con agua y menos cremosa, aunque el nivel de grasa se mantenga constante (Campbell *et al.*, 2003).

Por el contrario, el estudio en quesos enriquecidos y quesos obtenidos a partir de leches obtenidas de vacas alimentados en pastizales son similares a las no enriquecidas (Khanal *et al.*, 2005).

Por otra parte, la textura de la mantequilla y quesos adicionados con CLA se observan menos firmes que en aquellos en los que no se adiciona CLA, aunque sensorialmente su impresión total no difiere, por lo

que se considera que los productos enriquecidos tienen características sensoriales y de almacenamiento muy aceptables (Jones *et al.*, 2005).

### **Biohidrogenación del ácido linoléico en el rumen**

Como ya se ha explicado, la carne y los productos lácteos son una fuente importante de ácidos grasos saturados, ácidos grasos *trans* y CLA para los humanos, y en los rumiantes, los ácidos grasos *trans* se forman durante el proceso de biohidrogenación en el rumen (Mosley *et al.*, 2002).

La biohidrogenación ruminal (BH por sus siglas en inglés) se describe por primera ocasión en 1951 aunque su explicación se lleva a cabo en 1966 por Tove y no fue sino hasta 1997 cuando se describió como un proceso complejo para los ácidos grasos en el rumen (Ohio State University, 2005).

Los lípidos que llegan al rumen sólo pueden degradarse por dos rutas: por la digestión o bien por excreción para lo cual se requiere de los procesos de lipólisis y de biohidrogenación aunque el primero es un prerrequisito para que se lleve a cabo el segundo (Chalupa *et al.*, 2003). La lipólisis consiste en una transformación inicial de las ligaduras de los ésteres de la grasa catalizado por las lipasas microbianas, y la biohidrogenación se entiende como un proceso complejo que se lleva a cabo en el rumen y que involucra la formación de muchos isómeros de CLA (Kay *et al.*, 2004).

La BH del AL es un proceso llevado a cabo en tres pasos y que produce ácido estéarico como producto final (Coakley *et al.*, 2003). La

primera reacción es la conversión del AL a *cis-9, trans-11* por una isomerasa de AL, enzima de la bacteria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*. Esta reacción ocurre rápidamente, seguida de una conversión más lenta a ácido vaccénico *trans-11*. El ácido vaccénico se reduce posteriormente a ácido estearico por la actividad microbiana del rumen. El ácido vaccénico puede también convertirse a CLA *cis-9, trans-11* por una  $\Delta$ -9 desaturasa, enzima del tejido mamario, proporcionando un segundo mecanismo para la formación de CLA en leche (Lawson *et al.*, 2001).

Las bacterias son responsables de esta biohidrogenación de ácidos grasos insaturados y parece ser que los protozoarios juegan sólo una función de mínima importancia. Durante años, la única bacteria conocida capaz de llevar a cabo este proceso fue la *Butyrivibrio fibrisolvens*, sin embargo conforme los esfuerzos de investigación se expandieron, se han aislado una gama diversa de bacterias ruminales capaces de biohidrogenar los ácidos grasos, investigaciones con cultivos puros sugieren que ninguna especie bacteriana en el rumen por sí sola cataliza totalmente el proceso de biohidrogenación, incluyéndose estas en dos grupos A y B de acuerdo a las reacciones y productos finales de cada una de ellas (Bauman *et al.*, 1999). Las bacterias del grupo A son capaces de hidrogenar el ácido linoléico y el  $\alpha$ -linolénico para dar el *trans-11* como producto principal. El grupo de bacterias B utiliza el *trans-11* como uno de los sustratos principales para proporcionar ácido estearico como producto final (Bauman *et al.*, 1999; Ip *et al.*, 1999) (Figura 5).

El rumen es el sitio en donde se lleva a cabo un intenso metabolismo de la grasa y se ha correlacionado positivamente la cantidad de ácidos grasos conjugados en la leche de vaca con el consumo de este ácido en la dieta, indicándose que el CLA formado en el rumen se incorpora a la grasa butírica. El isómero *cis*-9, *trans*-11 es un compuesto intermedio en la biohidrogenación (Lawson *et al.*, 2001; Jahreis y Kraft, 2002).

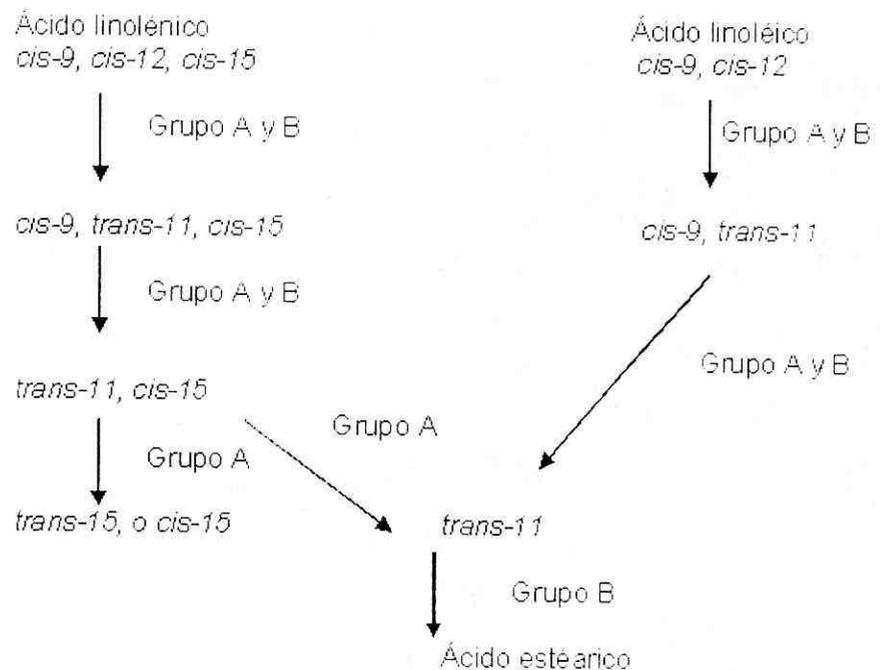


Figura 5. Reacción de biohidrogenación del ácido linolénico y ácidos  $\alpha$  linolénicos a estearico por el rumen. Adaptada de: Griinari y Barman, 1999

Se ha propuesto que la formación de CLA en productos lácteos se lleva a cabo por una isomerización del ácido linolénico y ácido linoléico en el rumen a través de la oxidación del AL por la acción de radicales libres durante el procesamiento (Lin *et al.*, 1995; Lin, 1999). La extensión de la biohidrogenación en el rumen depende principalmente del tipo de dieta debido a que una disminución en el pH limita el inicio la lipólisis y por

tanto la hidrogenación ocurre sólo en ácidos grasos libres. Una gran cantidad de AL en la dieta y una disminución en la hidrogenación son los factores que contribuyen a incrementar la concentración de los compuestos intermedios (Lawson *et al.*, 2001)

Después de su absorción, el ácido *trans* vaccénico puede reconvertirse a CLA *cis-9, trans-11* a través de la desaturasa-estearoil-CoA en la glándula mamaria de la vaca y existe evidencia de su formación por una  $\Delta$ -9- desaturasa en rumen o tejidos de otras especies animales como roedores, cerdos o humanos (AbuGhazaeh *et al.*, 2002; Jahreis y Kraft, 2002).

Existe poca información sobre el mecanismo bioquímico que regula el metabolismo de los diferentes isómeros CLA en los rumiantes, pero los cambios en la cantidad de sustrato y extensión de la biohidrogenación tienen un efecto en el suministro de los productos finales e intermedios de este proceso influyendo por tanto en el contenido de CLA en la leche (Figura 6)(Lawson *et al.*, 2001).

En estudios de biohidrogenación con microorganismos ruminales, se ha observado que el ácido  $\alpha$ -linolénico (*cis-9, cis-12, cis-15* ácido octadecatrienoico) se convierte a un trieno conjugado (*cis-9, trans-11, cis-15*) y después a *trans-11, cis-15* y finalmente a un ácido octadecenoico que puede ser ya sea el *trans-11, trans-15* o el *cis-15* (Lawson *et al.*, 2001; Jahreis y Kraft, 2002).

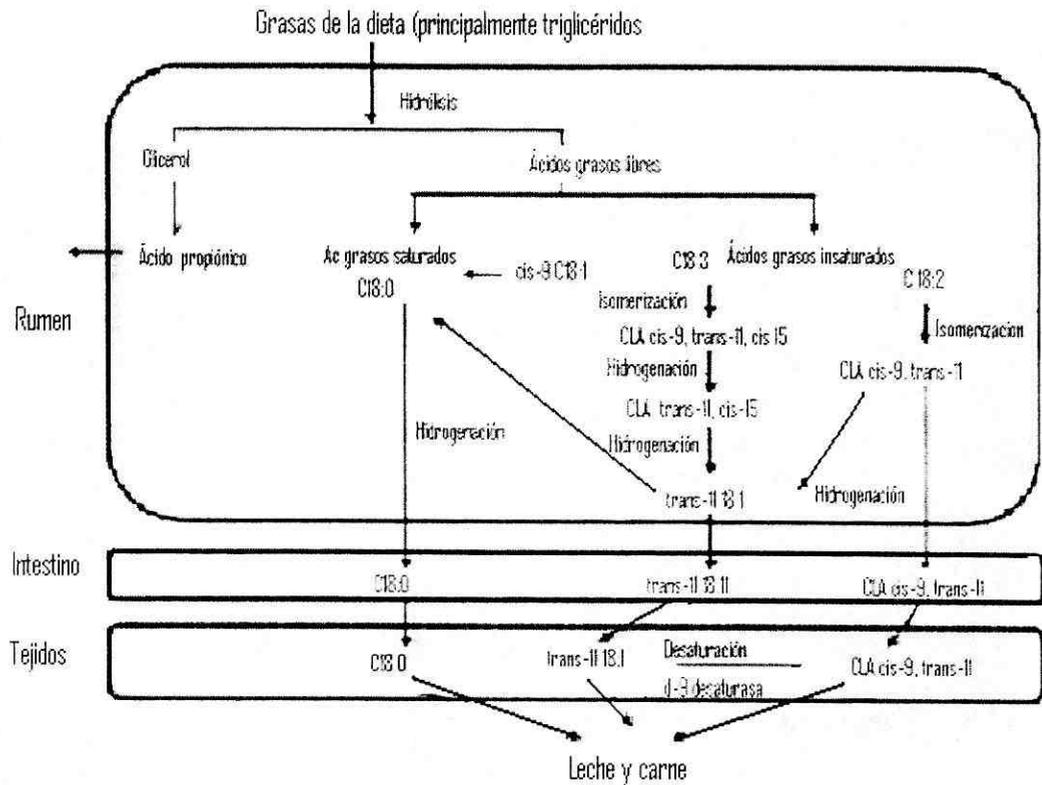


Figura 6. Metabolismo de los lípidos en el rumen y los orígenes del ácido linoléico conjugado en productos de origen animal. Adaptada de: Tanaka, 2005

### Suplementos comerciales y síntesis química de CLA

El CLA industrial se define escasamente como mezcla de compuestos cuya síntesis comercial inicial se enfocó a maximizar el contenido total de CLA, por lo que muchos de estos productos eran ricos en CLA, aunque contenían un gran número de isómeros posicionales indeseables. Posteriormente, se observó que la demanda era principalmente para que los isómeros presentes en estos suplementos fueran específicamente el *cis-9, trans-11* y el *trans-10, cis-12* (Reaney et al., 1999).

Las mezclas de CLA para estudios clínicos o para propósitos analíticos por lo general se sintetizan por una isomerización del ácido linoléico (*cis-9, cis-12 18:2*) y consisten principalmente de ácidos *cis-9,*

*trans-11 18:2*, y *trans-10, cis-12 18:2*, aunque el proceso puede formar también cantidades importantes de ácidos *trans-8, cis-10* y *cis-11, trans-13* y en menores concentraciones todos los isómeros *cis-* y *trans-* (Destailats *et al.*, 2005), y el número de isómeros sintetizados depende de la severidad de las condiciones de isomerización alcalinas utilizadas para su preparación (Adlof, 1999).

Por cerca de cinco años se han comercializado un gran número de mezclas de CLA como suplementos alimenticios elaborados a partir de aceite de girasol rico en AL por una isomerización alcalina y contienen, de acuerdo con el proceso de producción dos o cuatro isómeros posicionales de CLA (*cis,trans/trans,cis cis-9,trans-11, trans-10,cis-12* o *trans-8,cis-10, cis-11,trans-13*) y trazas de otros isómeros (*cis,cis* y *trans,trans*) (Jahreis *et al.*, 2000).

En un estudio llevado a cabo para comparar cuatro suplementos comerciales de diferentes marcas, se concluye que difieren en el contenido total de CLA, distribución de isómeros, composición de ácidos grasos, color y solubilidad al hexano. La diferencia en el contenido total de CLA puede explicarse por los niveles de ácido linoléico presente en los aceites originales utilizados para producir el CLA, las condiciones de las reacciones de isomerización y otros ingredientes adicionados a la fórmula (Yu *et al.*, 2003).

La materia prima para la producción de suplementos de CLA debe ser rica en ácido linoléico pudiendo encontrarse en forma de triglicéridos,

ácidos grasos o como ésteres de ácidos grasos. Se requiere de equipo de extracción y de refinación para obtener aceites con altos niveles de CLA y puede extraerse de maíz, semilla de algodón, pepino, semilla de uva, linaza, azafrán, girasol, soya, calabaza o nuez (Reaney *et al.*, 1999).

El CLA puede ser sintetizado en el laboratorio a partir de aceites como el de girasol, sin embargo, el CLA producido en esta forma tiende a contener una mezcla diferente de isómeros. Este tipo de producto ya se encuentra disponible comercialmente para alimentación de cerdos por su habilidad de mejorar la ganancia de músculo magro durante su crecimiento. El CLA sintético puede ser utilizado además para aumentar la concentración de CLA en leche de vaca si se protege de alguna forma del ambiente ruminal (Bell y Kennelly, 2001).

Con respecto a la toxicidad por el uso prolongado de suplementos de CLA, existen datos en estudios en ratas que proponen que su uso hasta por 18 meses no causa efectos adversos y que puede reducir la diabetes y mejora la supervivencia después del desarrollo de enfermedades renales. Sin embargo, se requieren más evaluaciones con otras especies para asegurar la efectividad y seguridad, especialmente cuando se relaciona con el consumo humano (Park *et al.*, 2005).

### **Microorganismos Lácticos en la Producción de CLA**

Además de los microorganismos del rumen, algunos inóculos utilizados en la industria de alimentos, tales como *P. freudenreichii*, *Bifidobacterium* y las especies del *Lactobacillus* pueden producir CLA a partir de ácido

linoléico (Ogawa *et al.*, 2005), motivo por el cual se le ha prestado mucha atención a los microorganismos grado alimenticio (Kim y Liu, 2002).

Algunas afirmaciones con respecto a que las bacterias probióticas del tipo *L. acidophilus* ofrecen beneficios en la salud han contribuido al incremento en las ventas de productos fermentados con este tipo de bacterias, además de que se ha sugerido que pudieran producir CLA. (Dave *et al.*, 2002).

### **Proceso de Fermentación**

La fermentación es el proceso de la descomposición química de una sustancia, generalmente carbohidratos, debido a la acción de enzimas producidas por bacterias, levaduras u hongos. La fermentación ocurre por lo regular en un ambiente libre de oxígeno y típicamente involucra la conversión de un almidón o azúcar a alcohol etílico (Hui, 1992).

La historia de la fermentación de alimentos se desarrolló paralelamente con la microbiología, ya que tradicionalmente muchos alimentos se preparaban por fermentación aunque se desconocía el mecanismo existente detrás de los procesos y por tanto el porqué del éxito o el fracaso de los mismos (Hui, 1992).

La fermentación fue concebida mucho antes de que los microorganismos fuesen descubiertos, y por lo tanto es un proceso que parecía misterioso. La magia de este proceso radicaba en el origen común de las palabras "levadura y fantasma". Una vez que se comprendió la necesidad de la utilización de los microorganismos, se conservaba una

muestra de la producción previa, normalmente suero, procedimiento que todavía se encuentra en uso para la propagación de algunos quesos u otros productos artesanales (Hui, 1992; Hansen, 2002).

El descubrimiento de los microorganismos, propició la mejora de los productos ya que permitían utilizar cultivos aislados y bien caracterizados, sin embargo, todavía tomó otro siglo antes de que la industria láctea y cárnica cambiara sus procesos empleando microorganismos, generalmente las bacterias lácticas se emplean en la producción de alimentos fermentados, y constituyen la mayoría del volumen y valor de los cultivos comerciales (Hansen, 2002).

Los cultivos son bacterias que se adicionan a los procesos para iniciar una fermentación, razón por la cual también se denominan iniciadores (Hui, 1992). Su actividad primaria es convertir los carbohidratos a metabolitos deseables tales como alcohol, ácido acético, ácido láctico o  $\text{CO}_2$ . Los cultivos utilizados para fermentaciones alimentarias también contribuyen con reacciones "secundarias" que producen sabor y textura. Esta aportación "secundaria" frecuentemente puede ser responsable de la diferencia entre productos de distintas marcas, y por lo tanto contribuye significativamente al valor del producto (Hansen, 2002).

La fermentación láctea es el proceso responsable de generar productos lácteos como el yogurt, y es una forma tradicional de conservar la leche. El consumo de yogurt ha sido considerado por mucho tiempo benéfico a la salud, reportándose desde principios del siglo XX que la

longevidad de los búlgaros se debía parcialmente a su rutinario consumo de yogurt. Estudios epidemiológicos en animales han demostrado que los productos lácteos fermentados, producidos por bacterias lácticas reducen la incidencia de tumores. Algunas bacterias lácticas son reconocidas por su capacidad de antagonizar con las bacterias putrefactivas del intestino al introducir un ambiente ácido, alterando la microbiota, reduciendo la presencia de compuestos mutagénicos y estimulando las respuestas inmunes de las mucosas. Más aún, algunos componentes de la leche, tales como el calcio, vitamina D, vitamina A, y CLA tienen funciones en la prevención del cáncer (Kim y Liu, 2002).

En la elaboración del yogurt se adicionan el *Streptococcus salivarius* spp *thermophilus* y el *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus* para fermentar la leche y por tanto conferirle estas características de textura y sabor (Campbell *et al.*, 2000).

### **Bacterias lácticas**

Los datos históricos sobre las propiedades benéficas de alimentos con microorganismos vivos tales como la leche fermentada data de muchos siglos. Su uso en tratamiento de achaques corporales se menciona aún en las escrituras bíblicas. Hipócrates y otros científicos consideraban a la leche fermentada no solo como un alimento, sino también como medicina y la prescribían para la cura de desórdenes estomacales e intestinales. A principios del siglo XX el bacteriólogo ruso Metchnikoff fue el primero en dar la explicación para los efectos benéficos de las bacterias en la leche

fermentada. Él atribuía la buena salud y longevidad de los búlgaros a su consumo de grandes cantidades de leches fermentadas. En 1908 propuso que las bacterias lácticas reemplazaban e inhibían a las bacterias productoras de toxinas normalmente presentes en el intestino y por lo tanto prolongaban la vida (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos asociados con plantas, carne, y lácteos, muy conocidas por su uso como cultivo en la manufactura de productos lácteos como leche acidófila, yogurt y quesos. Consisten de especies de: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus*. En general se caracterizan como Gram-positivas, desde aeróbicas hasta anaeróbicas y facultativas, bacilos no esporulados y cocos que son negativos a la oxidasa, catalasa y benzina, carecen de citocromos, no reducen los nitratos a nitritos, son negativos a la gelatinasa e incapaces de utilizar lactato (Carr *et al.*, 2002). Las bacterias lácticas formadas durante la fermentación son el mejor conservador ya que disminuyen el pH desde 6.6 en leche a 4.0 para yogurt o 5.2 en quesos (Hui, 1992).

Las bacterias lácticas son útiles en la Industria de los alimentos, no sólo por su habilidad para acidificar y por tanto conservar los productos alimenticios de deterioro, sino por su contribución a las propiedades sensoriales de los productos fermentados. Juegan un papel importante en el desarrollo de textura del yogurt y otras leches fermentadas, quesos bajos en grasa y postres lácteos. Pueden tener un beneficio tecnológico y de salud ya que al ser reconocidos como seguros (Generally recognized

as safe: GRAS, por sus siglas en inglés) se prefiere la utilización de bacterias grado alimenticio como iniciadores funcionales en lugar de espesantes (Vanningelgem *et al.*, 2004).

Las bacterias lácticas funcionan como iniciadores bacterianos comúnmente utilizados en la industria láctea para la elaboración de productos fermentados, y recientemente, debido a sus propiedades terapéuticas, también se han incorporado bacterias de las denominadas probióticas tales como *L. acidophilus*, *L. casei* y *Bifidobacterium bifidum* (Chick *et al.*, 2001; Ouwehand *et al.*, 2002). Sin embargo otros organismos como el *Enterococcus* y las levaduras igualmente se han utilizado como probióticos (Chow, 2002).

Los probióticos se definen como microorganismos viables que cuando se ingieren tienen efectos benéficos en la prevención y tratamiento de condiciones patogénicas específicas al mejorar el balance microbiano intestinal (Vinderola *et al.*, 2000). Bacterias del tipo *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* previenen la adherencia, establecimiento y replicación de varios enteropatógenos a través de mecanismos antimicrobianos y modulación de la respuesta inmune de la mucosa del hospedero, pero esta definición posteriormente fue extendida para incluir efectos benéficos como la inmunomodulación (Blum *et al.*, 2002; Heyman y Menard, 2002; Marteau, 2002). Existen productos que contienen una sola cepa, sin embargo también pueden haber mezclas con varias cepas (Marteau *et al.*, 2002). Por otro lado, los prebióticos son ingredientes alimenticios que son degradados en el intestino delgado por los organismos probióticos y que

pueden beneficiar al hospedero a través de una estimulación en el crecimiento o actividad de un gran número de bacterias (Marteau y Boutron-Ruault, 2002).

Las bacterias probióticas tienen que tener características especiales para resistir el ácido y la bilis en el tracto digestivo, además de tener la capacidad de adherirse a las células epiteliales de forma que puedan permanecer tiempo suficiente en el tracto digestivo para producir compuestos antimicrobianos y para modular la respuesta inmune y resistir procesos tecnológicos (Heyman y Menard, 2002).

Los productos probióticos formulados apropiadamente ofrecen a los consumidores componentes dietéticos con gran potencial como promotores de la salud (Chow, 2002). Las bacterias probióticas generalmente se adicionan a la leche con el iniciador normal, pero no se desarrollan grandemente durante la manufactura del producto, razón por la cual se adicionan en gran número para asegurar su presencia en el producto final (Hui, 1992).

A los productos lácteos se les incorporan bacterias probióticas, que incluyen al *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Propionibacterium*. Estos organismos crecen lentamente en leche durante su procesamiento. Por tanto, es común que durante la elaboración del yogurt se incorporen además del *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus* este tipo de microorganismos ya que las bacterias del yogurt no sobreviven el paso por el tracto digestivo ni colonizan el intestino y no pueden proveer ningún

beneficio terapéutico. Aún así, las bacterias del yogurt crecen rápidamente y por lo tanto se adicionan para agilizar el proceso de fermentación, existiendo reportes que recomiendan que las concentraciones de bacterias probióticas sean de  $10^6 - 10^8$  UFCg<sup>-1</sup> de producto (Tharmaraj y Shah, 2003).

Parte de los efectos benéficos de las bacterias probióticas está relacionada con la observación de que se requiere de microbiota del tipo comensal para el establecimiento de tolerancia oral a los antígenos de los alimentos para mantener una barrera microbiana que facilite la eliminación de organismos patógenos del tracto digestivo (Heyman y Menard, 2002).

El éxito de los alimentos funcionales depende de la capacidad en la industria de los alimentos para desarrollar productos eficientes que cumplan con las necesidades del consumidor. El potencial global de alimentos funcionales es grande y aumenta conforme el consumidor se encuentre más conciente de su salud, o por la adquisición de tendencias de cuidado asociadas con la edad, conocimiento y poder adquisitivo. El consumidor actual espera que los alimentos sean convenientes, seguros, saludables y sobre todo sabrosos. En particular, se espera que suministren un beneficio para la salud más allá de los atributos básicos para asegurar la salud diaria y futura (Verschuren, 2002).

En la industria láctea, existe la tendencia actual de adicionar bacterias lácticas como cultivos para fermentar leches y quesos para lo que se utilizan las bacterias lácticas y probióticas comercialmente disponibles (Vinderola *et al.*, 2002). Los productos lácteos contienen

bacterias activas, por lo que, para garantizar rangos de sobrevivencia elevados y asegurar la estabilidad del producto, deben refrigerarse durante el almacenamiento (Heller, 2001).

Aunque *S. salivarius* spp *thermophilus* es altamente estable bajo condiciones de almacenamiento por un período hasta de 6 semanas, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus* se incrementa al inicio, para decrecer posteriormente. *L. acidophilus* y particularmente *B. bifidum* son todavía menos estables cuando se adicionan al yogurt y se reporta que su número disminuye rápidamente en algunas muestras, especialmente aquellas en las cuales hubo una disminución rápida de pH (Borchers *et al.*, 2002).

Para la manufactura del yogurt normalmente se utilizan cepas combinadas de cultivos iniciadores como el *Streptococcus salivarius* spp *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus*, sin embargo, para la producción de otras leches fermentadas se pueden adicionar además las cepas combinadas de especies de *Lactobacillus*, *Lactobacillus acidophilus*, *bifidobacterium* spp mismas a las que se les atribuyen efectos benéficos para la salud (Chick *et al.*, 2001; Bonczar *et al.*, 2002; Borchers *et al.*, 2002).

El crecimiento conjunto existente entre el *S. thermophilus* y *L. delbreuckii* spp *bulgaricus* puede influenciar las propiedades fisicoquímicas y el nivel de compuestos aromáticos en el yogurt cuando se compara con productos elaborados con cepas simples de estos microorganismos (Bonczar *et al.*, 2002).

## La acidez en leches fermentadas

Al yogurt se le define de acuerdo a los Codex Alimentarius de 1992, como un producto de leche coagulada que resulta de la fermentación láctica en leche por *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (Nikbin y Ha, 2000). Es un producto lácteo con una vida de anaquel de hasta 60 días en refrigeración, dependiendo de su calidad sanitaria durante el procesamiento y envasado (Karagül-Yüceer *et al.*, 2001)

Desde la década de los años 1960's, la producción de leches fermentadas, especialmente el yogurt, se ha incrementado mundialmente. Algunos factores son importantes para el éxito del yogurt: su imagen natural, sus características organolépticas (sabor fresco, ácido y característico), nutricional, propiedades profilácticas y terapéuticas y su costo moderado (Birolo *et al.*, 2000). Los productos lácteos, tales como el yogurt, han sido aceptados ampliamente como vehículo de transporte de probióticos a los consumidores. Las leches fermentadas no sólo son nutritivas, sino que también se ven como agentes terapéuticos que favorecen el bienestar de la persona al ejercer efectos sobre funciones inmunológicas (Adhikari *et al.*, 2003).

El yogurt es apreciado particularmente por sus cualidades benéficas y sensoriales y por los beneficios sobre la salud, relacionados con la presencia de grandes poblaciones de bacterias ácido lácticas viables. Un estudio reciente en más de 90 categorías de varios alimentos lo colocaron en la posición 14 en términos de incremento de mercado en el 2001. Su consumo en Europa ha incrementado en los últimos 5 años y ahora su

consumo es de 6.5 a 15 k por año por persona. El yogurt debe contener normalmente por lo menos  $10^6$  UFC/mL al momento de venta, sin embargo, estos límites no son comunes en todas las legislaciones nacionales a través del mundo. Por ejemplo, Francia y España tienen como mínimo requerido de  $5 \times 10^8$  CFU/, Suiza ha establecido  $10^6$ , Japón  $10^7$  y Portugal  $10^8$  CFU/g (Birolo et al., 2000; Corich et al., 2004). En Italia, no existe legislación específica y la producción de yogurt está regulada por una serie de Circulares del Ministerio de Salud. El mínimo propuesto es de  $10^6$  CFU// y más del 50% del mercado del yogurt está controlado por 4 grandes productores, mientras que el resto está distribuido por varios pequeños productores con un alto nivel de difusión local (Corich et al., 2004).

El mayor metabolito de estas bacterias lácticas es el ácido láctico el cual imparte además de vida de anaquel debida al ácido producido, sabor (Liu, 2003), al igual que contribuyen al aroma y textura (Monnet et al., 2003).

El principal problema asociado con los cultivos en leches fermentadas es la falta de tolerancia a la acidez por parte de algunas cepas. Cuando el ácido láctico se incrementa, los niveles de pH disminuyen durante la fermentación. La sobreacidificación o acidificación postproducción se debe a la disminución de pH durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración. La acidificación excesiva se debe al crecimiento incontrolable de cepas de *L. bulgaricus* a pH bajos y temperaturas de acidificación. Se puede prevenir al aplicar

buenas prácticas de manufactura utilizando cultivos con comportamiento reducido de sobreacidificación. La sobrevivencia de microorganismos se ve afectada por este ambiente ácido. El *L. acidophilus* muestra una disminución rápida en pH de 2.0 pero no tanto a pH de 4.0. Se reporta que *L. acidophilus* sobrevive mejor que los cultivos básicos del yogurt bajo condiciones ácidas (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

En un yogurt, el pH puede descender hasta 3.6 inhibiendo a bacterias del tipo bifidobacteria ya que su crecimiento se retarda por debajo de pH 5.0, por lo tanto se recomienda que los productos en donde se utilice esta bacteria se conserven a pH por arriba de 4.6 (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001)

### **Bacterias productoras de CLA**

El CLA se encuentra naturalmente en carne, ave, pescado, queso, mantequilla, leche y aceites vegetales. Las grasas de rumiantes son las fuentes naturales más ricas. Los altos niveles de CLA en grasas de origen animal se originan parcialmente por las bacterias del rumen. La conversión de LA a CLA por estas bacterias fue reportada primero en la década de 1960' s (Kim y Liu, 2002). El organismo ruminal más ampliamente conocido es el *Butyrivibrio fibrisolvens*, identificado como el responsable de la formación de CLA en la biohidrogenación del AL. Más aún, ya fue posible separar y purificar la enzima capaz de dicha conversión a partir del *B. fibrisolvens* (Lin et al., 2002).

Además de la habilidad de las bacterias del rumen para formar CLA a partir de AL de la dieta, se ha demostrado que ciertos cultivos de las fermentaciones alimenticias poseen la habilidad para generar CLA *cis-9, trans-11* (Jiang y Fonden, 1998), (Lin et al., 2002).

El CLA formado por las propionibacterias principalmente se encuentra en la fase extracelular y normalmente produce los isómeros *cis-9, trans-11* y *trans-9, cis-11*. Desde hace muchos años se tiene conocimiento acerca del efecto antibacteriano del AL libre considerándose que muchas cepas se inhiben a  $25 \mu\text{g}^{-1}$ . Las cepas de propionibacterias que registran inhibición son *P. freudenreichii* spp *freudenreichii* y spp *shermanii*, mientras que *P. jensenii* y *P. thoenii* no se inhiben. De hecho se ha propuesto clasificar a estas bacterias en 2 grupos de acuerdo a sus diferencias en composición de ácidos grasos (Jiang y Fonden, 1998).

En las cepas que producen CLA, existe una correlación positiva en la producción de CLA y la habilidad para tolerar el AL libre, lo que sugiere que la conversión del AL libre a CLA pudiera funcionar como un mecanismo de detoxificación (Jiang y Fonden, 1998). Esto mismo puede indicar que las cepas que sobreviven a concentraciones más altas de LA tienen mayor habilidad para generar CLA (Coakley et al., 2003).

La producción de CLA depende principalmente de la conversión enzimática del AL y puede ser sensible al pH del sistema. Durante el crecimiento de bacterias en la leche, el pH baja sustancialmente por la fermentación a ácido láctico, lo cual eventualmente detiene la producción de CLA. Aunque la proteína tiene capacidad buffer, el ácido láctico baja el

pH por debajo de 4.6 causando la formación de la cuajada, lo que puede interferir con el libre acceso del sustrato a la enzima bacteriana. Los pH bajos pueden también inactivar la isomerasa. Aunque la formación de ácido es necesaria para el desarrollo del sabor durante la producción de yogurt, pudiera ser una desventaja para la producción de CLA al crear un ambiente ácido (Kim y Liu, 2002).

La intensidad de las interacciones entre los probióticos, la matriz alimentaria y los organismos iniciadores, depende en gran parte del momento en que los probióticos son adicionados al producto –si ellos están presentes durante la fermentación, o si son adicionados después. En este último caso, las interacciones pueden ser mínimas ya que la adición puede ocurrir inmediatamente antes o aún después del enfriamiento por debajo de los 8 °C y la actividad metabólica de los iniciadores y los probióticos se ve disminuida por estas temperaturas. Sin embargo, con un almacenamiento prolongado, aún pequeñas interacciones pueden producir efectos importantes (Heller, 2001).

La composición química de los productos lácteos es de suma importancia para las actividades metabólicas de los microorganismos ya que éstos interactúan intensamente con el ambiente intercambiando componentes del medio por sus productos metabólicos. Las variables esenciales son la clase y la cantidad de carbohidratos disponibles, el grado de hidrólisis de las proteínas de la leche (esto determina la disponibilidad de aminoácidos esenciales), y la composición y el grado de hidrólisis de los lípidos (que determina la disponibilidad de ácidos grasos

de cadena corta en particular). Por otro lado, las propiedades proteolíticas y lipolíticas pueden ser importantes para degradaciones posteriores de proteína y lípidos ya que ejercen efectos considerables en el sabor y gusto de los productos lácteos (Heller, 2001).

### ***Streptococcus salivarius spp thermophilus***

El *S. salivarius spp thermophilus* se utiliza en producción de varias clases de quesos y leches fermentadas, donde su principal función es la producción de ácido láctico, compuestos aromáticos y exopolisacáridos (Pernoud *et al.*, 2004). Ejemplos tradicionales de estos productos son yogurt, quesos emmental, gruyere, parmigiano, grana, etc., donde se requieren temperaturas de incubación altas (45 °C) (Delcour *et al.*, 2000). Puede aislarse con Agar de Acetato Thalous tetrasódico glucosa formando colonias rojas o también con medio M17 a pH de 6.8 en donde forma colonias en forma de lente y crece a temperaturas de 50 °C (Carr *et al.*, 2002).

En contraste con otras bacterias ácido lácticas utilizadas como iniciadores, el *S. thermophilus* posee una ureasa que convierte la urea en amonio y dióxido de carbono. Durante el crecimiento de *S. thermophilus* en leche, la producción de amonio reduce la disminución del pH o induce un incremento temporal de pH. El *S. thermophilus* exhibe una marcada sensibilidad a los antibióticos y otras sustancias inhibitoras presentes en leche. Su destrucción puede ser causada por bacteriofagos (Oberman, 1985).

Aunque el *S. salivarius* spp *thermophilus* es altamente estable (disminuye por ~1 ciclo logarítmico) bajo condiciones normales de almacenamiento (4 °C) por un período de por lo menos 6 semanas (Borchers *et al.*, 2002). El *S. thermophilus* actúa como un buscador de oxígeno en un bioyogurt, lo que propicia un ambiente benéfico para *bifidobacterium* (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001)

### ***Lactobacilus delbrueckii* spp *bulgaricus***

Microorganismo utilizado en combinación con *S. thermophilus* para la producción de yogurt, caracterizado frecuentemente por una disminución durante su crecimiento antes de que se agote el azúcar (Mercade *et al.*, 2004). Fermenta la amigdalina y sacarosa, pero no la trealosa, salicina o celobiosa, no fermenta la lactosa o galactosa. No hidroliza la esculina, y crece a 45 °C. Sus colonias son pequeñas, planas y con orillas crenadas. Se asocia con plantas como papa. Es importante en la manufactura de bebidas alcohólicas como cerveza, ale, bourbon, whiskey escocés y ron debido a su habilidad para bajar el pH de la malta en fermentación y por tanto facilitar la digestión de almidones solubles en el proceso de trituración y por incrementar la acidez, no solo para solubilizar los almidones, sino por contribuir a reducir los niveles de contaminación por microorganismos (Carr *et al.*, 2002).

El *Lactobacilus delbrueckii* spp *bulgaricus* inicialmente incrementa su crecimiento, pero se detiene (por 3-6 ciclos logarítmicos) bajo

condiciones normales de almacenamiento a 4°C por 6 semanas (Borchers *et al.*, 2002).

### ***Lactobacillus acidophilus***

El *L. acidophilus* es un microaerófilo, que fermenta la fructosa, glucosa, celobiosa y maltosa además de que hidroliza la esculina y se encuentra asociado en productos lácteos. Produce factores que inhiben la proliferación de células tumorales y se cree que ejerce un efecto benéfico al restaurar la microbiota durante una enfermedad o tratamiento por antibiótico. En un estudio con pollos, *L. acidophilus* inhibió a *Salmonella typhimurium*, y *Staphylococcus aureus*, demostró, resultados similares en otro estudio contra *Escherichia coli*. El consumo de *L. acidophilus* también reduce la intolerancia a la lactosa en humanos y que reduce el riesgo de cáncer al reducir la conversión de procancerígenos en animales experimentales (Carr *et al.*, 2002). Se reporta que la leche fermentada que contiene ciertas cepas de bacterias viables de *L. acidophilus* es benéfica para aquellos que sufren desórdenes de tracto digestivo ya que tienen la capacidad de establecerse en el intestino compitiendo con otros microorganismos presentes y de esta forma regular la microbiota intestinal dañina (Oberman, 1985).

El *L. acidophilus* y el *B. bifidum* son menos estables que el *L. bulgaricus* cuando se adicionan al yogurt, y su número disminuye rápidamente, especialmente en aquellos productos en los cuales hay un incremento rápido de pH (Borchers *et al.*, 2002). Forma colonias como

“cangrejos o plumas” en Agar MRS, es sensible a la penicilina, pero resistente a sulfonaminas (Carr *et al.*, 2002). Produce una bacteriocina que actúa contra varias cepas de *L. bulgaricus*, asimismo algunas sustancias producidas por *L. bulgaricus* causan inestabilidad al *L. acidophilus*. El peróxido producido durante el almacenamiento parece ser responsable de este antagonismo (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

### **Interacción entre bacterias lácticas y próbióticas**

La mayoría de las interacciones entre especies que involucran los alimentos incluyen competencia por el mismo nutriente. Estas interacciones frecuentemente son breves, sin embargo, en muchos casos son más duraderas, especialmente en donde las dos especies viven en asociación cercana. A tal asociación se denomina “Simbiótica” (vivir juntos). Durante esta agrupación, si un miembro puede ser dañado se denomina parasitismo, si se encuentran relativamente sin afectarse una a la otra, comensalismo o bien si ambos pueden beneficiarse mutualismo. Muchos, sin embargo, llaman simbiosis a este último proceso en donde ambas especies resultan beneficiadas (Casadevall y Pirofski, 2000)

Diferentes combinaciones de inóculos lácticos y probióticos permiten la producción de alimentos fermentados lácteos con características tecnológicas definidas así como beneficios nutricionales. Sin embargo, las interacciones, ya sean benéficas o desfavorables entre estos cultivos puede generar cambios indeseables en la composición de la

microbiota durante la manufactura y el almacenamiento frío de los productos fermentados (Vinderola *et al.*, 2002).

La terminología utilizada para definir la interacción hospedero-microorganismo lleva cerca de un siglo. A principios de este período, se pensó que los microorganismos eran agresores que gobernaban la interacción hospedero-microorganismo dando como resultado una enfermedad. Posteriormente con nueva información se comprendió que esta relación no siempre causa enfermedad (Casadevall y Pirofski, 2000). Este reconocimiento guió hacia la introducción de términos que expliquen los estados en los cuales los microorganismos existen dentro del hospedero sin causar daño (Casadevall y Pirofski, 2000).

Durante su desarrollo en el yogurt, el *Streptococcus* crece más rápido al inicio de la fermentación, lo que favorece la acumulación de cantidades moderadas de ácido láctico y acético, acetaldehído, diacetil y ácido fórmico. La disponibilidad de formato y los cambios en el potencial óxido-reducción en el medio estimulan el crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* (Courtin y Rul, 2004).

El aspecto principal para la producción de productos lácteos probióticos es la interacción entre los probióticos y los inóculos. Aunque poco se conoce acerca de ésta interacción, los efectos antagónicos y los sinérgicos están bien establecidos. Por ejemplo, el cultivo clásico para un yogurt está caracterizado por una protosimbiosis entre *S. salivarius* spp *thermophilus* y *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*. Este sinergismo, visualizado como una acidificación acelerada y eficiente de la leche a través de la

multiplicación del cultivo y en una alimentación cruzada, no es una propiedad de las dos especies, sino de cepas específicas de estas especies (Cannella y Giusti, 2000; Heller, 2001). Muchos organismos se adaptan bien a su ambiente y al de otros. Un ejemplo interesante es el ejemplo del crecimiento mixto entre *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* en el yogurt, en donde *Lactobacillus* libera glicina e histidina, lo que promueve una producción más rápida del *Streptococcus* (Oberman, 1985), y por regla general, los Lactobacilos tienen una mayor actividad proteolítica que el Streptococos (Courtin y Rul, 2004).

Con el crecimiento simbiótico en el yogurt, *S. thermophilus* produce ácido láctico, lo que reduce el pH a un nivel óptimo para *L. bulgaricus*. El ácido producido y pequeñas cantidades de ácido fórmico estimulan el crecimiento de *L. bulgaricus*. El *S. thermophilus* se inhibe a pH de 4.2-4.4 mientras que *Lactobacillus* tolera valores de pH de 3.5-3.8. Después de aproximadamente tres horas de fermentación, el número de organismos deberá ser igual. En fermentaciones más duraderas, el crecimiento del *S. thermophilus* decrece mientras que *L. bulgaricus* continúa reduciendo el pH y produciendo cantidades excesivas de ácido láctico (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

### **Análisis para la determinación de ácido linoléico conjugado**

En el análisis del CLA es importante separar y cuantificar los diferentes isómeros posicionales y geométricos (Christie, 2003), aunque para aclarar su estructura completa y la de sus metabolitos, se requiere de información

sobre el tamaño de su cadena y la posición y geometría de sus dobles ligaduras (Kramer *et al.*, 1999). El análisis del CLA puede ser una labor relativamente fácil con el uso de la espectrofotometría, o compleja a través de cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta presión o bien por una combinación con la espectrofotometría de masas, dependiendo de si sólo se requiere la identificación o cuantificar cada uno de los isómeros (Christie, 2003).

### **Origen de la cromatografía**

La cromatografía data del año 1897, inició con el análisis del petróleo, realizado por Day, quien presentó sus resultados en la Primer Conferencia Internacional del Petróleo en 1900, aunque en la mayoría de los trabajos de investigación se cita a Tswett en 1903 como su iniciador (Bronz, 2002). Con algunas excepciones, los isómeros posicionales *cis* y *trans* de los ácidos grasos no se encuentran en la naturaleza, sino que son productos de la industria de los alimentos a partir de aceites y grasas y su determinación es, por tanto, de importancia sustancial en el control alimenticio. Debido a su similitud en propiedades químicas, el análisis de los isómeros ha sido siempre un desafío. La cromatografía es un método adecuado, e indudablemente, la cromatografía de gases (CG) tiene especial importancia, aunque al utilizarse la CG como método de separación, la sobre-posición entre los isómeros *cis* y *trans* no se puede evitar completamente (Nikolova-Damyanova y Momchilova, 2002).

La composición de ácidos grasos en grasas y aceites se determina por CG como un ácido graso de metil éster (FAME). Los FAME se preparan usualmente por saponificación de los glicerolípidos, seguida de una metilación. De los procedimientos que se han propuesto y utilizado para la preparación de FAME la catálisis por álcali tiene una gran ventaja por la rapidez y preparación simple (Ichihara, 1996). Se ha demostrado que la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés) con solvente isocrático es muy útil para analizar rápidamente al CLA no sólo como ésteres, sino también como triglicéridos (Adlof *et al.*, 2002).

### **Cromatografía de Gases**

Aunque la información de la composición de los isómeros de CLA provista por cromatografía de gases CG es incompleta, ya que los resultados están restringidos a proporcionar sólo el porcentaje total de CLA, frecuentemente es el único método utilizado en el análisis de ácidos grasos del CLA. Las identificaciones generalmente se limitan a las comparaciones entre los tiempos de retención contra un número limitado de estándares. En tejidos, los ácidos grasos de las grasas son relativamente simples mientras que en la grasa butírica pueden existir hasta 400 diferentes compuestos que difieren en el tamaño de la cadena, ramificaciones, insaturaciones, configuración geométrica y posicional o bien en grupos funcionales (Roach *et al.*, 2002).

El método más importante para investigar la composición de los ácidos grasos actualmente es la CG, técnica de separación que requiere de analitos volátiles y cuya principal reacción química para el análisis de lípidos es la transesterificación a metil ésteres (Fritsche y Steinhart, 1998)

Para los análisis de GC el cromatógrafo debe estar equipado con una columna capilar polar y un detector de ionización de flama (Roach *et al.*, 2002). Generalmente las columnas son de 60 a 100 metros, cubiertas con polietilen-glicol (Supelcowax) de tal manera que logre resoluciones razonables de los isómeros de CLA como ésteres metilados aunque las de 100 metros dan las mejores separaciones (Dobson, 2003). Aún así, los isómeros del CLA se empalman en un cromatograma de GC, por lo que es importante utilizar otros métodos cuando se quieren separar los isómeros (Jahreis *et al.*, 2000) (Figura 7).

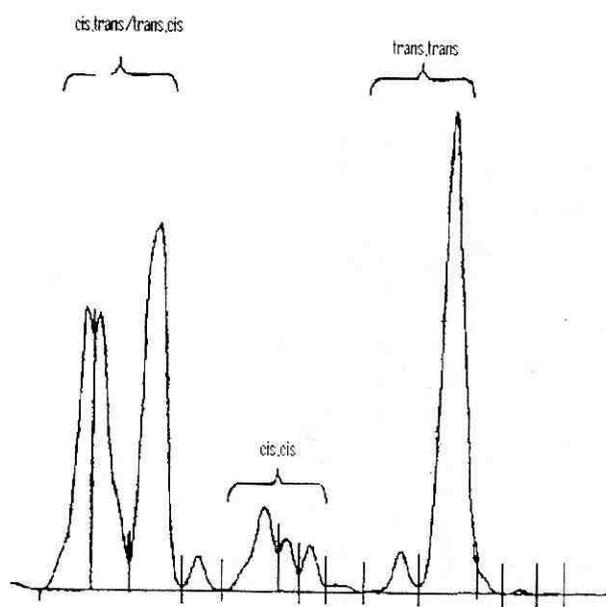


Figura 7. Perfil cromatográfico de CG de CLA-FAME obtenido utilizando detector de inoización de flama. Fuente: Kramer *et al.*, 2004

## **Cromatografía de líquidos de alta presión**

Los métodos disponibles de análisis por HPLC para determinar la composición de CLA en muestras biológicas consisten generalmente de una extracción de la grasa por el método de Bligh y Dyer (1959) o uno similar y el fraccionamiento de los lípidos por silica gel o cromatografía de capa fina o bien por HPLC. En las últimas décadas, ha llegado a ser de gran importancia la cromatografía del ion-plata para el fraccionamiento y caracterización de los lípidos (Adlof, 2003).

Desde su introducción en 1963, la cromatografía de iones plata ha sido una de las herramientas más importantes en el análisis de lípidos para su separación (Fritsche y Steinhart, 1998).

La HPLC con iones plata puede separar ácidos grasos de acuerdo a su configuración y al número de sus dobles ligaduras. El análisis se puede llevar a cabo con triglicéridos o con ácidos grasos después de su derivación. Recientemente se ha desarrollado una columna de iones plata estable para HPLC donde los iones de plata están ligados por enlaces a porciones de ácido fenilsulfónico y a una matriz de silica, en donde se logran excelentes separaciones de isómeros posicionales y geométricos de ácidos grasos insaturados. Es posible controlar muchos parámetros cromatográficos como la composición de la fase móvil, velocidad de flujo y temperatura de la columna con un alto grado de exactitud. Otras ventajas son la reutilización de la columna, separaciones simples y rápidas y cortos tiempos de análisis (Fritsche y Steinhart, 1998) (Figura 8).

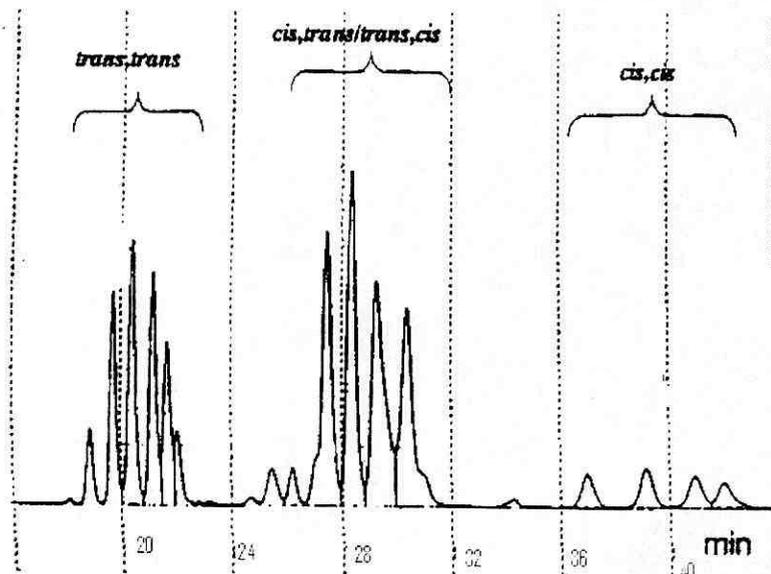


Figura 8. Separación de isómeros de CLA del mismo producto utilizando en la gráfica anterior por HPLC. Fuente: Kramer *et al.*, 2004

### Prospectivas

El concepto de que un alimento pudiera servir como una medicina fue concebido hace miles de años por el filósofo griego y padre de la medicina, Hipócrates, quien escribió: "Let food be thy medicine, and let medicine be thy food", ("Dejemos que la comida sea la medicina y dejemos que la medicina sea la comida), y actualmente el concepto de que la alimentación contenga un valor medicinal ha renacido con el término de "Alimentos funcionales" (Chow, 2002).

Los estudios científicos continúan estableciendo una fuerte relación entre los constituyentes de los alimentos y los suplementos dietéticos en ciertas enfermedades. No es sorprendente que las industrias de alimentos y de los suplementos dietéticos estén respondiendo a esta necesidad desarrollando nuevos productos y reposicionando los esfuerzos de los

productos anteriores para ayudar al consumidor a manejar su salud. Por ejemplo, el yogurt anteriormente solo se consideraba un componente de la dieta, sin embargo ahora también se le promociona en programas para bajar de peso después de que un estudio sobre productos lácteos demostró que el calcio en los productos lácteos es efectivo para perder peso (Champagne, 2005).

En años recientes se ha estimulado la investigación sobre los efectos potenciales de alimentos probióticos para optimizar su producción industrial, y a la fecha, los vehículos más importantes para las bacterias probióticas son alimentos fermentados como el yogurt (Vinderola *et al.*, 2000), y cada vez con mayor frecuencia se están adicionando cultivos probióticos a los alimentos (Dave y Shah, 1996).

Por otra parte, mucho se ha promovido que se reduzca el consumo de grasa en la dieta, lo cual condujo a un incremento en el consumo de leche baja en grasa. Sin embargo, la grasa bovina contiene muchas sustancias que pueden ser benéficas para la salud. El CLA es uno de estos componentes ya que se le han demostrado numerosos beneficios potenciales para la salud humana (Bell y Kennelly, 2001; Allred *et al.*, 2006). Este interés se ha hecho evidente a partir de la acumulación de evidencias en estudios desarrollados utilizando animales como modelos biológicos (Calder, 2002).

Aunque el número de investigaciones sobre el CLA se sigue incrementando, sigue existiendo falta de información sobre este compuesto en las diferentes disciplinas. En el sector salud, la mayoría de

los estudios han involucrado animales, por lo que el próximo paso deberá ser desarrollar estudios clínicos en humanos más detallados para explorar las diferentes actividades del CLA, especialmente en lo que se refiere a describir su mecanismo de acción. En el área de las ciencias básicas, la investigación deberá enfocarse a describir los cambios químicos y su síntesis química, de forma que se obtengan los isómeros puros. Se requiere continuar con la investigación sobre raciones en las dietas del ganado lechero para elevar el contenido de CLA en la leche. Asimismo, las investigaciones en el área de los alimentos introducen una amplia gama de posibilidades para su expansión en el desarrollo de productos funcionales a través de los diversos procesos de producción.

En este sentido, el presente estudio presenta la influencia de ciertas bacterias lácticas para la obtención de productos lácteos fermentados con alto contenido de CLA.

Para ello, una parte importante fue la diferenciación y descripción de la morfología de los organismos presentes en las interacciones en diferentes medios de cultivo. Además, se evaluó la producción de ácido láctico y se cuantificó la viabilidad de cada una de las bacteria en las diferentes asociaciones.

## Literatura citada general

- AbuGhazaeh, A. A., D. J. Schingoethe, A. R. Hippen, K. F. Kalscheru y L. A. Whilock. 2002. Feeding fish meal and extruded soybeans enhances the conjugated linoleic acid (CLA) content of milk. *J Dairy Sci* 85: 624-631.
- Addis, M., A. Cabiddu, G. Pinna, M. Decandia, G. Piredda, A. Pirisi y G. Molle. 2005. Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid *cis*-9, *trans*-11. *J Dairy Sci* 88: 3443-3454.
- Adhikari, K., A. Mustapha y I. U. Grün. 2003. Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *J Food Sci* 68: 275-280.
- Adlof, R. O. 1999. Preparation of unlabeled and isotope-labeled conjugated linoleic and related fatty acid isomers. *in* Advances in conjugated linoleic acid research. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. Kramer, M. W. Pariza y G. Nelson. Champaign, Ill, AOCS Press. 1: 21-38.
- Adlof, R. O. 2003. Application of Silver-Ion Chromatography to the Separation of Conjugated Linoleic Acid Isomers. *in* Advances in Conjugated Linoleic Acid Research. J. L. Sébédio, Christie W. W. and Adlof R. Champaign, Ill., AOCS. 2: 37-55.
- Adlof, R. O., A. Menzel y V. Dorovska-Taran. 2002. Analysis of conjugated linoleic acid-enriched triacylglycerol mixtures by isocratic silver-ion

- high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 953: 293-297.
- Allred, S. L., T. R. Dhiman, C. P. Brennand, R. C. Khanal, D. J. McMahon y N. D. Luchin. 2006. Milk and cheese from cows fed calcium salts of palm and fish oil alone or in combination with soybean products. *J Dairy Sci* 89: 234-248.
- Alonso, L., E. P. Cuesta y S. E. Gilliland. 2003. Production of Free Conjugated Linoleic Acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of Human Intestinal Origin. *J Dairy Sci* 86: 1941-1946.
- Andrae, J. G., S. K. Duckett, C. W. Hunt, G. T. Pritchard y F. N. Owens. 2001. Effects of feeding high-oil corn to beef steers on carcass characteristics and meat quality. *J Anim Sci* 79: 582-588.
- Aydin, R. 2005. Conjugated linoleic acid: Chemical structure, sources and biological properties. *Turk J Vet Anim Sci* 29: 189-195.
- Banni, S. 2002. Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 13: 261-266.
- Banni, S., G. Carta, E. Angioni, E. Murru, P. Scanu, M. P. Melis, D. E. Bauman, S. M. Fischer y C. Ip. 2001. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J Lipid Res* 42: 1056-1061.
- Bassaganya-Riera, J., R. Hontecillas y M. J. Wannemuehler. 2002. Nutritional impact of conjugated linoleic acid: A model functional food ingredient. *In Vitro Cel Dev Biol-Plant* 38: 241-246.

- Bauman, D. E. 2002. Conjugated Linoleic Acid (CLA) and milk fat: A Good News Story. Bulletin, Cornell University: 47-56.
- Bauman, D. E., D. M. Barbano, D. A. Dwyer y J. M. Griinari. 2000. Technical note: production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. J Dairy Sci 83: 2422-2425.
- Bauman, D. E., L. H. Baumgard, B. A. Corl y J. M. Griinari. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. Proc Am Soc Ani Sci.
- Bauman, D. E., R. W. Everett, W. H. Weiland y R. J. Collier. 1999. Production responses to bovine somatotropin in northeast dairy herds. J Dairy Sci 82: 2564-2573.
- Beaulieu, A. D., J. K. Drackley y N. R. Merchen. 2002. Concentrations of conjugated linoleic acid (*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid) are not increased in tissue lipids of cattle fed a high-concentrate diet supplemented with soybean oil. J Anim Sci 80: 847-61.
- Bell, J. A. y J. J. Kennelly. 2001. Conjugated linoleic acid enriched milk: A designer milk with potential. Adv Dairy Tech 13: 213-228.
- Belury, M. 2002. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. Am Soc Nutr Sci: 2995.
- Belury, M. A. 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. Ann Rev Nutr 22: 505-531.

- Birollo, G. A., J. A. Reinheimer y C. G. Vinderola. 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yogurt. *Food Res Int* 33: 799-805.
- Blum, S., D. Haller, A. Pfeifer y E. J. Schiffrin. 2002. Probiotics and immune response. *Clin Rev Allerg Immunol* 22: 287-309.
- Bonczar, G., M. Wszolek y A. Siuta. 2002. The effects of certain factors on the properties of yoghurt made from ewe's milk. *Food Chem* 79: 85-91.
- Borchers, A. T., C. L. Keen y M. E. Gershwin. 2002. The influence of yogurt/*Lactobacillus* on the innate and acquired immune response. *Clin Rev Allerg Immunol* 22: 207-230.
- Boylston, T. D. y D. C. Beitz. 2002. Conjugated linoleic acid and fatty acid composition of yogurt produced from milk of cows fed soy oil and conjugated linoleic acid. *J Food Sci* 67: 1973-1978.
- Brondz, I. 2002. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Anal Chim Acta* 465: 1-37.
- Burdge, G. C., B. Lupoli, J. J. Russell, S. Tricon, S. Kew, T. Banerjee, K. J. Shingfield, D. E. Beever, R. F. Grimble, C. M. Williams, P. Yaqoob y P. C. Calder. 2004. Incorporation of *cis*-9, *trans*-11 or *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid into plasma and cellular lipids in healthy men. *J Lipid Res* 45: 736-741.
- Calder, P. C. 2002. Conjugated linoleic acid in humans--reasons to be cheerful? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 123-126.

- Calder, P. C. y R. J. Deckelbaum. 2001. Fats in the new millennium: more complexity but a better understanding? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4: 89-91.
- Campbell, C. G., B. P. Chew, L. O. Luedecke y T. D. Shultz. 2000. Yogurt consumption does not enhance immune function in healthy premenopausal women. *Nutr Cancer* 37: 27-35.
- Campbell, W., M. A. Drake y D. K. Larick. 2003. The impact of Fortification with Conjugated Linoleic Acid (CLA) on the Quality of Fluid Milk. *J Dairy Sci* 86: 43-51.
- Cannella, C. y A. M. Giusti. 2000. Conjugated linoleic acid - A natural anticarcinogenic substance from animal food. Review. *Ital J Food Sci* 12: 123-127.
- Carr, F. J., D. Chill y N. Maida. 2002. The Lactic Bacteria: A literature Survey. *Crit Rev Microbiol* 28: 281-370.
- Casadevall, A. y L. A. Pirofski. 2000. Host-Pathogen Interactions: Basic Concepts of Microbial Commensalism, Colonization, Infection, and Disease. *Infect Immun* 68: 6511-6518.
- Chalupa, W., P. Moate y R. Boston. 2003. Ruminant Metabolism and Intestinal Digestion of Fatty acids. Sch Vet Med Univ Pennsylvania.
- Champagne, C. P. 2005. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Crit Rev in Food Sci Nutr* 45: 61-84.
- Chichlowski, M. W., J. W. Schroeder, C. S. Park, W. L. Keller y D. E. Schimek. 2005. Altering the fatty acids in milk fat by including canola seed in dairy cattle diets. *J Dairy Sci* 88: 3084-3094.

- Chick, H., H. S. Shin y Z. Ustunol. 2001. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *J Food Sci* 66: 478-481.
- Chow, J. 2002. Probiotics and prebiotics: A brief overview. *J Ren Nutr* 12: 76-86.
- Christie, W. W. 2003. Analysis of conjugated linoleic acid: an overview. *in* *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. J. L. Sébédio, Christie W. W. and Adlof R. Champaign, Ill., AOCS. 2: 1-12.
- Coakley, M., R. P. Ross, M. Nordgren, G. Fitzgerald, R. Devery y C. Stanton. 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *J Appl Microbiol* 94: 138-145.
- Coakley, M., R. P. Ross, M. Nordgren, G. Fitzgerald, R. Devery y C. Stanton. 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *J Appl Microbiol* 94: 138-45.
- Corich, V., A. Mattiazzi, E. Soldati, A. Carraro y A. Giacomini. 2004. Relationship between chemical and microbiological composition of commercial plain yogurts. *Ital J Food Sci* 16: 221-233.
- Courtin, P. y F. Rul. 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait* 84: 125-134.
- Dave, R. I., N. Ramaswamy y R. J. Baer. 2002. Changes in fatty acid composition during yogurt processing and their effects on yogurt and probiotic bacteria in milk procured from cows fed different diets. *Austr J Dairy Tech* 57: 197-202.

- Dave, R. I. y N. P. Shah. 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. J Dairy Sci 79: 1529-1536.
- DeLany, J. P., F. Blohm, A. A. Trullt, J. A. Scimeca y D. B. West. 1999. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. Am Physiol Soc: R1172-R1179.
- Delcour, J., T. Ferain y P. Hols. 2000. Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria. Curr Opin Biotech 11: 497-504.
- Destailats, F., C. Japiot, P. Y. Chouinard, J. Arul y P. Angers. 2005. Rearrangement of rumenic acid in ruminant fats: A marker of thermal treatment. J Dairy Sci 88: 1631-1635.
- Dhiman, T. R., N. Seung-Hee y A. L. Ure. 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and mat. Crit Rev Food Sci Nutr 45: 463-482.
- Dobson, G. 2003. Gas chromatography-Mass Spectrometry of Conjugated Linoleic Acids and Metabolites. in Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, J. L. Sébédio, W. W. Christie y R. O. Adlof. Champaign, Ill., AOCS Press. 2: 13-36.
- Dongyan, S., X. Zhu, S. Qiao, F. S. y D. Li. 2004. Effects of conjugated linoleic acid levels and feeding intervals on performance, carcass traits and fatty acid composition of finishing barrows. Arch Ani Nutr 58: 277-286.

- Emken, E. A., R. O. Adlof, S. Duval, G. Nelson y P. Benito. 2002. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on metabolism of isotope-labeled oleic, linoleic, and CLA isomers in women. *Lipids* 37: 741-750.
- Evans, M. E., J. M. Brown y M. K. McIntosh. 2002. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. Review. *J Nutr Biochem* 13: 508-516.
- Fogelholm, M. 2003. Dairy Products, Meat and Sports Performance. *Sports Med* 33: 615-631.
- Fritsche, J. y H. Steinhart. 1998. Analysis, occurrence, and physiological properties of *trans* fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA) - a review. *Fett-Lipid* 100: 190-210.
- Garcia, H. S., K. J. Keough, J. A. Arcos y C. G. Hill. 2000. Interesterification (acidolysis) of butterfat with conjugated linoleic acid in a batch reactor. *J Dairy Sci* 83: 371-377.
- Givens, D. I. 2005. The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods in relation to chronic disease. *Proc Nutr Soc* 64: 395-402.
- Griinari, J. M. y D. E. Bauman. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. *in Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Champaign, AMER OIL CHEMISTS SOC. 1: 180-200.

- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Pamquist y K. V. Nurmela. 1998. Transoctadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81: 1251-1261.
- Hansen, E. B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int J Food Microbiol* 78: 119-131.
- Hayek, M. G., S. N. Han, D. Wu, B. A. M. Watkins, M. Meydani, J. L. Dorsey, D. E. Smith y S. N. Meydai. 1999. Dietary Conjugated Linoleic Acid Influences the Immune Response of Young and Old C57BL/6NCrIBR Mice. *J Nutr* 129: 32-38.
- Heller, K. J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods; product characteristics and starter organisms. *Am J Clin Nutr* 73: 374S-379S.
- Herzallah, S. M., M. A. Humeid y K. M. Al-Ismael. 2005. Effect of heating and processing methods of milk and dairy products on conjugated linoleic acid and *trans* fatty acid isomer content. *J Dairy Sci* 88: 1301-1310.
- Heyman, M. y S. Menard. 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 59: 1151-1165.
- Hill, C. G., S. Ghannouchi y H. S. Garcia. 2001. Lipolysis of butter oil by immobilized lamb pregastric esterase: I. Uniresponse kinetics-pH and temperature effects. *J Dairy Sci* 84: 1034-1043.
- Hillbrick, G. y M. A. Augustin. 2002. Milkfat characteristics and functionality: opportunities for improvement. *Austr J Dairy Tech* 57: 45-51.

- Hilliam, M. 2003. Future for dairy products and ingredients in the functional foods market. *Austr J Dairy Tech* 58: 98-103.
- Hui, Y. 1992. Fermentation. *in Encyclopedia of Food Science and Technology*. Y. H. E. Hui, Wiley Interscience Publication. 2: 913-923.
- Ichihara, K. 1996. An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lait* 31: 535-539.
- Ip, C., S. Banni, E. Angioni, G. Carta, J. McGinley, H. J. Thompson, D. Barbano y D. E. Bauman. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J Nutr* 129: 2135-2142.
- Ip, C., Y. Dong, M. M. Ip, S. Banni, G. Carta, E. Angioni, E. Murru, S. Spada, M. P. Melis y A. Saebo. 2002. Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. *Nutr Cancer Int J* 43: 52-58.
- Jahreis, G. y J. Kraft. 2002. Sources of Conjugated linoleic acid in human diet. *Lipid Tech Feature* March 2002: 29-32.
- Jahreis, G., J. Kraft, F. Tischendorf, F. Schone y C. Von Loeffelholz. 2000. Conjugated linoleic acids: Physiological effects in animal and man with special regard to body composition. *Eur J Lipid Sci Tech* 102: 695-703.
- Jiang, J. L. y B. Fonden. 1998. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J Appl Microbiol* 85: 95-102.

- Jones, E. L., K. J. Shingfield, C. Khoen, A. K. Jones, B. Lupoll, A. S. Grandison, D. E. Beever, C. M. Williams, P. C. Calder y P. Yaqoob. 2005. Chemical, physical, and sensory properties of dairy products enriched with conjugated linoleic acid. *J Dairy Sci* 88: 2923-2937.
- Jung, M. Y. y M. O. Jung. 2002. Identification of conjugated linoleic acids in hydrogenated soybean oil by silver ion-impregnated HPLC and gas chromatography-ion impacted mass spectrometry of their 4,4-dimethyloxazoline derivatives. *J Agr Food Chem* 50: 6188-6193.
- Karagül-Yüceer, Y., J. C. Wilson y C. H. White. 2001. Formulations and Processing of Yogurt affect the microbial Quality of Carbonated Yogurt. *J Dairy Sci* 84: 543-550.
- Kay, J. K., T. R. Mackle, M. J. Auldist, N. A. Thomson y D. E. Bauman. 2004. Endogenous synthesis and enhancement of conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows. *J Dairy Sci* 87: 369-378.
- Kazala, E. C., F. J. Lozeman, P. S. Mir, A. Laroche, D. R. Bailey y R. J. Weselake. 1999. Relationship of fatty acid composition to intramuscular fat content in beef from crossbred Wagyu cattle. *J Anim Sci* 77: 1717-25.
- Kelly, G. S. 2001. Conjugated linoleic acid: a review. *Altern Med Rev* 6: 367-382.
- Kelly, M. L., E. S. Kolver, D. E. Bauman, M. E. Van Amburgh y L. D. Muller. 1998. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *J Dairy Sci* 81: 1630-1636.

- Khanal, R. C., T. R. Dhiman, A. L. Ure, C. P. Brennand, R. L. Boman y D. J. McMahon. 2005. Consumer acceptability of Conjugated Linoleic Acid-enriched milk and cheddar cheese from cows grazing on pasture. *J Dairy Sci* 88: 1837-1847.
- Khanal, R. C. y K. C. Olson. 2004. Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: A review. *Pak J Nutr* 82: 82.
- Kim, Y. J. y R. H. Liu. 1999. Selective Increase in conjugated linoleic acid in milk fat by crystalization. *J Food Sci* 64: 792-795.
- Kim, Y. J. y R. H. Liu. 2002. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *J Food Sci* 67: 1731-1737.
- Kramer, J. K., C. Cruz-Hernández, Z. Deng, J. Zhou, G. Jahreis y M. E. Dugan. 2004. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am J Clin Nutr* 79: 1137S-1145S.
- Kramer, J. K., N. Sehat, J. Fritsche, M. M. Mossoba, K. Eulitz, M. P. Yurawecz y Y. Ku. 1999. Separation of conjugated fatty acid isomers. *in Advances in Conjugated Acid Research*. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza y G. J. Nelson. Champaign, Il, AOCS. 1: 83-109.
- Kritchevsky, D. 2000. Conjugated linoleic acid. Review. *Br Nutr Found Nutr Bull*. 25: 25-27.

- Lajolo, F. M. 2002. Functional foods: Latin American perspectives. *Br J Nutr* 88 Suppl 2: 14S-150S.
- Lawson, R. E., A. R. Moss y D. I. Givens. 2001. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. *Nutr Res Rev* 14: 153-172.
- Lee, K. W., H. J. Lee, H. Y. Cho y Y. J. Kim. 2005. Role of the conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. *Crit Rev Food Sci Technol* 45: 135-144.
- Lin, H., T. D. Boylston, M. J. Chang, L. O. Luedecke y T. D. Shultz. 1995. Survey of the Conjugated Linoleic acid contents of Dairy Products. *J Dairy Sci* 78: 2358-2365.
- Lin, H., T. D. Boylston, L. O. Luedecke y T. D. Shultz. 1998. Factors affecting the conjugated linoleic acid content in cheddar cheese. *J Agr Food Chem* 46: 801-807.
- Lin, T. Y. 1999. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chem* 67: 1-5.
- Lin, T. Y. 2003. Influence of lactic cultures, linoleic and fructo-oligosacharides on CLA concentration in non fat set yogurt. *Austr J Dairy Tech* 58: 11-14.
- Lin, T. Y. 2006. Conjugated linoleic acid production by cells and enzyme extract of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* with additions of differnt fatty acids. *Food Chemistry* 94: 437-441.

- Lin, T. Y., T. H. Hung y T. S. Cheng. 2005. Conjugated linoleic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. Food Chemistry 92: 23-28.
- Lin, T. Y., C. W. Lin y Y. J. Wang. 2002. Linoleic acid isomerase activity in enzyme extracts from *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. J Food Sci 67: 1502-1505.
- Liu, S. Q. 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. Food Microbiol 83: 115-131.
- Loor, J. J., J. H. Herbein y C. E. Polan. 2002. *Trans*18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat of grazing cows fed a grain supplement containing solvent-extracted or mechanically extracted soybean Meal. J Dairy Sci 85: 1197-1207.
- Lourens-Hattingh, A. y B. C. Viljoen. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. Int Dairy J 11: 1-17.
- Marteau, P. y M. C. Boutron-Ruault. 2002. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. Br J Nutr 87 Suppl 2: S153-157.
- Marteau, P., P. Seksik y R. Jian. 2002. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. Br J Nutr 88 Suppl 1: S51-57.
- Marteau, P. R. 2002. Probiotics in clinical conditions. Clin Rev Allerg Immunol 22: 255-273.

- McGuire, M. A. y M. K. McGuire. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. Proc Am Soc Ani Sci: 1-8.
- Mercade, M., F. Duperray y P. Loubière. 2004. Energetic analysis of cultures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*: identification of the type of control between catabolism and anabolism. Lait 84: 39-47.
- Monnet, C., C. Béal y G. Corrieu. 2003. Improvement of the resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* to Freezing by Natural Selection. J Dairy Sci 86: 3048-3053.
- Mosley, E. E., G. L. Powell, M. B. Riley y T. C. Jenkins. 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. J Lipid Res 43: 290-296.
- Moya-Camarena, S. Y. y M. A. Belury. 1999. Species differences in the metabolism and regulation of gene expression by conjugated linoleic acid. Review. Nutr Rev 57: 336-340.
- Nagao, K. y T. Yanagita. 2005. Conjugated fatty acids in food and their health benefits. J Biosci and bioeng 100: 152-157.
- Nikbin, S. y W. Ha. 2000. Immunologic effects of yogurt. Am J Clin Nutr 71: 861-872.
- Nikolova-Damyanova, B. y S. V. Momchilova. 2002. Silver ion HPLC for the analysis of positionally isomeric fatty acids. J Liq Chromatogr R T 25: 1947-1965.

- Oberman, H. 1985. Fermented milks. *in* Microbiology of Fermented Foods. B. J. Wood. England, Elsevier Applied Science Publishers. 1: 167-195.
- Ogawa, J., S. Kishino, A. Ando, S. Sugimoto, K. Mihara y S. Shimizu. 2005. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J Biosci and bioeng* 100: 355-364.
- Oh, D., G. Hong, Y. Lee, S. Min, H. Sin y S. K. Cho. 2003. Production of conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium* strains. *World J Microb Biot* 19: 907-912.
- Ohio State University. 2005. Milk Fat - Its Good for you.[online] Ohio State University. Bulletin Extension Research. Special Circular 182-01 [http://www.ohioline.osu.edu/sc182/sc182\\_5d.html](http://www.ohioline.osu.edu/sc182/sc182_5d.html) [Consulta: Diciembre 2005].
- Ouwehand, A. C., S. Salminen y E. Isolauri. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Anton Leeuw Int J C* 82: 279-289.
- Pariza, M. W. 1999. The Biological Activities of Conjugated Linoleic Acid. *in* Advances in Conjugated Acid Research. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza y G. J. Nelson. Champaign, Il, AOCS. 1: 12-20.
- Pariza, M. W., Y. Park y M. E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. Review. *Prog Lipid Res* 40: 283-298.
- Park, Y., K. J. Albright y M. W. Pariza. 2005. Effects of conjugated linoleic acid on long term feeding in Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol* 43: 1273-1279.

- Parodi, P., W. 1999. Conjugated Linoleic Acid: The Early Years. *in* Advances in Conjugated Acid Research. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza y G. J. Nelson. Champaign, Il., AOCS. 1: 1-11.
- Parodi, P., W. 2003. Conjugated Linoleic Acid in Food. *in* Advances in conjugated linoleic acid research. J. L. Sébédio, W. W. Christie y R. O. Adlof. Champaign, Ill, AOCS Press. 2: 101-122.
- Parodi, P. W. 1999. Conjugated Linoleic Acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J Dairy Sci* 82: 1339-1349.
- Pernoud, S., C. Fremaux, A. Sepulchre, G. Corrieu y C. Monnet. 2004. Effect of the metabolism of urea on the acidifying activity of *Streptococcus thermophilus*. *J Dairy Sci* 87: 550-555.
- Peterson, D. G., J. A. Kelsey y D. E. Bauman. 2002. Analysis of variation in *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat of dairy cows. *J Dairy Sci* 85: 1764-1766.
- Rainio, A., M. Vahvaselkä, T. Suomalainen y S. Laakso. 2001. Reduction of linoleic acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Can J Microbiol* 47: 735-740.
- Raloff, J. 2001. The Good *trans* Fat. *Sci News*. 159: 136-138.
- Ramaswamy, N., R. J. Baer, D. J. Schingoethe, A. R. Hippen, K. M. Kasperson y L. A. Whitlock. 2001. Composition and flavor of milk and butter from cows fed fish oil, extruded soybeans, or their combination. *J Dairy Sci* 84: 2144-2151.

- Reaney, M. J. T., Y.-D. Liu y N. D. Westcott. 1999. Commercial production of Conjugated linoleic acid. *in* Advances in Conjugated Linoleic Acid Research. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. Kramer, M. W. Pariza y G. Nelson. Champaign, Ill, AOCS Press. 1: 39-54.
- Roach, J. A., M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz y J. K. Kramer. 2002. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Anal Chim Acta* 465: 207-226.
- Sanhueza, J., S. Nieto y B. Valenzuela. 2002. Acido linoléico conjugado: un ácido graso con isomería trans potencialmente beneficioso. *Rev Chilena Nutr* 29: 98-105.
- Solomon, R., L. E. Chase, D. Ben-Ghedalia y D. E. Bauman. 2000. The effect of non structural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *J Dairy Sci* 83: 1322-1329.
- Stanton, C. y F. I. Lawless. 1997. Dietary Influences on Bovine Milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content. *J Food Sci* 62: 1083-1086.
- Tanaka, K. 2005. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *Ani Sci J* 76: 291-303.
- Tharmaraj, N. y N. P. Shah. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. *J Dairy Sci* 86: 2288-2296.

- Thorsdottir, I., J. Hill y A. Ramel. 2002. Seasonal variation in cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic acid content in milk fat from nordic countries. *J Dairy Sci* 87: 2800-2802.
- Tricon, S., G. C. Burdge, S. Kew, T. Banerjee, J. J. Russell, E. L. Jones, R. F. Grimble, C. M. Williams, P. Yaqoob y P. C. Calder. 2004. Opposing effects of *cis*-9, *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 80: 614-620.
- Vaningelgem, F., M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany, M. Vancanneyt, J. Swings y L. D. Vuyst. 2004. Biodiversity of Exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl Environ Microb* 70: 900-912.
- Verschuren, P. M. 2002. Functional foods: scientific and global perspectives. *Br J Nutr* 88 Suppl 2: S125-130.
- Vinderola, C. G., N. Bailo y J. A. Reinheimer. 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Res Int* 33: 97-102.
- Vinderola, C. G., P. Mocchiutti y J. A. Reinheimer. 2002. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J Dairy Sci* 85: 721-729.
- Vinderola, C. G., W. Rosello, D. Ghilberto y J. A. Reinheimer. 2000. Viability of probiotic (*bifidobacterium*, *lactobacillus acidophilus* and *lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentiian fresco cheese. *J Dairy Sci* 83: 1905-1911.

- Wang, Y. W. y P. J. Jones. 2004. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Intl J Obesity* 28: 941-955.
- Whigham, L. D., M. E. Cook y R. L. Atkinson. 2000. Conjugated Linoleic Acid: Implications for human health. *Pharmacol Res* 42: 503-510.
- Yang, M. y M. E. Cook. 2003. Dietary Conjugated Linoleic Acid Decreased Cachexia, Macrophage Tumor Necrosis Factor- Production, and Modifies Splenocyte Cytokines Production. *Exp Biol Med* 228: 51-58.
- Yu, L., D. Adams y M. Gabel. 2002. Conjugated linoleic acid isomers differ in their free radical scavenging properties. *J Agr Food Chem* 50: 4135-4140.
- Yu, L., D. Adams y B. A. Watkins. 2003. Comparison of commercial supplements containing conjugated linoleic acids. *J Food Comp Anal* 16: 419-429.
- Zheng, H. C., J. X. Liu, J. H. Yao, Q. Yuan, H. W. Ye, J. A. Ye y Y. M. Wu. 2005. Effects of dietary sources of vegetable oils on performance of high yielding lactating cows and conjugated linoleic acids in milk. *J Dairy Sci* 88: 2037-2042.

## Artículos en revisión

**Production of Conjugated Linoleic Acid and actid Acid by a  
Mixed Culture of *L. acidophilus* and Yogurt Bacteria**

**Artículo 1. Enviado a la Revista Journal of Dairy Science**

Febrero 2006

SHORT COMMUNICATION: CLA PRODUCTION BY PROBIOTIC AND  
YOGHURT BACTERIA

**Production of Conjugated Linoleic Acid and Lactic Acid by a Mixed  
Culture of *L. acidophilus* and Yogurt Bacteria**

Ramírez-Baca P.\*<sup>1, 2</sup>, Padilla-Escárcega, E. H.<sup>1</sup>, Torres-Ceniceros, S.<sup>1</sup>,  
Rodríguez-Cervantes, C.<sup>1</sup>, Meza-Velásquez, J. A.<sup>1</sup>, Esparza-González,  
S.<sup>1</sup>, Vásquez-Arroyo, J.<sup>1, 2</sup>, Rodríguez-Martínez, R.<sup>2</sup>, M., Nevárez-  
Moorillón, G.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias  
Químicas

Av. Artículo 123 s/n Fracc Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. México

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Antonio Agraria Antonio Narro  
Periférico y Carr Sta. Fé, Torreón, Coah. México

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas.  
P.O. Box 1542-C Chihuahua, Chih. Mexico

\*Corresponding author:

e-mail address: ramirezbp2000@yahoo.com.mx

Tel (871) 715-8810 Fax (871) 715-2964

## ABSTRACT

CLA is a mixture of positional and geometrical linoleic acid isomers with nutritional and health beneficial properties such as being an antiatherosclerotic, anticarcinogen and antidiabetic agent and an immune system modulator naturally found in food products with fats from animal origin. Since yogurt has an important role because of its nutritional properties and benefits to digestive tract, the objective of this study was to evaluate the acidification activity and CLA production of *L. acidophilus* associated or not with commercial mixed yogurt cultures, during milk fermentation. Whole milk was inoculated with *L. acidophilus* alone or *L. acidophilus* associated with *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* and incubated at 35°C. CLA and lactic acid production, as well as bacterial viable count was measured and data were analyzed considering time and interaction of microorganisms as factors for analysis. Results showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) by microorganism and incubation time for lactic acid production with a minimal value of 0.16% for the pure *L. acidophilus* culture and a maximum value of 0.69% for the combination of *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* culture. CLA production was higher ( $P < 0.05$ ) in *L. acidophilus* pure culture (100.16 ppm) and in *thermophilus*, *bulgaricus*, *acidophilus* (88.81 ppm), with the lowest value for the association *thermophilus*, *bulgaricus* (66.23 ppm). *S. thermophilus* showed the highest counts in all proved associations and *L. acidophilus* in association with *thermophilus*, *bulgaricus* showed the lowest growth. These results convey the importance of the mixed cultures in the CLA production

and the necessity to continue elucidating the biological mechanisms involved in CLA synthesis.

**KEY WORDS:** conjugated linoleic acid, lactic acid, *L acidophilus*

## INTRODUCTION

Conjugated linoleic acid (CLA) is a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid with conjugated bonds (Parodi, 1999; Bauman *et al.*, 2000; Beaulieu *et al.*, 2002; Belury, 2002; Calder, 2002; Yu *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Coakley *et al.*, 2003; Tricon *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005). The most active and important isomer of CLA is *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoic (Kay *et al.*, 2004), usually called "rumenic acid", and makes up to 80-85% of total CLA content in milk and dairy products. Concentrations of other isomers are *trans-trans* 5-9%, *trans-cis* 10-13%, and *cis-cis* 1% (Pariza, 1999; Jahreis *et al.*, 2000; Thorsdottir *et al.*, 2002; Destailats *et al.*, 2005).

CLA is a natural fatty acid produced in the animal's rumen by the fermentative bacteria *Butyrovibro fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to CLA. CLA is an intermediate compound in the rumen biohydrogenation process of fatty acids (Garcia *et al.*, 2000), and is mainly found in food products from ruminant animals, particularly in dairy products such as yogurt, milk and cheese, or in bovine and sheep meat (Oh *et al.*, 2003; Dongyan *et al.*, 2004), so animal fat is a natural source of CLA (Lin, 2003).

CLA content in most dairy products varies from 2.5-7.0 mg/g of fat (Lin *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1998), although there are reports of 30 mg CLA/g of fat. This variation seems to depend on the processing conditions or on the length of aging; in fact, there is a positive relationship between length of aging and CLA content in cheese, and a processed cheese often

contains more CLA (Cannella y Giusti, 2000). In milk, CLA concentration is increased by varying the level and sources of unsaturated fats in the cow diet (Chichlowski *et al.*, 2005). In the case of dairy products, fermented products contain more CLA than other dairy products (Oh *et al.*, 2003).

Fermented milks are not only nutritive, but they are also considered as therapeutic agents that enhance the well-being by exerting certain immunologic functions (Adhikari *et al.*, 2003). Yogurt production has grown increasingly worldwide because of its natural image, sensorial characteristics, nutritional and prophylactic properties, all of them related to a high number of viable lactic acid bacteria (Birolo *et al.*, 2000). Yogurt successful manufacture relies on the interaction between the two *thermophilic* lactic bacteria, *S thermophilus* and *L bulgaricus* (Corich *et al.*, 2004) since their major end-product in lactic fermentation is lactic acid, which lengthens the shelf life, improves flavoring (Liu, 2003), and contributes to aroma and texture of the final product (Monnet *et al.*, 2003). In order to increase CLA production with lactic acid bacteria, studies have been made using skim milk with added linoleic acid; however, there is not evidence of CLA production using whole milk with added *L. acidophilus* and yogurt bacteria to improve CLA and lactic acid production. The objective of this work was to evaluate the influence of *L. acidophilus* in fermented milk inoculated with *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* to produce CLA, lactic acid and to determine the viable count of each bacterial group.

## MATERIALS AND METHODS

Whole dry milk (Nido® Nestle, México, S. A. de C. V), reconstituted to 12% m/v, and sterilized at 121°C for 15 min, and commercial strains from lactic acid bacteria *S. salivarius* spp *thermophilus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus* and *L. acidophilus* (Rhodia Inc, Dairy Business, Madison, WI 53701, USA) were used to evaluate CLA and lactic acid production. All starters were pre-cultivated at 1.0% in 15 ml of reconstituted milk previously sterilized in a test tube with cap. To 50 ml of sterilized milk, 0.8% (v/v) from the pre-cultivated starter were inoculated for each treatment and incubated under aerobic conditions until its evaluation. When treatment involved associations, microorganisms were inoculated in equal amounts for each bacterium to obtain a total inoculum of 0.8%.

Fat extraction was made by weighting 10 g of the fermented milk and mixing with 8 ml distilled water, 10 ml methanol and 5.0 ml chloroform and stirring for two min (Bligh y Dyer, 1959; Roach *et al.*, 2002). The obtained mix was combined with 5.0 ml chloroform and stirred for two additional minutes. Product was centrifuged for 40 min to 500 x g. Inorganic material was separated (methanol and water), and the lower layer was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporated in a vacuum oven at 35°C to a 10 ml final volume (Lin, 2003) and stored to -20°C until further analysis (Alonso *et al.*, 2003). To hydrolyze, residue was mixed with 1.0 mg heneicosanoic acid (1.0 mg/ml of chloroform as internal standard) and NaOH (methanol 1.0 ml, 1N) at 100°C for 15 min. Fatty acids were methylated with 1.0 ml 14% BF<sub>3</sub> at room temperature (22°C) for 30 min.

Two ml hexane and 1.0 ml water were added and centrifuged at 500 x g during 10 min (Roach *et al.*, 2002). CLA analysis was made in an Agilent HPLC (Agilent Technologies model 1100 serie JP 13203197) equipped with two stainless steel silver-ion impregnated columns (Varian ChromSpher 5 for lipids 250 6 VC) with a particle size of 5µm (Chrompack, Bridgewater, N.J. US); an injector (Rheodyne de 20 µl model 7725) and an absorbance detector (Agilent model 1100 G1314A VWD serie DE11401066) operated at 234 nm. Mobile phase composition was acetonitrile in hexane 0.1% and used isocratically at 23°C with a flow rate of 1.0 ml/min adjusted to maintain head pressures at 45-50 bar. Isomer elutions were identified by comparing retention times with a methylated standard (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, US). CLA content was calculated from a calibration curve as µg CLA from the methylated peak area.

Lactic acid content in fermented milk was determinates by taking 9.0 ml of milk and adding four phenophtalein drops and titrating with NaOH 0.1 N. Acidity was reported as percent of lactic acid (Baron *et al.*, 2000), which was calculated according to: % acid = ml used x 0.090 x 0.1 x 100/9.

To evaluate bacterial growth, a peptonated solution was prepared (1.0 g Peptone, 8.5 g Sodium chloride, water 1.0 l adjusting pH to 7.0 ± 0.1 with 0.1 N NaOH) (Secretaria de Salubridad y Asistencia, 1995) and sterilized before decimal dilutions preparations. *L. acidophilus* and *L. delbrueckii* spp *bulgaricus* counts were evaluated with Mann-Rogosa and

Sharpe Agar (MRS) (DIFCO®, Becton Dickinson and Co. Sparks, MD 21152 USA) with a 0.5% sorbitol at 7.2 pH. MRS-sorbitol Agar was prepared by adding the sterilized solution through a 0.45 µm Millipore membrane just before plating. Samples were incubated at 37°C for 72 h with a CO<sub>2</sub> atmosphere (International IDF Standard 117, 1983; International IDF Standard 117A, 1988; Dave y Shah, 1996). *S. salivarius* spp *thermophilus* growth was evaluated on M17 Agar (DIFCO®, Becton Dickinson and Co. Sparks, MD 21152, USA) (International IDF Standard 117, 1983; Birolo *et al.*, 2000) in aerobic conditions.

All analysis were done by triplicate and data were analyzed by a GLM, evaluating treatment effects (different microorganisms and incubation times) and mean comparisons were done by Duncan's method using SAS software (SAS, 2005) at P < 0.05 significance level (Gill, 1988; Montgomery, 2005).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **CLA Content**

The CLA mean content (100.16 ppm) in fermented milks from *L. acidophilus* as a simple culture was different (P<0.05) from the one presented when this bacteria was in association with yogurt bacteria (66.23 ppm), but was similar (P>0.05) to the value obtained in the association *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* (Figure 1). Results showed that *L. acidophilus* has a higher capacity to produce CLA than yogurt cultures, suggesting the presence of linoleic acid isomerase activity by this bacteria.

(Lin, 2003; Lin, 2006). Lin (2003) reports CLA production (2.33  $\mu\text{g/g}$  yogurt) with a similar bacterial association, a lower CLA production (0.25  $\mu\text{g/g}$  yogurt) in a double association (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*) and an intermediate value for *L. acidophilus* (0.75  $\mu\text{g/g}$  yogurt) adding fructo-oligosaccharides and linoleic acid to skim milk.

Alonso *et al* (2003) reported higher CLA production (116.53  $\mu\text{g/ml}$ ) with *L. acidophilus* O16, although the strain L1 of *L. acidophilus* had lower values (54.31 $\mu\text{g/ml}$ ) after a 24 h incubation period, corresponding to the stationary growth phase, suggesting that these variations could be due to different pH in the culture media. These data indicate that when fermented milk is used, a higher CLA production can be obtained when inoculation time is increased. However, under these conditions, we recommend to evaluate the flavor and the consumer acceptability of the final product, since other lactic bacteria can produce an excessive lactic acid synthesis.

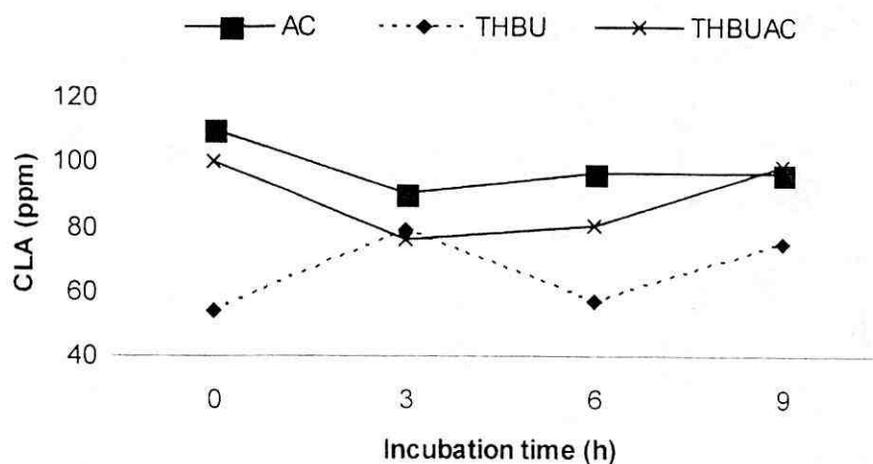


Figure 1. Conjugated linoleic acid (ppm) in fermented milk inoculated with yogurt bacteria (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*) and with *L. acidophilus*. AC= *L. acidophilus* culture. THBU= *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* mixed culture. THBUAC= *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* mixed culture

## Lactic Acid production

The content of lactic acid was different ( $P < 0.05$ ) due to the presence of different microorganism and to the incubation time. The quantity of lactic acid produced by *L. acidophilus* was not different over time (0.16%), but lactic acid production showed changes over time ( $P > 0.05$ ) in the *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and the mixture of the three organisms studied, which was similar between them ( $P < 0.05$ ), but different to the *L. acidophilus* (0.16%) simple culture (Figure 2).

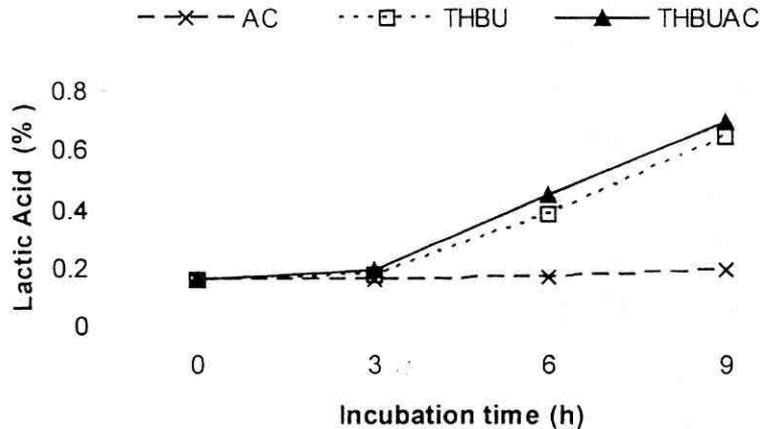


Figure 2. Lactic acid in a fermented milk inoculated with yogurt bacteria (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*) and *L. acidophilus*. . AC= *L. acidophilus* culture. THBU= *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* mixed culture. THBUAC= *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* mixed culture

It has been recognized that the associative growth between *S. thermophilus* y *L. delbreuckii* spp *bulgaricus* can influence the physicochemical properties and the level of aromatic compounds present in fermented milks as compared to those inoculated with simple strains (Bonczar *et al.*, 2002) and that in symbiotic growth, *S. thermophilus* produces lactic acid up to an optimum pH for *L. bulgaricus* growth; besides,

produced lactic acid and small amounts of formic acid stimulate its growth (Courtin y Rul, 2004), which explains the lactic acid production behavior observed in the associations in this study. However, there is not available information on the effect in lactic acid production when using a triple association like the analyzed in our trial.

### **Bacterial Growth**

*L. acidophilus* growth was similar ( $P>0.05$ ) when it was cultivated alone (9.74 UFC/ml) or associated with *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* (8.95 UFC/ml). In the same way, *L. acidophilus* growth was similar ( $P>0.05$ ) to the growth counts in all the *L. bulgaricus* cultures evaluated. On the other hand, *S. thermophilus* counts showed differences ( $P<0.05$ ) with the other microorganisms studied. These results can be attributed to the higher quantity of lactic acid produced, specially by *S. thermophilus*, according to reports indicating that lower *L. acidophilus* counts are due mainly to high acid and hydrogen peroxide contents in the mixed cultures (Figure 3) (Akin y Güler-A., 2005).

Microorganism, alone or mixed, are an alternative to obtain CLA from foods, with advantages such as their high multiplication capacity and their microbial safety, therefore, able to produce innocuous food. CLA yield after fermentation is primarily dependent on the type of microorganism used in the commercial milk cultures and its manipulation can alter CLA production. According to our results and due to their importance in human health, it is clear that the mechanisms of CLA production from

microorganisms require additional research in order to obtain information that can help on the elucidation of the biological factors that can provide higher amounts of natural CLA in functional foods.

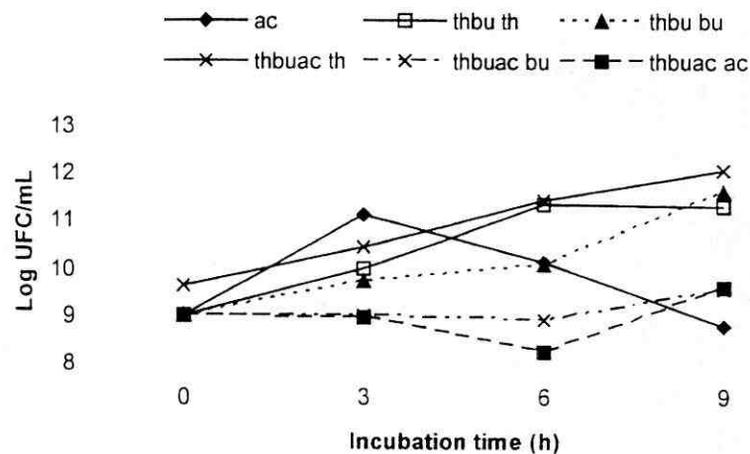


Figure 3. Bacteria growth for *L. acidophilus* (UFC/ml) associated with yogurt bacteria (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*) and as a simple culture at different incubation times. ac= Viable count of *L. acidophilus* culture. thbu th= Viable count of *S. thermophilus* in the *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* mixed culture. thbu bu= Viable count of *L. bulgaricus* in the *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* mixed culture. thbuac th= Viable count of *S. thermophilus* in the *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* mixed culture. thbuac bu= Viable count of *L. bulgaricus* in the *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* mixed culture. thbuac ac= Viable count of *L. acidophilus* in the *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* mixed culture

## ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by Fundación Produce Durango, A. C.

Grant No. UJED04-01.

## REFERENCES

- Adhikari, K., A. Mustapha y I. U. Grün. 2003. Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *J Food Sci* 68: 275-280.
- Akin, M. S. y Güler-A. 2005. Effect of different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt. *Ital J Food Sci* 17: 67-74.
- Alonso, L., E. P. Cuesta y S. E. Gilliland. 2003. Production of Free Conjugated Linoleic Acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of Human Intestinal Origin. *J Dairy Sci* 86: 1941-1946.
- Aydin, R. 2005. Conjugated linoleic acid: Chemical structure, sources and biological properties. *Turk J Vet Anim Sci* 29: 189-195.
- Banni, S., G. Carta, E. Angioni, E. Murru, P. Scanu, M. P. Melis, D. E. Bauman, S. M. Fischer y C. Ip. 2001. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J Lipid Res* 42: 1056-1061.
- Baron, M., D. Roy y J. C. Vuilleumard. 2000. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. *Lait* 80: 465-478.
- Bauman, D. E. 2002. Conjugated Linoleic Acid (CLA) and milk fat: A Good News Story. *Bulletin, Cornell University*: 47-56.

- Bauman, D. E., D. M. Barbano, D. A. Dwyer y J. M. Griinari. 2000. Technical note: production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. *J Dairy Sci* 83: 2422-2425.
- Beaulieu, A. D., J. K. Drackley y N. R. Merchen. 2002. Concentrations of conjugated linoleic acid (*cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid) are not increased in tissue lipids of cattle fed a high-concentrate diet supplemented with soybean oil. *J Anim Sci* 80: 847-61.
- Belury, M. A. 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Ann Rev Nutr* 22: 505-531.
- Birollo, G. A., J. A. Reinheimer y C. G. Vinderola. 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yogurt. *Food Res Int* 33: 799-805.
- Bligh, E. G. y W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 910.
- Bonczar, G., M. Wszolek y A. Siuta. 2002. The effects of certain factors on the properties of yoghurt made from ewe's milk. *Food Chem* 79: 85-91.
- Borchers, A. T., C. L. Keen y M. E. Gershwin. 2002. The influence of yogurt/*Lactobacillus* on the innate and acquired immune response. *Clin Rev Allerg Immunol* 22: 207-230.
- Boylston, T. D. y D. C. Beitz. 2002. Conjugated linoleic acid and fatty acid composition of yogurt produced from milk of cows fed soy oil and conjugated linoleic acid. *J Food Sci* 67: 1973-1978.

- Cachon, R., S. Jeanson, M. Aldarf y C. Divies. 2002. Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait* 82: 281-288.
- Calder, P. C. 2002. Conjugated linoleic acid in humans--reasons to be cheerful? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 123-126.
- Calder, P. C. y R. J. Deckelbaum. 2001. Fats in the new millennium: more complexity but a better understanding? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4: 89-91.
- Campbell, W., M. A. Drake y D. K. Larick. 2003. The impact of Fortification with Conjugated Linoleic Acid (CLA) on the Quality of Fluid Milk. *J Dairy Sci* 86: 43-51.
- Cannella, C. y A. M. Giusti. 2000. Conjugated linoleic acid - A natural anticarcinogenic substance from animal food. Review. *Ital J Food Sci* 12: 123-127.
- Chichlowski, M. W., J. W. Schroeder, C. S. Park, W. L. Keller y D. E. Schimek. 2005. Altering the fatty acids in milk fat by including canola seed in dairy cattle diets. *J Dairy Sci* 88: 3084-3094.
- Chick, H., H. S. Shin y Z. Ustunol. 2001. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *J Food Sci* 66: 478-481.
- Coakley, M., R. P. Ross, M. Nordgren, G. Fitzgerald, R. Devery y C. Stanton. 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *J Appl Microbiol* 94: 138-145.

- Corich, V., A. Mattiazzi, E. Soldati, A. Carraro y A. Giacomini. 2004. Relationship between chemical and microbiological composition of commercial plain yogurts. *Ital J Food Sci* 16: 221-233.
- Courtin, P. y F. Rul. 2003. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait* 84: 125-134.
- Courtin, P. y F. Rul. 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait* 84: 125-134.
- Dave, R. I. y N. P. Shah. 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *J Dairy Sci* 79: 1529-1536.
- Dave, R. I. y N. P. Shah. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J Dairy Sci* 81: 2804-2816.
- Davidson, R. H., S. E. Duncan, C. R. Hackney, W. N. Eigel y J. W. Boling. 2000. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *J Dairy Sci* 83: 666-673.
- Davis, J. G., T. R. Ashton y M. McCaskill. 1971. Enumeration and viability of *L. bulgaricus* and *St. thermophilus* in yogurts. *Dairy Ind.* 36: 569-573.
- DeNoni, I., L. Pellegrino y F. Masotti. 2004. Survey of selected chemical and microbiological characteristics of (plain or sweetened) natural yoghurts from the Italian market. *Lait* 84: 421-433.

- Destailats, F., P. A. Buyukpamukcu, F. Golay, F. Dionisi y F. Giuffrida. 2005. Letter to the Editor: Vaccenic and Rumenic acids, a distinct feature of ruminant fats. *J Dairy Sci* 88: 449.
- Destailats, F., C. Japiot, P. Y. Chouinard, J. Arul y P. Angers. 2005. Short communication: Rearrangement of rumenic acid in ruminant fats: A marker of thermal treatment. *J Dairy Sci* 88: 1631-1635.
- Diario Oficial de la Federación. 1995. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. NOM-110-SSA1-1994.
- Djouzi, Z., C. Andrieux, M. Degovry, C. Bouley y O. Szytit. 1997. The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. *Am Soc Nutr Sci*: 2260-2266.
- Dongyan, S., X. Zhu, S. Qiao, F. S. y D. Li. 2004. Effects of conjugated linoleic acid levels and feeding intervals on performance, carcass traits and fatty acid composition of finishing barrows. *Arch Ani Nutr* 58: 277-286.
- Evans, M. E., J. M. Brown y M. K. McIntosh. 2002. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. Review. *J Nutr Biochem* 13: 508-516.
- Garcia, H. S., K. J. Keough, J. A. Arcos y C. G. Hill. 2000. Interesterification (acidolysis) of butterfat with conjugated linoleic acid in a batch reactor. *J Dairy Sci* 83: 371-377.

- Gill, J. L. 1988. Repeated Measurement: Split-Plot trend analysis versus analysis of first differences. *Biometrics* 44: 289-297.
- Herzallah, S. M., M. A. Humeid y K. M. Al-Ismael. 2005. Effect of heating and processing methods of milk and dairy products on conjugated linoleic acid and *trans* fatty acid isomer content. *J Dairy Sci* 88: 1301-1310.
- Hill, C. G., S. Ghannouchi y H. S. Garcia. 2001. Lipolysis of butter oil by immobilized lamb pregastric esterase: I. Uniresponse kinetics-pH and temperature effects. *J Dairy Sci* 84: 1034-1043.
- Hillbrick, G. y M. A. Augustin. 2002. Milkfat characteristics and functionality: opportunities for improvement. *Austr J Dairy Tech* 57: 45-51.
- International IDF Standard 117. 1983. Yogurt. Enumeration of Characteristic Microorganisms colony count technique at 37 °C. International Dairy Federation. 117.
- International IDF Standard 117A. 1988. Yogurt. Enumeration of Characteristic Microorganisms colony count technique at 37 °C. International Dairy Federation. 117A.
- Jahreis, G. y J. Kraft. 2002. Sources of Conjugated linoleic acid in human diet. *Lipid Tech Feature* March 2002: 29-32.
- Jahreis, G., J. Kraft, F. Tischendorf, F. Schone y C. Von Loeffelholz. 2000. Conjugated linoleic acids: Physiological effects in animal and man with special regard to body composition. *Eur J Lipid Sci Tech* 102: 695-703.

- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids. *J Dairy Sci* 85: 295-350.
- Jiang, J. L. y B. Fonden. 1998. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J Appl Microbiol* 85: 95-102.
- Jung, M. Y. y M. O. Jung. 2002. Identification of conjugated linoleic acids in hydrogenated soybean oil by silver ion-impregnated HPLC and gas chromatography-ion impacted mass spectrometry of their 4,4-dimethyloxazoline derivatives. *J Agr Food Chem* 50: 6188-6193.
- Kay, J. K., T. R. Mackle, M. J. Auldist, N. A. Thomson y D. E. Bauman. 2004. Endogenous synthesis and enhancement of conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows. *J Dairy Sci* 87: 369-378.
- Kelly, M. L., E. S. Kolver, D. E. Bauman, M. E. Van Amburgh y L. D. Muller. 1998. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *J Dairy Sci* 81: 1630-1636.
- Khanal, R. C., T. R. Dhiman, A. L. Ure, C. P. Brennand, R. L. Boman y D. J. McMahon. 2005. Consumer acceptability of Conjugated Linoleic Acid-enriched milk and cheddar cheese from cows grazing on pasture. *J Dairy Sci* 88: 1837-1847.
- Lawson, R. E., A. R. Moss y D. I. Givens. 2001. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. *Nutr Res Rev* 14: 153-172.
- Lin, H., T. D. Boylston, M. J. Chang, L. O. Luedecke y T. D. Shultz. 1995. Survey of the Conjugated Linoleic acid contents of Dairy Products. *J Dairy Sci* 78: 2358-2365.

- Lin, T. Y. 2003. Influence of lactic cultures, linoleic and fructo-oligosacharides on CLA concentration in non fat set yogurt. *Austr J Dairy Tech* 58: 11-14.
- Lin, T. Y. 2006. Conjugated linoleic acid production by cells and enzyme extract of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with additions of differnt fatty acids. *Food Chemistry* 94: 437-441.
- Lin, T. Y., T. H. Hung y T. S. Cheng. 2005. Conjugated linoleic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. *Food Chemistry* 92: 23-28.
- Lin, T. Y., C. W. Lin y Y. J. Wang. 2002. Linoleic acid isomerase activity in enzyme extracts from *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii*. *J Food Sci* 67: 1502-1505.
- Liu, S. Q. 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Food Microbiol* 83: 115-131.
- Marshall, R. T. 1992. *Standard Methods for the examination of Dairy Products*. Washington, D. C., American Public Health Association.
- Martin, J. C. y K. Valeille. 2002. Conjugated linoleic acids: al the same or to everyone its own function? *Reprod Nutr Dev* 42: 525-536.
- McGuire, M. A. y M. K. McGuire. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with benefical effects on human health. *Proc Am Soc Ani Sci*: 1-8.

- Monnet, C., C. Béal y G. Corrieu. 2003. Improvement of the resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp bulgaricus to Freezing by Natural Selection. J Dairy Sci 86: 3048-3053.
- Montgomery, D. C. 2005. Experimental Design and statistical analysis. New York, N. Y., McGraw Hill, Book Company.
- Nogueira, C., H. Albano, P. Gibbs y P. Teixeira. 1998. Microbiological quality of portuguese yogurts. J Ind Microbiol Biotechnol 21: 19-21.
- Oh, D., G. Hong, Y. Lee, S. Min, H. Sin y S. K. Cho. 2003. Production of conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium* strains. World J Microb Biot 19: 907-912.
- Pariza, M. W. 1999. The Biological Activities of Conjugated Linoleic Acid. in Advances in Conjugated Acid Research. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza y G. J. Nelson. Champaign, IL, AOCS. 1: 12-20.
- Parodi, P. W. 1999. Conjugated Linoleic Acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. J Dairy Sci 82: 1339-1349.
- Radke-Mitchell, L. C. y W. E. Sandine. 1986. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. J Dairy Sci 69: 2558-2568.
- Ramaswamy, N., R. J. Baer, D. J. Schingoethe, A. R. Hippen, K. M. Kasperson y L. A. Whitlock. 2001. Short communication: Consumer evaluation of milk high in conjugated linoleic acid. J Dairy Sci 84: 1607-1609.

- Roach, J. A., M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz y J. K. Kramer. 2002. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Anal Chim Acta* 465: 207-226.
- SAS. 2005. Statistical Software, Version 8.2 Released SAS System licensed to UACH.
- Secretaria de Salubridad y Asistencia. 1995. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Shah, N. P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 83: 894-907.
- Stanton, C. y F. I. Lawless. 1997. Dietary Influences on Bovine Milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content. *J Food Sci* 62: 1083-1086.
- Tharmaraj, N. y N. P. Shah. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. *J Dairy Sci* 86: 2288-2296.
- Thorsdottir, I., J. Hill y A. Ramel. 2002. Seasonal variation in cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic acid content in milk fat from nordic countries. *J Dairy Sci* 87: 2800-2802.
- Tricon, S., G. C. Burdge, S. Kew, T. Banerjee, J. J. Russell, E. L. Jones, R. F. Grimble, C. M. Williams, P. Yaqoob y P. C. Calder. 2004. Opposing effects of cis-9, trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 80: 614-620.

- Vinderola, C. G., N. Bailo y J. A. Reinheimer. 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Res Int* 33: 97-102.
- Vinderola, C. G., P. Mocchiutti y J. A. Reinheimer. 2002. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J Dairy Sci* 85: 721-729.
- Vinderola, C. G., W. Rosello, D. Ghilberto y J. A. Reinheimer. 2000. Viability of probiotic (bifidobacterium, lactobacillus acidophilus and lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in argentiian fresco cheese. *J Dairy Sci* 83: 1905-1911.
- Yu, L., D. Adams y M. Gabel. 2002. Conjugated linoleic acid isomers differ in their free radical scavenging properties. *J Agr Food Chem* 50: 4135-4140.
- Yu, L., D. Adams y B. A. Watkins. 2003. Comparison of commercial supplements containing conjugated linoleic acids. *J Food Comp Anal* 16: 419-429.

**Morfología y diferenciación de colonias de tres tipos de  
bacterias lácticas**

**Artículo 2. Enviado a la Revista Agraria Nueva Época**

Febrero 2006

**Morfología y diferenciación de colonias de tres tipos de bacterias  
lácticas**

**Colonial morphology and differentiation of three lactic acid bacteria**

<sup>1</sup>Ramírez-Baca, P<sup>1,2</sup>, García-Cansino, B<sup>2</sup>., Moreno-Hernández, E<sup>2</sup>., Ríos-Carmona, J. M<sup>2</sup>., Rodríguez-Cisneros, C., Vásquez-Arroyo J<sup>1,2</sup>, Rodríguez-Martínez, R.<sup>1</sup>, Esparza-González, S<sup>2</sup>, Nevárez-Morrillón, G. V<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna  
Periférico y Carr. Santa Fe, Torreón, Coah. México

<sup>2</sup>Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias  
Químicas,

Av. Artículo 123 s/n Fracc. Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. México

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas  
Apdo. Postal 1542-C, Chihuahua, Chih. México

---

<sup>1</sup> Dirección de correspondencia: [ramirezbp2000@hotmail.com](mailto:ramirezbp2000@hotmail.com)  
Tel (871) 715-8810 Fax (871) 715-2964

## Resumen

El yogurt es un producto lácteo fermentado con cultivos lácticos que incluyen *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* como cultivos mixtos. A las bacterias probióticas como el *L. acidophilus* se les atribuyen propiedades terapéuticas, por lo que se pueden adicionar al yogurt con objeto de proporcionarle propiedades adicionales. El yogurt debe contener al menos  $10^6$  UFC/ml de bacterias viables al momento de su consumo, por lo cual, se considera importante la diferenciación de este tipo de bacterias en productos fermentados. El objetivo de este trabajo fue diferenciar con una combinación de medios de cultivo, los grupos bacterianos presentes en una leche fermentada inoculada con *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*. Se probaron seis diferentes medios de cultivo: 1) Agar con Leche descremada al 20%, 2) Agar con Leche descremada al 10%, 3) MRS, 4) MRS con sorbitol al 5%, 5) MRS con sorbitol al 5% y pH controlado a 5.4, 6) M17 con pH controlado a 7.2, y se evaluaron el crecimiento y la diferenciación en la morfología de cada una de las tres bacterias estudiadas. Los medios útiles para la diferenciación de las colonias fueron el MRS con sorbitol y pH ajustado a 5.4 para el *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*, en donde se observa una morfología diferente de cada uno de estos microorganismos. Las colonias del *L. bulgaricus* tuvieron aproximadamente 1.0 mm de diámetro, una morfología con bordes indefinidos, planas, color blanco translúcido y opacas. Las colonias de *L. acidophilus* fueron convexas, de forma circular, puntiformes y más pequeñas que las anteriores. El *S. thermophilus* se

desarrolló en el Agar M17, y se observaron colonias redondas, blancas, lisas y brillantes; en este medio, no se observó crecimiento de los lactobacilos. Se concluye que la utilización de los medios MRS con sorbitol al 5% y pH controlado a 5.4 y M17 para la diferenciación de las bacterias estudiadas.

**Palabras clave:** bacterias lácticas, diferenciación, *S thermophilus*, *L bulgaricus*, *L acidophilus*, yogurt

## **Abstract**

Yogurt is a milk fermented product with lactic cultures including *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* as mixed cultures. *L. acidophilus* is a probiotic bacterium with therapeutic properties that can be added to yogurt for additional nutritional properties. Yogurt must contain at least  $10^6$  CFU/ml of viable cells, and the differentiation of each bacterial group is an important control parameter. Therefore, the aim of this work was to differentiate *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. acidophilus* from a mixed culture, using different growth media. Media tested included: 1) Skim milk Agar at 20%, 2) Skim milk Agar at 10%, 3) MRS, 4) MRS with sorbitol 5%, 5) MRS with sorbitol and controlled pH at 5.4 6) M17 with controlled pH at 7.2. Organisms were tested for their growth capacity and colonial morphology in each growth media. *L. bulgaricus* and *L. acidophilus* can grow in MRS with sorbitol, pH 5.4, and can be differentiated by their colonial morphology. *L. bulgaricus* colonies were flat, with indefinite borders, translucent white and opalescent, approximately 1 mm diameter. *L. acidophilus* colonies were convex, circular, with sharp ends and smaller than *L. bulgaricus*. *S. thermophilus* colonies in M17 Agar were round, white, and bright; this media was specific for the organism. The combination of MRS + Sorbitol, pH 5.4 and M17 can be used to count and differentiate the lactic bacteria studied.

**Key words:** lactic acid bacteria, differentiation, viability, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, yogurt

## Introducción

El yogurt es un producto fermentado con cultivos lácticos consistentes de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Djouzi *et al.*, 1997; DeNoni *et al.*, 2004) que en general refleja la composición de la leche de la cual fue elaborado. Es una buena fuente de proteína, riboflavina y vitamina B12, así como de fósforo, magnesio y calcio (Borchers *et al.*, 2002), apreciado particularmente por sus características benéficas sobre la salud y sus propiedades sensoriales (Corich *et al.*, 2004). En años recientes, se ha vuelto una práctica común adicionar, además de las dos indispensables, algunas bacterias probióticas (*Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*) (Vinderola *et al.*, 2000; Vinderola *et al.*, 2000; Chick *et al.*, 2001; Borchers *et al.*, 2002) principalmente a causa de los efectos benéficos que se les atribuyen (Dave y Shah, 1996; Dave y Shah, 1998; Davidson *et al.*, 2000).

Aunque *S. thermophilus* es muy estable bajo condiciones normales de refrigeración por al menos 6 semanas, *L. bulgaricus* inicialmente incrementa su cuenta, pero después disminuye en el mismo período de tiempo, mientras que las especies de *L. acidophilus* y *B. bifidum* son aún menos estables cuando se adicionan al yogurt y su número declina en algunos yogurts, especialmente en aquellos en que el pH disminuye rápidamente (Borchers *et al.*, 2002), aunque por otra parte, su viabilidad se incrementa cuando la concentración de oxígeno disuelto es baja (Dave y Shah, 1998).

La relación simbiótica entre *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, ha sido utilizada por muchos años en la elaboración del yogurt (Radke-Mitchell y Sandine, 1986; Nogueira *et al.*, 1998; Corich *et al.*, 2004). El número de bacterias vivas debe permanecer alto durante toda su vida de anaquel (Corich *et al.*, 2004) y el éxito de la fermentación descansa en la sinergia entre ambas bacterias (Courtin y Rul, 2003). El yogurt, generalmente debe contener al menos  $10^6$  bacterias viables por gramo a la hora de su consumo, aunque estos límites no se observan en todos los países ya que en Francia y España, el mínimo requerido es de  $5 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  mientras que en Suiza se ha establecido como norma  $10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ , en Japón  $10^7$  UFC  $\text{g}^{-1}$  y en Portugal  $10^8$  UFC  $\text{g}^{-1}$  (Biorollo *et al.*, 2000; Corich *et al.*, 2004).

Considerando que ambas bacterias, tanto *S. thermophilus* como *L. bulgaricus* son capaces de crecer por si mismas en leche, ésta interacción indirecta y positiva se llama proto-cooperación y frecuentemente tiene un efecto benéfico en el crecimiento bacteriano, en la producción de ácido láctico y de compuestos aromáticos (Vinderola *et al.*, 2002). Se han identificado algunos de los efectos resultado de las actividades metabólicas de los patrones de ambas bacterias, tales como la producción de ácido pirúvico, fórmico y  $\text{CO}_2$  por *S. thermophilus*, que estimulan el crecimiento del *L. bulgaricus*, y la producción de péptidos y aminoácidos por *L. bulgaricus* que estimulan el crecimiento del *S. thermophilus* (Davis *et al.*, 1971; Courtin y Rul, 2003).

La actividad de los cultivos lácticos es de gran importancia en los procesos de producción de alimentos lácteos fermentados (Cachon *et al.*,

2002), por lo que debe tenerse un control sobre el tipo y número de bacterias viables en los productos que llegan al consumidor a fin de que contengan las características terapéuticas que se le atribuyen. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue describir la morfología y diferenciar las bacterias comerciales en una leche fermentada inoculada con *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*.

### **Materiales y Métodos**

Se trabajó con leche entera en polvo (Nido ® Nestlé de México, S.A. de C.V), reconstituida al 12% m/v, y esterilizada a 121 °C durante 15 minutos y con bacterias lácticas comerciales de *S. salivarius* spp *thermophilus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus* y *L. acidophilus* Rhodia Inc®, Dairy Business, Madison, WI 53701, USA). Todos los cultivos fueron pre-cultivados aeróbicamente, adicionando un 1.0% del cultivo a 15 ml de leche en polvo reconstituida y previamente esterilizada en un tubo de ensaye con rosca. Posteriormente, se prepararon 50 ml de leche, se esterilizaron bajo las mismas condiciones e inocularon para cada uno de los tratamientos al 0.8% (v/v) a partir del inóculo inicial. Se prepararon muestras de leches fermentadas, elaboradas con cultivos puros y con asociaciones de microorganismos *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*. Cuando el tratamiento involucró combinaciones, los microorganismos se sembraron en forma equivalente de manera que el contenido total fuera de 0.8%.

Se preparó la muestra acorde con la NOM-110-SSA1-1994, preparando una dilución primaria en solución peptonada (1.0 g peptona,

8.5 g cloruro de sodio, agua 1.0 l, pH  $7.0 \pm 0.1$ ) (Diario Oficial de la Federación, 1995).

Posteriormente, se hicieron diluciones decimales seriadas para cada una de las bacterias para su siembra en placa. Se prepararon diferentes medios de cultivo: 1) Agar con Leche descremada al 20%. 2) Agar con Leche descremada al 10%, 3) Agar Mann-Rogosa y Sharpe (MRS), 4) MRS con sorbitol al 0.5%, 5) MRS con sorbitol al 5% y pH controlado a 5.4, 6) Agar M17 con pH controlado a 7.2. Todos los medios de cultivo usados fueron DIFCO® (Becton Dickinson and Co. Sparks, MD 21152 USA). El medio de cultivo MRS-sorbitol se preparó adicionando una solución al 5% de sorbitol estéril filtrándolo a través de una membrana Millipore de  $0.45 \mu\text{m}$  al agar MRS estéril, justo antes de vaciarse. Los medios se inocularon de cada una de las diluciones por extensión en superficie, y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 72 horas en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  para los medios de Leche descremada y MRS. El Agar M17 se incubó en forma aeróbica a  $37^\circ\text{C}$  por 72 horas (International IDF Standard 117, 1983; International IDF Standard 117A, 1988; Marshall, 1992).

En cada uno de los medios de cultivo, se evaluó la morfología de las colonias de cada uno de los microorganismos y de sus combinaciones así como la posibilidad de diferenciarlos por su crecimiento o morfología en los diferentes medios.

## **Resultados y discusión**

### **Agar con Leche descremada**

El medio de cultivo Leche descremada al 20% coaguló al momento de esterilizarlo, lo cual no permitió la realización de las pruebas. En las pruebas en las que se utilizó el Agar leche descremada al 10% se sembraron las bacterias puras, sin embargo, no fue posible describir su morfología ni su diferenciación, dado que el medio de cultivo es blanco, y las bacterias crecieron de ese mismo color, planas, opacas, además de que todas crecieron con la misma forma por lo que no fue posible diferenciarlas. Estos resultados muestran que no es posible diferenciar ni cuantificar ninguna de las bacterias analizadas, aunque Birollo, *et al* (2000) lo reporta como un excelente medio de diferenciación de colonias de *S thermophilus* y *L bulgaricus*, también en cultivos comerciales, observando que las colonias del *S thermophilus* son blancas, circulares y con bordes bien definidos, mientras que las del *L bulgaricus*, fueron irregulares, planas y translúcidas.

### **MRS, MRS con sorbitol y MRS con sorbitol y pH controlado**

Los medios MRS y el MRS con sorbitol permitieron el crecimiento de todos los microorganismos con morfología similar, lo que no favoreció su cuantificación por separado y lo único que se obtuvo con estos medios fue tener una cuenta total de las bacterias lácticas (Cuadro 1). Cuando el medio MRS con sorbitol al 5% se preparó controlando el pH final a un valor de 5.4, se observó crecimiento de *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* y sus

colonias fueron diferentes lo cual hace posible su diferenciación y cuantificación. Las colonias del *L. bulgaricus* crecieron con un tamaño de aproximadamente 1.0 mm de diámetro, planas, con bordes indefinidos, color blanco translúcido y opacas. Las colonias de *L. acidophilus* fueron convexas, de forma circular, puntiformes y más pequeñas que las anteriores (Cuadro 1). En este medio no se logró crecimiento de bacterias *S. thermophilus*, aunque Birollo *et al.* (2000), reporta que se pueden distinguir con alguna dificultad bajo condiciones anaeróbicas colonias de *S. thermophilus* y de *L. bulgaricus*. Un estudio sobre la calidad microbiológica de yogurts portugueses, cuantifica las bacterias del *L. bulgaricus* con este mismo medio y bajo las mismas condiciones (Nogueira *et al.*, 1998).

Por otra parte, en este mismo medio, aunque con el pH ajustado a 4.58, en condiciones anaeróbicas y a 45°C por 72 h se reportan colonias del mismo tamaño, blancas, irregulares y esponjosas para el *L. bulgaricus* y colonias opacas, pequeñas (0.1 a 0.5 mm) y parduscas para el *S. thermophilus* a 37°C por 72 h (Tharmaraj y Shah, 2003).

### **M17**

Este medio resultó adecuado para la reproducción de *S. thermophilus* con un pH controlado a 7.2 y bajo condiciones anaeróbicas, siendo éste el único microorganismo capaz de crecer en este medio. Las colonias de *S. thermophilus* fueron redondas, blancas, lisas y brillantes, por lo que este medio se utilizó para diferenciar las bacterias cuando crecen puras o en cualquiera de las asociaciones (Cuadro 1). Estos datos concuerdan con

los reportados por Birollo *et al* (2000), aunque en su caso, obtuvo colonias blancas opalescentes, circulares y con bordes bien definidos, mientras que Tharmaraj y Shah (2003), reportan colonias redondas y amarillentas en condiciones aeróbicas a 37°C por 24 h. Otros estudios han demostrado la especificidad de este medio para la cuantificación y diferenciación del *S. thermophilus* (Shah, 2000).

**Cuadro 1. Crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo y descripción del tipo de colonias presentes**

Medio de cultivo	Especie bacteriana			Descripción de las colonias
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. acidophilus</i>	
Leche descremada 20%	-	-	-	Medio no apto para crecimiento
Leche descremada 10%	+	+	+	Blancas, planas y opacas en todos los casos.
MRS	+	+	+	Blancas, brillantes, redondas en todos los casos
MRS + sorbitol	+	+	+	Blancas, brillantes, redondas en todos los casos
MRS + sorbitol + pH 5.4	-	+	+	<i>L. bulgaricus</i> : Planas, bordes indefinidos, blancas translúcidas y opacas <i>L. acidophilus</i> : Convexas, circulares, puntiformes
M17	+	-	-	Redondas, blancas, lisas y brillantes,

Dave and Shah (1996), reportan que para la diferenciación del *S. thermophilus*, el Agar *Streptococcus thermophilus* muestra mejores resultados con presencia de colonias bien desarrolladas y amarillas y que el *L. bulgaricus* o bien no crece o forma colonias delgadas, blancas y esponjosas.

Aunque estos resultados aclaran el papel de los medios de cultivo para la caracterización e identificación de las bacterias lácticas en leche fermentada; es preciso evaluar la viabilidad de estas bacterias en productos fermentados comerciales, con la finalidad de determinar si los productos fermentados cumplen con las normas internacionales sobre el número y viabilidad de colonias bacterianas.

### **Conclusiones**

El desarrollo de productos lácteos conteniendo bacterias probióticas es un tema de consecuencias industriales y comerciales importantes para la industria alimentaria. La incorporación de estas bacterias hace difícil su identificación y cuantificación.

Cuando crecen en cultivos mixtos *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* el M17 es el medio de cultivo indicado para cuantificar y diferenciar *S. thermophilus* de los lactobacilos, presentando colonias redondas, blancas, lisas y brillantes. El medio MRS con sorbitol y pH de 5.4, permite diferenciar las colonias de *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* puesto que *L. bulgaricus* crecen en colonias de aproximadamente 1.0 mm de diámetro, planas, con bordes indefinidos, de color blanco translúcido y

opacas, mientras que las colonias de *L. acidophilus* son convexas, de forma circular, puntiformes y mas pequeñas que las anteriores.

Estos datos aportan evidencia sobre los tipos de medios recomendados para la cuantificación y caracterización de las bacterias *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*, utilizadas como cultivos mixtos en leches fermentadas.

### **Literatura citada**

- Birollo, G. A., J. A. Reinheimer y C. G. Vinderola 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yogurt. *Food Res Int* 33: 799-805.
- Borchers, A. T., C. L. Keen y M. E. Gershwin 2002. The influence of yogurt/*Lactobacillus* on the innate and acquired immune response. *Clin Rev Allerg Immunol* 22: 207-230.
- Cachon, R., S. Jeanson, M. Aldarf y C. Divies 2002. Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait* 82: 281-288.
- Chick, H., H. S. Shin y Z. Ustunol 2001. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *J Food Sci* 66: 478-481.
- Corich, V., A. Mattiazzi, E. Soldati, A. Carraro y A. Giacomini 2004. Relationship between chemical and microbiological composition of commercial plain yogurts. *Ital J Food Sci* 16: 221-233.

- Courtin, P. y F. Rul 2003. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait* 84: 125-134.
- Dave, R. I. y N. P. Shah 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *J Dairy Sci* 79: 1529-1536.
- Dave, R. I. y N. P. Shah 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J Dairy Sci* 81: 2804-2816.
- Davidson, R. H., S. E. Duncan, C. R. Hackney, W. N. Eigel y J. W. Boling 2000. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *J Dairy Sci* 83: 666-673.
- Davis, J. G., T. R. Ashton y M. McCaskill 1971. Enumeration and viability of *L. bulgaricus* and *St. thermophilus* in yogurts. *Dairy Ind.* 36: 569-573.
- DeNoni, I., L. Pellegrino y F. Masotti 2004. Survey of selected chemical and microbiological characteristics of (plain or sweetened) natural yoghurts from the Italian market. *Lait* 84: 421-433.
- Diario Oficial de la Federación 1995. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. NOM-110-SSA1-1994.
- Djouzi, Z., C. Andrieux, M. Degovry, C. Bouley y O. Szylit 1997. The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal

- microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. *Am Soc Nutr Sci*: 2260-2266.
- International IDF Standard 117 1983. Yogurt. Enumeration of Characteristic Microorganisms colony count technique at 37 °C. International Dairy Federation. 117.
- International IDF Standard 117A 1988. Yogurt. Enumeration of Characteristic Microorganisms colony count technique at 37 °C. International Dairy Federation. 117A.
- Marshall, R. T. 1992. *Standard Methods for the examination of Dairy Products*. Washington, D. C., American Public Health Association.
- Nogueira, C., H. Albano, P. Gibbs y P. Teixeira 1998. Microbiological quality of portuguese yogurts. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21: 19-21.
- Radke-Mitchell, L. C. y W. E. Sandine 1986. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Dairy Sci* 69: 2558-2568.
- Shah, N. P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 83: 894-907.
- Tharmaraj, N. y N. P. Shah 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *J Dairy Sci* 86: 2288-2296.

- Vinderola, C. G., N. Bailo y J. A. Reinheimer 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Res Int* 33: 97-102.
- Vinderola, C. G., P. Mocchiutti y J. A. Reinheimer 2002. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J Dairy Sci* 85: 721-729.
- Vinderola, C. G., W. Rosello, D. Ghilberto y J. A. Reinheimer 2000. Viability of probiotic (bifidobacterium, lactobacillus acidophilus and lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in argentiian fresco cheese. *J Dairy Sci* 83: 1905-1911.

## Resultados complementarios en el estudio

Este estudio fue conducido para evaluar la producción de ácido láctico, viabilidad de bacterias lácticas y la producción de CLA en leches fermentadas con diferentes tipos de bacterias lácticas en cultivos puros y mixtos a lo largo de 9 horas.

### Producción de Ácido Linoléico Conjugado (CLA)

El efecto de la interacción del *S. thermophilus* con respecto al contenido de CLA en leches fermentadas tienen efecto estadístico ligeramente significativo por su presencia en el tratamiento ya que se encuentra en el borde de la significancia ( $p > 0.504$ ). El *L. acidophilus* tiene diferencia significativa como microorganismo puro además de que es el que proporciona una cantidad mayor de CLA ( $p > 0.0113$ ) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Contenido de ácido linoléico conjugado en mg/g de muestra en leches fermentadas con diferentes tipos de bacterias y diferentes tiempos de incubación (h).

TRATAMIENTO	0	3	6	9	
<b><i>S thermophilus</i></b>	53.40	53.18	94.71	92.22	69.53 <sup>bc</sup>
<b><i>L bulgaricus</i></b>	87.03	92.86	55.91	114.42	87.56 <sup>abc</sup>
<b><i>L acidophilus</i></b>	110.31	90.50	96.98	96.43	100.2 <sup>a</sup>
<b><i>S thermophilus</i>- <i>L bulgaricus</i></b>	54.32	78.73	56.91	74.94	66.23 <sup>c</sup>
<b><i>S thermophilus</i>- <i>L acidophilus</i></b>	93.96	108.39	84.72	94.54	95.4 <sup>ab</sup>
<b><i>L bulgaricus</i>- <i>L acidophilus</i></b>	112.32	102.98	63.32	107.36	95.52 <sup>ab</sup>
<b><i>S thermophilus</i>- <i>L bulgaricus</i>- <i>L acidophilus</i></b>	100.28	76.42	80.12	98.42	88.81 <sup>abc</sup>

Las diferentes literales en las columnas indican diferencia para los tratamientos

## Producción de ácido láctico

El porcentaje de ácido láctico fue diferente, tanto por el tipo de microorganismo como por el tiempo de incubación, observándose en general mayor concentración de ácido en el tiempo de 9 h con cualquiera de los microorganismos y los tratamientos que fueron diferentes son aquellos en donde hubo presencia de *S. thermophilus* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados promedio del porcentaje de ácido láctico en leches fermentadas con diferentes tipos de bacterias y diferentes tiempos de incubación (h).

TRATAMIENTO	0	3	6	9	Promedio
<i>S. thermophilus</i>	0.16 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.42 <sup>b</sup>	0.58 <sup>b</sup>	0.34 <sup>a</sup>
<i>L.bulgaricus</i>	0.15 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.23 <sup>cd</sup>	0.18 <sup>b</sup>
<i>L. acidophilus</i>	0.15 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.19 <sup>d</sup>	0.17 <sup>b</sup>
<i>S. thermophilus</i> - <i>L.bulgaricus</i>	0.16 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.64 <sup>ab</sup>	0.34 <sup>a</sup>
<i>S. thermophilus</i> - <i>L.acidophilus</i>	0.15 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.36 <sup>b</sup>	0.59 <sup>b</sup>	0.32 <sup>a</sup>
<i>L.bulgaricus</i> - <i>L.acidophilus</i>	0.16 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.30 <sup>c</sup>	0.20 <sup>b</sup>
<i>S. thermophilus</i> - <i>L.bulgaricus</i> - <i>L.acidophilus</i>	0.16 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.70 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>

Las diferentes literales en las columnas indican diferencia para los tratamientos

## Viabilidad de los Microorganismos

Los resultados de viabilidad de las bacterias mostraron que el crecimiento del *S. thermophilus* es diferente a aquellos del *L. bulgaricus* y el *L. acidophilus* ( $P < 0.5$ ), aunque no es debida a su incubación en cultivos mixtos, sino sólo por el tipo de microorganismo (Cuadro 3). En estudios anteriores se ha visto que una de las desventajas obligadas asociadas con el uso de cultivos mixtos en leches fermentadas es la falta de tolerancia de algunas especies y cepas de microorganismos en cuanto al contenido de

ácido en el producto y posiblemente la mejor viabilidad de *L. acidophilus* se deba a que cuando existe un crecimiento simultáneo con las bacterias del yogurt desarrolle habilidad para romper el peróxido de hidrógeno y a la temperatura de incubación utilizada favoreció su crecimiento ya que la temperatura de incubación es un factor importante, porque generalmente el proceso de fermentación se realiza a 43°C, ideal para la producción de ácido láctico (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

**Cuadro 3. Viabilidad de bacterias (UFC/ml) en leches fermentadas con diferentes tipos de bacterias y diferentes tiempos de incubación (h)**

TRATAMIENTO		0	3	6	9	UFC/mL Promedio
Mezcla de cultivos	Mo.					
<i>S. thermophilus</i>		9.63	10.34	10.78	9.93	10.17
<i>L. bulgaricus</i>		9.01	9.56	10.00	10.76	9.83
<i>L. acidophilus</i>		9.00	11.09	10.10	8.77	9.74
<i>S. thermophilus</i> - <i>L. bulgaricus</i>	<i>th</i>	9.63	10.00	11.35	11.28	10.56
	<i>bu</i>	9.07	9.69	10.06	11.60	10.10
<i>S. thermophilus</i> - <i>L. acidophilus</i>	<i>th</i>	9.63	10.68	11.48	11.92	10.92
	<i>ac</i>	9.04	9.77	8.33	9.10	9.06
<i>L. bulgaricus</i> - <i>L. acidophilus</i>	<i>bu</i>	9.01	9.82	9.93	11.93	10.17
	<i>ac</i>	9.04	9.67	8.21	8.96	8.97
<i>S. thermophilus</i> - <i>L. bulgaricus</i> - <i>L. acidophilus</i>	<i>th</i>	9.63	10.41	11.43	12.07	10.88
	<i>bu</i>	9.03	9.01	8.89	9.51	9.11
	<i>ac</i>	9.03	8.96	8.23	9.58	8.95

## Discusión general

La información existente sobre un incremento de CLA por las diferentes bacterias lácticas y probióticas permitió inferir un sinergismo entre las bacterias del yogurt y el *L. acidophilus* en leches fermentadas con leche entera, ya que tienen diferentes habilidades de crecimiento, acidificación y producción de compuestos metabólicos, por lo que se considera que al crecer en asociación, puede existir una mayor producción de CLA.

### Producción de Ácido Linoléico Conjugado (CLA)

En este estudio, los tres cultivos comerciales puros evaluados fueron pre-cultivados 24 horas antes del inicio de este estudio en leche entera reconstituida y con las mismas características que el sustrato en el cual se llevó a cabo la incubación de las bacterias para el experimento. Después de este pre-cultivo, de 24 horas, estos cultivos fueron utilizados para la inoculación de las muestras del experimento.

En forma general, los resultados mostraron que el microorganismo con mayor capacidad promedio para elevar el contenido de CLA fue el *L. acidophilus*, en cualquiera de los tratamientos en los que se encuentra involucrado o cuando se encuentra como cultivo puro, sugiriendo la presencia de la enzima isomerasa del ácido linoléico en esta bacteria. Estos resultados concuerdan con los reportados en otras investigaciones (Kritchevsky, 2000; Lin *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003; Lin, 2006).

Estudios sobre la producción de CLA en leche descremada y adiciones de ácido linoléico con el uso de diversas bacterias lácticas, indican que las bacterias lácticas tienen diferente capacidad para la producción de CLA al trabajar con cepas de referencia activadas en un medio de cultivo (MRS) a 37°C, y que la producción máxima se obtuvo a las 24 horas de incubación, y el *L. acidophilus* es la que tiene mayor capacidad productora de CLA con adiciones de 1000 µg (Alonso *et al.*, 2003).

Las diferencias aparentes en la cantidad de CLA producido con *L. acidophilus* en diferentes medios y con la misma concentración de suplementación de AL puede deberse a las diferentes cantidades de crecimiento y o a valores de pH observados en el medio (Alonso *et al.*, 2003). Los investigadores han hipotetizado que la isomerización es un mecanismo de detoxificación de los ácidos grasos, aunque hay reportes de la falta de información acerca de las toxicidades relativas al AL y al CLA (Jenkins y Courtney, 2003). Las cepas que producen CLA son más susceptibles al AL que aquellas que no lo producen, este estudio soporta la teoría de que la isomerización es para propósitos de sobrevivencia. Las proteínas de la leche o otros componentes pueden proveer de efectos protectores contra los FA (Jenkins y Courtney, 2003).

La cantidad de CLA producida por la asociación de las bacterias del yogurt fue la menor de todos los tratamientos, lo cual puede atribuirse a que los tiempos máximos de incubación utilizados fueron de 9 horas, tiempo correspondiente máximo para la elaboración de este tipo de

productos, pudiendo pensarse que se lograrían valores mayores si se aumenta el tiempo de incubación y se disminuye la temperatura de incubación, ya que se reporta que existe mejor viabilidad de las bacterias probióticas a menores temperaturas (Akin y Güler-A., 2005). Resulta obvio que la adición del *L. acidophilus* durante la fermentación produce un efecto aun más beneficioso a la fermentación, lo cual también puede estar relacionado con la producción de nutrientes esenciales para las otras bacterias.

En alimentos, existen reportes de estudios realizados con el *L. acidophilus* y con el *P. freudenreichii* ssp *shermanii* en donde se demuestra que hay una mejor producción de CLA a pH de 5 con el *L. acidophilus*. El efecto del pH en la actividad enzimática parece variar con el tipo de cultivo, probablemente debido a las diferencias en las composiciones y las interacciones entre los dos cultivos, ya que el *freudenreichii* no muestra cambio en la producción de CLA debido a diferentes pH. La relación de los diferentes isómeros producidos por *acidophilus* varía con el pH, observándose mejores producciones del c-9, t-11 a pH de 5-6 y se obtienen niveles más altos de t10 c12 a pH de 4 (Lin et al., 2002).

### **Producción de ácido láctico**

La actividad de los cultivos lácticos es de gran importancia en los procesos utilizados para la manufactura de productos fermentados lácteos.

Estos microorganismos interactúan con su ambiente fisicoquímico y alteran sus características en una forma muy compleja. El potencial oxido reducción, y el pH o la temperatura, son parámetros importantes del ambiente fisicoquímico que crea condiciones necesarias para el desarrollo del sabor y contribuyen a la calidad microbiológica de los productos.

En este estudio, el porcentaje de ácido láctico fue diferente, tanto por el tipo de microorganismo como por el tiempo de incubación, observándose en general una mayor concentración de ácido en el tiempo a las 9 h con cualquiera de los microorganismos y los tratamientos. Los resultados fueron diferentes en aquellos tratamientos en donde hubo presencia de *S. thermophilus*, con lo cual quedó demostrado que de los microorganismos estudiados, éste es el que tiene mayor capacidad para producir ácido láctico. El *S. salivarius* spp *thermophilus* se utiliza en producción de varias clases de quesos y leches fermentadas, donde su principal función es la producción de ácido láctico, compuestos aromáticos y exopolisacáridos (Pernoud *et al.*, 2004)

La acidez producida por el *L. acidophilus* fue prácticamente nula a través del tiempo. Sin embargo, las bacterias del yogurt crecen rápidamente y por lo tanto se adicionan para agilizar el proceso de fermentación, sugiriéndose que la concentración de bacterias probióticas sea de  $10^8$  UFCg<sup>-1</sup> de producto (Tharmaraj y Shah, 2003).

Se ha reconocido que el crecimiento asociativo existente entre el *S. thermophilus* y *L. delbreuckii* spp *bulgaricus* puede influenciar las propiedades fisicoquímicas y el nivel de compuestos aromáticos en el

leches fermentadas cuando se compara con productos elaborados con cepas simples de estos microorganismos (Bonczar *et al.*, 2002) y que el crecimiento simbiótico en el yogurt, el *S. thermophilus* produce ácido láctico, lo que reduce el pH a un nivel óptimo para el *bulgaricus*, además de que el ácido producido y pequeñas cantidades de ácido fórmico estimulan su crecimiento (Courtin y Rul, 2004).

Los resultados de este experimento señalan que, comparada con la producida por la asociación del *L. bulgaricus* con el *S. thermophilus*, la acidez producida por los cultivos puros es menor y aún mejor cuando en la asociación se incluye al *L. acidophilus*. Al respecto, se encuentra documentado el efecto beneficioso de la asociación del *S. thermophilus* con el *L. bulgaricus* para la producción de yogurt, considerando que la acidificación inicial es atribuible a los requerimientos nutricionales más altos del *L. bulgaricus* y al hecho de que el primero crece más rápido en la asociación y que ambos pudieran estar compitiendo por los escasos nutrientes esenciales de la leche (Courtin y Rul, 2004).

Existen reportes que indican que cuando los cultivos del yogurt crecen junto con bacterias probióticas, se inhibe el crecimiento del *L. bulgaricus* y como resultado, el nivel de acidez en los bio-yogurts es menor que en el yogurt (Akin y Güler-A., 2005). De la misma manera, si se utilizan bacterias del tipo de la *bifidobacteria*, no se observan diferencias en la concentración de ácido de varias leches fermentadas que la contienen (Baron *et al.*, 2000).

## Viabilidad de los Microorganismos

Los resultados de viabilidad de las bacterias mostraron que el crecimiento del *S. thermophilus* es mayor al del *L. bulgaricus* y el *L. acidophilus* en cultivos puros, con una tendencia a incrementarse en todos los casos. Por otra parte el *L. bulgaricus*, en cultivos puros también tiene tendencia a incrementar, aunque siempre es en forma más lenta que en el caso anterior. Cuando se trata de cultivos mixtos, tiene una fase estacionaria al inicio de la incubación para incrementarse a las nueve horas. Por otra parte, el *L. acidophilus*, en cultivos puros tiene un incremento inicial para disminuir a las tres horas sin lograr recuperarse como lo hace en cultivos los cultivos mixtos. Las cuentas de *S. thermophilus* más altas, posiblemente se deban a que su crecimiento es estimulado por el de otras especies (Akin y Güler-A., 2005).

Existen reportes que indican que la viabilidad de los microorganismos se ve afectada por bajos pH en el ambiente. Se reporta que el *L. acidophilus* muestra una disminución rápida a pH de 2.0, pero que a pH de 4.0 el número de UFC no disminuye significativamente (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001), aunque también existe información de que ciertas cepas no crecen en leche y que sobreviven pobremente en productos fermentados (Gardini *et al.*, 1999). La viabilidad de las bacterias lácticas en el yogurt también está relacionada con la composición química del producto y las temperaturas de almacenamiento (Birolo *et al.*, 2000)

Los datos de la mayor viabilidad del *S. thermophilus* concuerdan con los obtenidos en un estudio de productividad de esta bacteria en cultivos mixtos, en donde se obtuvieron valores más altos, mientras que el *L. bulgaricus* no mejora notablemente (Béal y Corrieu, 1998)

Reportes sobre la viabilidad del *L. acidophilus* adicionado en el yogurt indican que disminuye en número durante su almacenamiento en refrigeración, inestabilidad debida a las sustancias producidas por el *L. bulgaricus* tales como peróxido de hidrógeno, lo cual habla de un antagonismo entre ambas bacterias durante el almacenamiento (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). Asimismo, si el porcentaje de inóculo del *S. thermophilus* y el *L. bulgaricus* es mayor que el de los *L. acidophilus*, dominarán la fermentación y por tanto se contará con bajas poblaciones de las bacterias probióticas (Akin y Güler-A., 2005), aunque su viabilidad mejora cuando el yogurt se suplementa con cisteína así como por un reemplazo de leche descremada por concentrado de proteína de suero permitiéndole estar viables hasta por 21 días (Dave y Shah, 1998)

En conclusión, la producción de CLA en leches fermentadas con *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* es mayor en aquellos tratamientos en los cuales se encuentra involucrado el *L. acidophilus*, sin embargo, sería necesario elevar los tiempos de incubación a 24 horas, en donde se encuentran reportados producciones mayores.

La producción de CLA en la fermentación es altamente dependiente del tipo de la bacteria utilizada en la producción de leches fermentadas con microorganismos mixtos comerciales y su manipulación puede alterar

la producción de CLA. De acuerdo con nuestros resultados, y debido a su importancia en la salud humana, es claro que los mecanismos para la producción del CLA con microorganismos lácticos requiere de investigaciones posteriores para obtener información que contribuya a poner en claro los factores biológicos que puedan suministrar mayores cantidades de CLA natural en productos considerados como alimentos funcionales.

## Literatura Citada en la Sección de Discusión General

- Akin, M. S. y Güler-A. 2005. Effect of different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt. *Ital J Food Sci* 17: 67-74.
- Allred, S. L., T. R. Dhiman, C. P. Brennand, R. C. Khanal, D. J. McMahon y N. D. Luchin. 2006. Milk and cheese from cows fed calcium salts of palm and fish oil alone or in combination with soybean products. *J Dairy Sci* 89: 234-248.
- Alonso, L., E. P. Cuesta y S. E. Gilliland. 2003. Production of Free Conjugated Linoleic Acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of Human Intestinal Origin. *J Dairy Sci* 86: 1941-1946.
- Baron, M., D. Roy y J. C. Vuilleumard. 2000. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. *Lait* 80: 465-478.
- Béal, C. y G. Corrieu. 1998. Production of thermophilic lactic acid starters in mixed cultures. *Lait* 78: 99-105.
- Bell, J. A. y J. J. Kennelly. 2001. Conjugated linoleic acid enriched milk: A designer milk with potential. *Adv Dairy Tech* 13: 213-228.
- Biorollo, G. A., J. A. Reinheimer y C. G. Vinderola. 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yogurt. *Food Res Int* 33: 799-805.

- Bonczar, G., M. Wszolek y A. Siuta. 2002. The effects of certain factors on the properties of yoghurt made from ewe's milk. *Food Chem* 79: 85-91.
- Calder, P. C. 2002. Conjugated linoleic acid in humans--reasons to be cheerful? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 123-126.
- Champagne, C. P. 2005. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Crit Rev in Food Sci Nutr* 45: 61-84.
- Chow, J. 2002. Probiotics and prebiotics: A brief overview. *J Ren Nutr* 12: 76-86.
- Courtin, P. y F. Rul. 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait* 84: 125-134.
- Dave, R. I. y N. P. Shah. 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *J Dairy Sci* 79: 1529-1536.
- Dave, R. I. y N. P. Shah. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J Dairy Sci* 81: 2804-2816.
- Gardini, F., R. Lanciotti, M. E. Guerzoni y S. Torriani. 1999. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. *Int Dairy J* 9: 125-134.

- Jenkins, J. K. y P. D. Courtney. 2003. Lactobacillus growth and membrane composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. *Can J Microbiol* 49: 51-57.
- Kritchevsky, D. 2000. Conjugated linoleic acid. Review. *Br Nutr Found Nutr Bull.* 25: 25-27.
- Lin, T. Y. 2006. Conjugated linoleic acid production by cells and enzyme extract of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* with additions of differnt fatty acids. *Food Chemistry* 94: 437-441.
- Lin, T. Y., C. W. Lin y Y. J. Wang. 2002. Linoleic acid isomerase activity in enzyme extracts from *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii*. *J Food Sci* 67: 1502-1505.
- Lin, T. Y., C. W. Lin y Y. J. Wang. 2003. Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079. *Food Chem* 83: 27-31.
- Lourens-Hattingh, A. y B. C. Viljoen. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J* 11: 1-17.
- Pernoud, S., C. Fremaux, A. Sepulchre, G. Corrieu y C. Monnet. 2004. Effect of the metabolism of urea on the acidifying activity of *Streptococcus thermophilus*. *J Dairy Sci* 87: 550-555.
- Tharmaraj, N. y N. P. Shah. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*,

*Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. J Dairy Sci 86:  
2288-2296.

Vinderola, C. G., W. Rosello, D. Ghilberto y J. A. Reinheimer. 2000.  
Viability of probiotic (bifidobacterium, lactobacillus acidophilus and  
lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in argentiian fresco  
cheese. J Dairy Sci 83: 1905-1911.

## Apéndice I

### Oficios de recepción de las publicaciones a las revistas

## 1) Journal de Dairy Science

A: ramirezbp2000@yahoo.com.mx, [vnevare@uach.mx](mailto:vnevare@uach.mx)

Asunto: Journal of Dairy Science- Manuscript JDS-06-0101

De: [grogers2@tennessee.edu](mailto:grogers2@tennessee.edu)

Fecha: Thu, 23 Feb 2006 11:29:52 -0500 (EST)

Please complete and return the mandatory manuscript submission and copyright form if you have not done so already.

February 23rd, 2006

Dear Prof. Ramirez-Baca:

The manuscript you submitted to the Journal of Dairy Science, "Production of Conjugated Linoleic Acid and Lactic Acid by a Mixed Culture of *L. acidophilus* and Yogurt Bacteria," has been successfully uploaded to Manuscript Central.

As the corresponding author, you will receive future communications via e-mail. Your manuscript number is JDS-06-0101. We appreciate your consideration of the Journal of Dairy Science to publish your research.

Please be sure to save the word processing and graphics files from your manuscript. You will need them when you revise your manuscript and will be asked to submit these files for production if your manuscript is accepted.

Please make a note of the manuscript number and include it in all future communications. This number will also appear in an e-mail from Journal of Dairy Science Manuscript Central within 24 hours after the end of this process, confirming receipt of your submission. This process will serve to validate the e-mail address that you have provided.

Don't forget that we also need a copyright release form. You can download a copy from the "Instructions and Forms" link in this site or at [www.adsa.org/jds](http://www.adsa.org/jds). All authors must sign the form; if authors are at different locations more than one form may be used and submitted separately. Please fax, or mail the form per the instructions.

You can keep track of your manuscript by logging on periodically to Journal of Dairy Science Manuscript Central (<http://jds.manuscriptcentral.com>), where the status will be displayed in your Author Center and also the name and e-mail address of the Editor in charge of your review.

You may submit your comments regarding Manuscript Central access to [jeremyh@assoqh.org](mailto:jeremyh@assoqh.org). We appreciate your comments and concerns regarding the online submission system.

Again, Thank you for your interest in the Journal of Dairy Science.

Gary Rogers  
Editor in Chief  
Journal of Dairy Science

**Successful Submission Confirmation** 02-23-2006 11:29

Your manuscript has been successfully uploaded to Journal of Dairy Science. You will receive future communications via e-mail.

Your manuscript number is: **JDS-06-0101**

Please make note of your manuscript number. You will receive an e-mail from JDS within 24 hours of the end of this process, confirming receipt of your submission

**Partially Submitted Manuscripts**  
Click on title to resume the submission.

Manuscript ID	Title	Date Created	[delete]
---------------	-------	--------------	----------

No Manuscripts Found

**Submitted Manuscripts**  
Click on title to view the submission.

Manuscript ID	Title	Date Submitted	Processing Status & Senior Editor
JDS-06-0101	<u>Production of Conjugated Linoleic Acid and Lactic Acid by a Mixed Culture of L acidophilus and Yogurt Bacteria</u>	02-23-2006	With Section Editor <u>Michael Mangino</u> <u>MANGINO.2@OSU.EDU</u>

## 2) Revista Agraria Nueva Época



**Agraria**  
Nueva Época

Tel: (244) 433-02-20, (244) 411-02 12; Fax: (244) 411-02-13

Órgano de Difusión Científica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Nuro

Foto 57

FECHA: 6 de marzo de 2006

ACUSE DE RECIBO

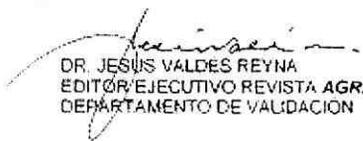
RECIBÍ DEL C. Patricia Ramírez Baca

EL SIGUIENTE TRABAJO PARA SU POSIBLE PUBLICACION EN LA REVISTA AGRARIA NUEVA EPOCA:

"Morfología y diferenciación de colonias de tres tipos de bacterias lácticas"

MISMO QUE SERÁ SOMETIDO AL PROCESO DE ARBITRAJE.

R E C I B I

  
DR. JESUS VALDES REYNA  
EDITOR EJECUTIVO REVISTA AGRARIA - NUEVA EPOCA -  
DEPARTAMENTO DE VALIDACION

C.c.p. Dr. Miguel Angel Capó Arteaga, Editor en Jefe Revista *Agraria* N.E.



Universidad Autónoma Agraria Antonio Nuro  
Dirección de Investigación  
Eje Carretera Nahuatlán-Culm, México, C. P. 25315

## **Apéndice II**

**El ácido linoléico conjugado y su importancia en la dieta.**

**Artículo 3. Publicado en Revista AGROFAZ**

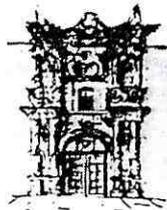
Marzo 2004



# AGROFAZ

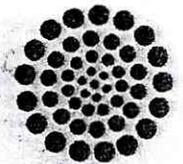
MARZO 2004

ISSN: 1665-8892

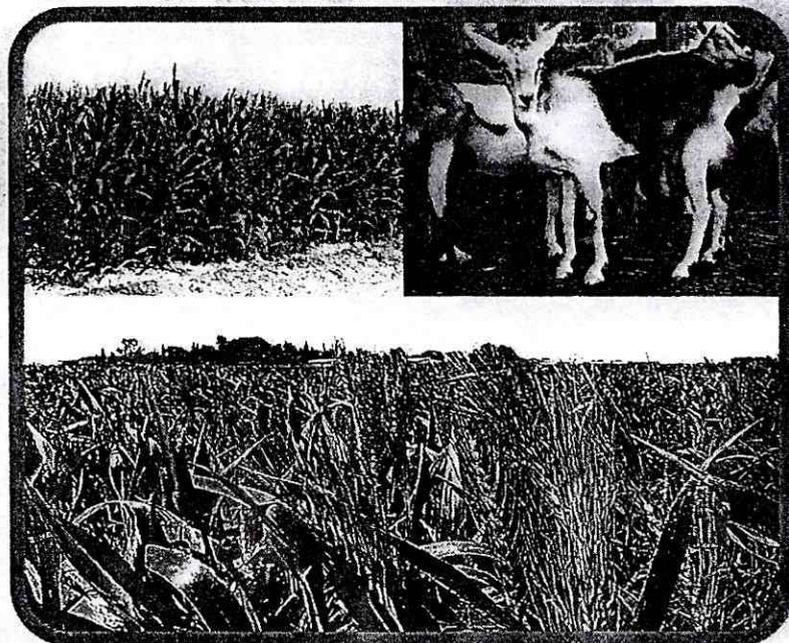


PUBLICACIÓN SEMESTRAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA  
VENECIA, DGO., MÉXICO.



SEP-CONACYT



VOLUMEN 4 NÚMERO 1

# EL ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO Y SU IMPORTANCIA EN LA DIETA

## Importance of Conjugated Linoleic Acid on the Diet

Patricia Ramirez Baca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Ave. Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia Gómez Palacio, Dgo., México. Tél. 01 (871) 7-15-88-10, Fax 01 (871) 7-15-29-64.  
E-mail: ramirezbp2000@yahoo.com.mx, ramirezbp2000@hotmail.com

### RESUMEN

Cerca del 35 por ciento de las muertes por cáncer en los Estados Unidos está asociado con la dieta, por lo cual, el consumo de alimentos saludables se considera como estrategia para su prevención. Los productos de origen animal contribuyen significativamente al total de nutrientes del suministro alimenticio al proporcionar el 60 por ciento del consumo proteico, además de ser fuente importante de vitaminas y minerales, aunque el consumo de grasa saturada se ha relacionado con el incremento en la concentración de colesterol en plasma sanguíneo y por tanto con el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Actualmente existen evidencias que sugieren que el incremento en el consumo de leche está ligado con una reducción en el riesgo de cáncer, debido a un ácido linoléico conjugado (CLA) presente en su grasa, el cual puede modificar los niveles de lípidos y colesterol en plasma. Este ácido es un ácido graso natural producido en el rumen por bacterias fermentativas del tipo *Butyrovibro fibrisolvens* que isomeriza el ácido linoléico a CLA. Los beneficios nutricionales asociados con el consumo de CLA demostrados *in vitro* y en modelos animales incluyen propiedades importantes como agente anti-arteroesclerosis, anticarcinógeno, modulador del sistema inmune, agente antidiabético, ayuda a la mineralización del hueso, así como promotor de una masa corporal magra. El CLA se encuentra ampliamente distribuido en muchos alimentos, incluyendo productos animales de rumiantes y ciertos vegetales. Los productos lácteos se distinguen como fuentes importantes de CLA, variando de 2.5 a 7.0 mg g<sup>-1</sup> de grasa dependiendo del producto, tipo de alimentación en el ganado y del tipo de proceso al que se sometió la leche durante su

transformación, y se considera que el consumo de CLA al que se le atribuyen propiedades benéficas es de 3.0 mg g<sup>-1</sup>.

**Palabras clave:** Ácido linoléico conjugado, lácteos, dieta

### SUMMARY

Almost 35 percent of the cancer deaths in the United States are related to diet, so consumption of healthful food is considered a good strategy for its prevention. Animal food contributes to total nutrient supply since it gives up 60 percent of proteic consumption, besides the important amount of vitamins and minerals, though saturated fat is associated to the increase in plasma cholesterol and to the cardiovascular illness. There are evidences that suggest that an increase in milk consumption is related to a decrease in mammary gland cancer risk because of conjugated linoleic acid in milk fat. This acid is a natural fatty acid produced by linoleic acid isomerization by fermentative bacteria in rumen (*Butyrovibro fibrisolvens*). Nutritional benefits of CLA consumption demonstrated *in vitro* and with animal models are immune system modulator, antidiabetic agent, antiatherosclerotic compound, helps to bone mineralization, reduces fat in body mass. CLA is distributed in many foods, including ruminant animal products and certain vegetables. Dairy products are good sources of CLA, ranging from 2.5 to 7.0 mg g<sup>-1</sup> of fat depending on the product, diet in cattle and type of process given to the milk during its transformation, and it is considered that a CLA consumption to have beneficial effects is 3.0 mg g<sup>-1</sup>.

**Key words:** Conjugated linoleic acid, dairy products, diet

## INTRODUCCIÓN

Condiciones tales como enfermedades cardiovasculares, demencia, osteoporosis y cáncer dominan como causas líderes de mortalidad y morbilidad en ancianos (Albertazzi y Couplad, 2002). Cerca del 35 por ciento de las muertes por cáncer en los Estados Unidos está asociado con la dieta, por tanto, modificaciones en ésta se pueden considerar como estrategias prácticas para la prevención del cáncer con recomendaciones tales como reducir el consumo de grasa animal (Kim y Liu, 2002).

La dieta y el estilo de vida tienen una función crucial para el mantenimiento de la salud en la población de mayor edad. Una dieta saludable no sólo ayuda a prolongar la vida, sino que también es crucial en la prevención de enfermedades tales como osteoporosis, obesidad, o bien cáncer de próstata y mama. La comida actualmente no sólo se percibe como una colección de nutrientes, sino también como un factor importante en la salud y prevención de enfermedades (Kim y Liu, 2002).

Los productos de origen animal contribuyen significativamente al total de nutrientes del suministro alimenticio, ya que proporcionan el 60 por ciento del consumo proteico en Estados Unidos, y aportan un patrón de aminoácidos muy cercano al ideal. Además, son fuente importante de vitaminas (B12, B6, riboflavina y niacina) y minerales (zinc, fósforo y calcio). El objetivo de incrementar la eficiencia de producción animal ha sido, y continúa siendo, una consideración importante en la producción de alimentos de origen animal. Existe también un incremento en el reconocimiento de alimentos que pueden contribuir a la prevención y desarrollo de algunas enfermedades. Como resultado, se le ha dado importancia adicional al diseño de alimentos cuyos componentes tengan un efecto benéfico en la salud (Bauman, *et al.* 1999).

El reporte de National Research Council (1988) (NRC) "Diseñando Alimentos" enfatiza la necesidad de investigar sobre el mejoramiento del valor nutricional y el etiquetado de los alimentos. Actualmente, ambas recomendaciones se han seguido, y los consumidores están más conscientes de la nutrición, particularmente con

respecto a las grasas. Esta conciencia se observa claramente por el incremento en el mercado de productos bajos en grasa. Los cambios de políticas gubernamentales también han tenido impacto en la comercialización de la leche, y el rápido descenso en el precio de la mantequilla desde 1988 ha disminuido el valor de la grasa butírica en más del 50 por ciento (Griinari, *et al.* 1998).

### Grasa Butírica

Típicamente, la grasa butírica contiene 70 por ciento de ácidos grasos saturados, 25 por ciento de ácidos grasos monoinsaturados, y 5 por ciento de ácidos grasos poliinsaturados. El número de carbonos del triglicérido y su grado de insaturación influyen la aceptación nutricional de la grasa butírica y su funcionalidad física en productos tales como mantequilla, crema, confitería y panificación (Hillbrick y Augustin, 2002).

La grasa butírica comúnmente se define en términos de su composición química: ~97-98 por ciento triglicéridos, 0.2-1.0 por ciento fosfolípidos, 0.016-0.038 por ciento monoglicéridos, 0.28-0.59 por ciento diglicéridos, 0.10-0.44 por ciento ácidos grasos libres, 0.22-0.41 por ciento esteroides y trazas de algunos otros compuestos liposolubles como vitaminas, ceras y pigmentos del tipo carotenoides (Hillbrick y Augustin, 2002; Jensen, 2002). Sin embargo, puede ser conveniente definirla también en base a sus características físicas, químicas y nutricionales tales como untabilidad, compatibilidad, estabilidad oxidativa y beneficios para la salud (Jensen, 2002).

El consumo de grasa saturada se ha asociado con el incremento en la concentración de colesterol en plasma sanguíneo, aumentando potencialmente el riesgo de enfermedades cardiovasculares. En décadas anteriores, el consumo de productos lácteos enteros disminuyó como resultado de un gran número de consumidores preocupados por su salud. Los productos lácteos contribuyen aproximadamente al 26 por ciento del consumo total de grasa en una dieta típica americana. De los ácidos grasos saturados, el ácido láurico, mirístico y palmítico son los responsables de los efectos de riesgo de colesterol en plasma, mientras que los

poliinsaturados y monoinsaturados disminuyen la concentración de colesterol en humanos. Sin embargo, a diferencia de los poliinsaturados, los monoinsaturados no disminuyen las lipoproteínas de colesterol de alta densidad (HDL) (Aigster *et al.*, 2000).

Aunque factores en el manejo del ganado tales como raza y estado de lactancia afectan la composición de grasa en leche y sus propiedades, la capacidad para influenciarla generalmente está fuera del alcance del procesador o del consumidor. Sin embargo, el impacto de la dieta de la vaca en la composición de la grasa y sus propiedades es relativamente rápida y tiene el potencial para ser utilizado como una herramienta para producir grasa láctea que se acerque a las expectativas del cliente (Fearon, 2001).

Científicos de la Universidad de Wisconsin realizaron descubrimientos asombrosos acerca de una sustancia llamada ácido linoléico conjugado (CLA). En 1987 el microbiólogo Michael Pariza, director del Instituto de Investigaciones en Alimentos de esa Universidad descubrió una poderosa evidencia de las propiedades anticancerígenas del CLA en modelos animales (Byfield, 2002). La mantequilla elaborada de leche que contiene grandes niveles de ácidos grasos naturales reduce el riesgo de cáncer de mama en animales de laboratorio, de acuerdo a recientes investigaciones (Henderson, 2000).

Existen evidencias epidemiológicas que sugieren que el incremento en el consumo de leche está ligado a una reducción en el riesgo de cáncer de mama. Más aún, el ácido linoléico conjugado (CLA) puede llegar a modificar los niveles de lípidos, colesterol y lipoproteínas en plasma. Una dieta con suficiente CLA reduce la lipoproteína de baja densidad (LDL) en plasma de conejo (Kim y Liu, 2002).

La grasa de leche es una fuente natural dietética del isómero *cis*-9, *trans*-11 del ácido linoléico conjugado, que ha sido considerado como un potente anticancerígeno. En el rumen, el *cis* 9, *trans*-11 resulta de la isomerización del 18:2n6 durante el primer paso del proceso de biohidrogenación. Subsecuentes reducciones de dobles ligaduras en carbonos 9 y 11 dan *trans*-11:18:1 y 18:0, respectivamente, como principales productos (Loor *et al.*, 2002).

### Ácido Linoléico Conjugado

¿Qué es el CLA y dónde se puede encontrar? El CLA es un ácido graso natural producido en el rumen por bacterias fermentativas del tipo *Butyrovibro fibrisolvens*, que isomeriza al ácido linoléico a CLA. Otra fuente de CLA en rumiantes es su síntesis vía la  $\Delta$ -9-desaturasa de *trans*-11 ácido octadecadienoico. El CLA se encuentra en productos lácteos como leche y queso o carne de vacuno y de oveja (Evans *et al.*, 2002).

La nomenclatura bioquímica para este ácido graso lo define como un ácido graso de 18 carbonos (octa-deca), con dos dobles ligaduras (di-en), separados por una ligadura sencilla (Lawson *et al.*, 2001).

Los CLA son una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoléico que contienen un sistema de doble ligadura conjugada (Bauman *et al.*, 2000; Beaulieu *et al.*, 2002; Calder, 2002; Yu *et al.*, 2002). El isómero más activo e importante del CLA es el *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoico (Kay, 2002), al cual ahora se le denomina "ácido ruminal". Además, representa cerca de 80-85 por ciento del total de los CLA, el *trans-trans* del 5-9 por ciento, el *trans-cis* del 10-13 por ciento, y el *cis-cis* 1 por ciento (Jahreis *et al.*, 2000).

El énfasis por el incremento en el contenido de ácido linoléico conjugado en alimentos ha crecido sustancialmente en años recientes, llegando a existir un gran interés debido a sus actividades de aspecto biológico (Banni *et al.*, 2001). Los beneficios nutricionales asociados con el consumo de CLA demostrados *in vitro* y en modelos animales incluyen propiedades como agente antiarteroesclerosis, anticarcinógeno, modulador del sistema inmune, agente antidiabético, ayuda a la mineralización del hueso, así como facilitador de masa corporal magra (Stanton *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1995; Solomon *et al.*, 2000; Rainio, 2001; Raloff, 2001; Boylston y Beitz, 2002; Dave *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002).

Los suplementos dietéticos con ácido linoléico conjugado (CLA), reducen la síntesis de grasa de leche en vacas lactantes (Loor, 2002) y disminuyen el contenido de grasa corporal en varias especies de animales en crecimiento

(Baumgard *et al.*, 2002). El CLA es también un efectivo antioxidante con actividad en un sistema ácido/fosfato/etanol mayor que la de la vitamina E y similar al hidroxitolueno butilado (Dave, *et al.*, 2002).

Los resultados de tres pruebas en seres humanos que utilizaron suplementos de ácido linoléico conjugado (CLA) demuestran que "comer grasa puede ayudar a perder peso" y que "el CLA quema grasa", lo que resulta atractivo, debido a los marcados incrementos en la obesidad en sociedades desarrolladas (Kelly, 2001)

Se han reconocido efectos positivos en humanos debidos además del CLA al ácido trans-vaccénico (TVA) y a los ácidos  $\Omega$ -3. Los ácidos  $\Omega$  3 también tienen una función en la prevención de ciertas enfermedades cardiovasculares. Se han realizado varios estudios para alterar la composición de la grasa butírica mejorando el valor nutricional de la leche (Dave *et al.*, 2002)

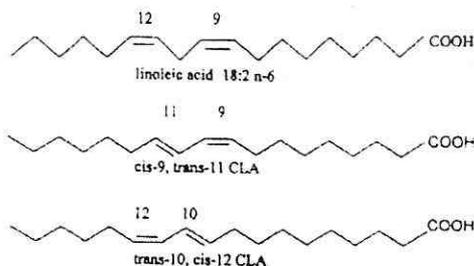


Figura 1. Estructura del ácido linoléico, ácido linoléico conjugado *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12. Evans *et al.* 2002.

#### Biohidrogenación en el Rumen

El rumen es el sitio en donde se lleva a cabo un intenso metabolismo de la grasa y se ha correlacionado positivamente la cantidad de ácidos grasos conjugados en la leche de vaca con el consumo de este ácido en la dieta, indicándose que el CLA formado en el rumen se incorpora a la grasa butírica. El isómero *cis*-9, *trans*-11 es un compuesto intermedio en la biohidrogenación del

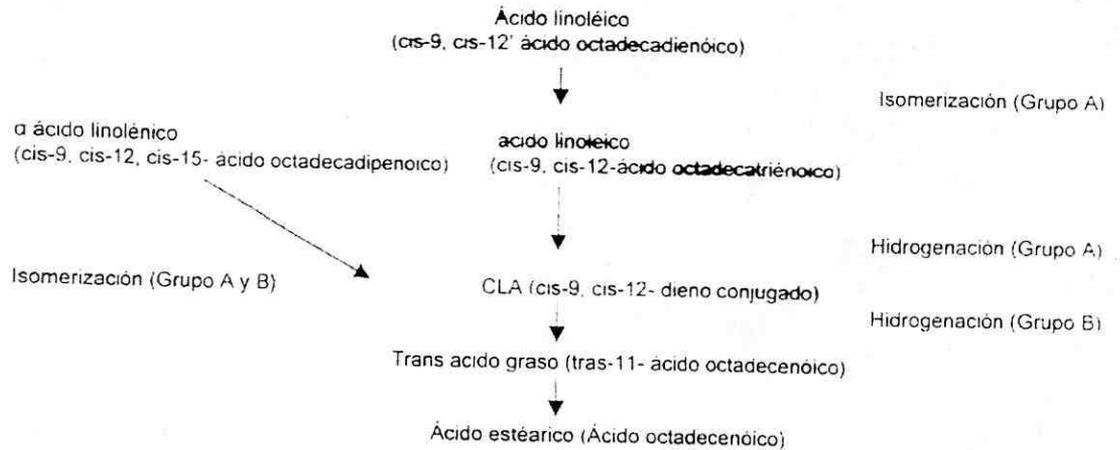
ácido linoléico por los microorganismos *Butyrivibrio fibrisolvens* del rumen (Figura 2) (Lawson *et al.*, 2001).

Se ha propuesto que la formación de CLA en productos lácteos se lleva a cabo por una isomerización del ácido linoléico y ácido linolénico en el rumen a través de la oxidación del ácido linoléico (LA) por radicales libres durante el procesamiento (Lin *et al.*, 1995). El CLA se sintetiza ya sea en el rumen o en los tejidos por una  $\Delta$ -9-desaturasa a partir del *trans*-11 C18:1 TVA (AbuGhazaeh *et al.*, 2002). Existe poca información sobre el mecanismo bioquímico que regula el metabolismo de los diferentes isómeros CLA en los rumiantes, pero los cambios en la cantidad de sustrato y extensión de la biohidrogenación tienen un efecto en el suministro de los productos finales e intermedios de este proceso influyendo por tanto en el contenido de CLA en la leche.

En estudios de biohidrogenación con microorganismos ruminales, el ácido  $\alpha$  linolénico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 ácido octadecatrienoico) se convierte a un trieno conjugado (*cis*-9, *trans*-11, *cis*-15) y después a *trans*-11, *cis*-15 y finalmente a un ácido octadecenoico que puede ser ya sea el *trans*-11, *trans*-15 o el *cis*-15 (Lawson *et al.*, 2001).

#### Contenido de CLA en Grasa Butírica

El CLA se encuentra ampliamente distribuido en muchos alimentos, incluyendo productos lácteos, carnes y ciertos vegetales. El contenido de CLA en productos animales es mucho más alto que en aceites vegetales. Entre los productos animales, el contenido de CLA generalmente se encuentra en cantidades más altas en tejidos de rumiantes que en los de no rumiantes, y los productos lácteos se distinguen como fuentes importantes de CLA. El contenido de CLA en la mayoría de los productos lácteos varía de 2.5-7.0 mg g<sup>-1</sup> de grasa. Los helados sin grasa y el yogurt sin grasa son relativamente bajos en CLA de 0.6 y 1.7 mg g<sup>-1</sup> de grasa respectivamente (Lin *et al.*, 1995). Sin embargo, (Kelly *et al.*, 1998) reportan rangos de 3 a 6 mg g<sup>-1</sup>.



**Figura 2. Reacción de biohidrogenación del ácido linoléico y ácidos  $\alpha$  linolénicos a estearico por el rumen. Notar que el grupo de bacterias A mayormente hidrogenan el ácido linoléico, y al ácido  $\alpha$  linolénico a ácido octadecenoico trans-11. El Grupo de bacterias B son capaces de hidrogenar el ácido octadecenoico a estearico. Lawson, *et al.*, 2001.**

El nivel de consumo de CLA que ha demostrado tener propiedades benéficas es de 3.0 mg g<sup>-1</sup>, extrapolado de estudios en animales. Factores tales como fluctuaciones estacionales, prácticas de alimentación y procesamiento, incluyendo calor, aireación, y la adición de proteínas de suero afectan los niveles de CLA presentes en la grasa butírica (Campbell *et al.*, 2003).

#### Procesamiento y Cambios en Contenido de Ácido Linoléico Conjugado

El contenido de CLA en productos lácteos depende del contenido inicial de CLA en leche cruda, formado a través de reacciones microbianas y enzimáticas en el rumen así como a reacciones de isomerización durante el proceso. Entre los factores que contribuyen a su alto contenido, está la alta calidad de la proteína como donador de hidrógeno. Durante el proceso, la formación de radicales alil de resonancia estabilizada contribuye a la formación de CLA a través de oxidación del LA, seguida por una reprotonización de radicales por proteínas (Lin *et al.*, 1995).

La fermentación láctea es el proceso responsable de generar productos lácteos como el yogurt, y es una forma tradicional de conservar la leche. El consumo de yogurt ha sido considerado por mucho tiempo benéfico a la salud, reportándose desde principios del siglo XX que la longevidad de los búlgaros se debía parcialmente a su rutinario consumo de yogurt. Estudios epidemiológicos en animales han demostrado que los productos lácteos fermentados producidos por bacterias lácticas reducen la incidencia de tumores. Algunas bacterias lácticas son conocidas por su capacidad de antagonizar a las bacterias putrefactivas del intestino al introducir un ambiente ácido, alterando la flora, reduciendo los compuestos mutagénicos y estimulando las respuestas inmunes de las mucosas. Más aún, algunos componentes en la leche, tales como el calcio, vitamina D, vitamina A, y CLA tienen funciones en la prevención del cáncer (Kim y Liu, 2002).

Entre los quesos, el alto contenido de CLA se atribuye al alto contenido de oxígeno, que favorece la oxidación de radicales libres del ácido linoléico (LA) para formar CLA. Durante la elaboración de quesos azules, la cuajada se corta de manera que se permita la incorporación de aire

al interior antes de su curación. El queso suizo incluye pasos adicionales para incorporar exposición al aire. La actividad enzimática de bacterias o mohos utilizados en la maduración de quesos pueden contribuir al contenido de CLA en estos. La función del añejamiento en la formación de CLA es todavía controversial. En quesos procesados, su contenido se atribuye a tratamientos térmicos adicionales (Lin, 1995).

Cuadro 1. Contenido de ácido linoléico conjugado en diversos productos lácteos. Lin (1995).

Muestra	Base en grasa	Base en peso muestra
<b>Quesos</b>		
Azul 1	4.37	147.5
Azul 2	4.66	128.8
Brie	4.75	129.4
Cheddar-medio	4.02	140.0
Cheddar-fuerte	4.59	161.2
Cougar Gold	3.72	130.0
Crema	4.33	142.9
Cottage	4.80	19.60
Edam	5.35	141.7
Monterrey Jack	4.80	142.8
Mozzarella	4.31	91.40
Procesado Americano	3.64	91.10
Procesado Americano para untar 1	4.26	85.40
Procesado Americano para untar 2	4.02	39.00
Parmesano	4.00	69.90
Suizo	5.45	160.90
Viking	3.59	119.50
<b>Productos Lácteos</b>		
<b>Fermentados</b>		
Leche Agria	4.59	5.70
Crema Ácida	4.14	78.10
Yogurt	3.82	7.40
<b>Productos fluidos</b>		
Leche 2% grasa	4.14	9.00
Leche Evaporada 1	3.38	22.20
Leche Evaporada 2	6.39	43.50
Crema para batir	4.24	129.40
Leche entera	3.49	14.20

### Análisis para la Determinación de Ácido Linoléico Conjugado

El descubrimiento de la cromatografía data del año 1897 con el análisis del petróleo por Day, quien presentó sus resultados en la Primer Conferencia Internacional del Petróleo en 1900, aunque en la mayoría de los trabajos de investigación se cita a Tswett en 1903 como el iniciador (Bronz, 2002).

Con algunas excepciones, los isómeros posicionales *cis* y *trans* de los ácidos grasos no se encuentran en la naturaleza, sino que son productos de la industria de los alimentos a partir de aceites y grasas. Su determinación es, por tanto, de importancia sustancial en el control alimenticio. Debido a su similitud en propiedades químicas, el análisis de los isómeros ha sido siempre un desafío. La cromatografía es un método adecuado, e indiscutiblemente, a cromatografía de gases (GC) tiene especial importancia, aunque la sobre-posición entre los isómeros *cis* y *trans* no puede ser evitada completamente con GC al utilizarse como método de separación (Nikolova-Damyanova, 2002).

La composición de ácidos grasos en grasas y aceites se determina por CG como ácido graso de metil éster (FAME). Los FAME se preparan usualmente por saponificación de glicerolípidos, seguido de una metilación. Se catalizan con ácido a metanolisis, o metanolisis catalizada por álcali. De los procedimientos que se han propuesto y utilizado para la preparación de FAME la catalización por álcali tiene una gran ventaja por la rapidez y preparación simple (Ichihara, 1996). Adlof (2002) demostró que la cromatografía de líquidos (HPLC) con solvente isocrático es muy útil para analizar rápidamente no solo los CLA como ésteres, sino también como triglicéridos (TAG).

El número de publicaciones por año que representa la investigación realizada en grasa butírica (ML) permanece igual, salvo pocas excepciones. Esta falta de esfuerzo quizá se deba a la creencia de que "sabemos todo lo que se requiere" dando como resultado que no existen publicaciones sobre ácidos grasos de leches en Estados Unidos que hayan sido analizados por los métodos apropiados y que contengan datos

representativos. Las excepciones mencionadas son aquellas sobre CLA y ácidos grasos trans-insaturados, ya que hay un gran número de publicaciones sobre éstos en la última década pero sólo unos cuantos han aparecido sobre otros lípidos: triacilgliceroles (TAG), esteroides, fosfolípidos (PL), y otros lípidos compuestos (Jensen, 2002).

#### Perspectivas

El éxito de alimentos funcionales depende de la capacidad en la industria de los alimentos para desarrollar productos eficientes que cumplan con las necesidades del consumidor. El potencial global de alimentos funcionales es mucho y aumenta conforme el consumidor se hace más consciente de su salud, tendencias de cuidado asociadas con la edad, conocimiento y poder adquisitivo. El consumidor actual espera que los alimentos sean convenientes, seguros, saludables y, sobre todo, sabrosos. De los alimentos funcionales en particular, se espera que suministren un beneficio para la salud más allá de los atributos básicos para asegurar la salud diaria y futura (Weststrate *et al.*, 2002).

Existen diversas formas de mejorar el valor de la grasa butírica para el consumidor que incluyen diseños de grasa con características nutricionales mejoradas o bien, con atributos físicos deseables en leche y derivados lácteos.

Las estrategias desde la granja incluyen la alteración de regímenes alimenticios y mejoramiento genético. Sin embargo, posterior a la ordeña también se puede alterar la composición de la grasa de la leche con la aplicación de tecnologías apropiadas de procesamiento, pero los cambios en la composición de la grasa que sean benéficos por sus propiedades nutricionales no pueden tener efectos deteriorativos en otros productos. Cuando se adoptan estrategias en la granja se debe tomar en consideración el conjunto de cambios de otros componentes y los efectos de estos cambios en las propiedades de proceso (separación de la crema, tiempo de batido en mantequilla).

#### CONCLUSIONES

La historia de la grasa es interesante a través de la cronología mundial. En la mayoría de los países, el consumo de mantequilla, crema y leche entera ha estado asociado con un nivel de vida más alto que el promedio. En países en desarrollo, la leche en general y la grasa butírica en particular, se han convertido en una delicia, sin embargo, resulta irónico que en años recientes, en países desarrollados el consumo de mantequilla haya disminuido (Jiménez-Flores, 1997).

Existen estrategias para mejorar el valor de la grasa de leche para el consumidor, incluyendo el diseño de grasa con características nutricionales mejoradas y/o atributos físicos deseables en la grasa de los productos lácteos. Estas se pueden utilizar en establos (alteración de regímenes alimenticios y mejoramiento genético) y la aplicación de tecnologías de procesos post-manejo apropiados para alterar la composición de la grasa butírica. Sin tomar en consideración los cambios que se buscan, la leche debe ser manejada apropiadamente para minimizar el riesgo de reacciones deteriorativas en grasa que ocurran en la post-ordeña y durante el procesamiento de la leche. El valor de grasa en leche depende de la compleja interrelación de múltiples factores (Hillbrück y Augustin, 2002).

#### LITERATURA CITADA

- AbuGhazaeh, A. A., D. J. Schingoethe, A. R. Hippen, K. F. Kalscheru and L. A. Whilock. 2002. Feeding fish meal and extruded soybeans enhances the conjugated linoleic acid (CLA) content of milk. *J. Dairy Sci.* 85(3):624-631.
- Adlof, R. O., A. Menzel, A. V. Dorovska-Taran. 2002. Analysis of conjugated linoleic acid-enriched triacylglycerol mixtures by isocratic silver-ion high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 953(1-2):293-97.
- Aigster, A. C. Sims, C. Staples, R. Schmidt and S. E. O'Keefe. 2000. Comparison of cheeses made from milk having normal and high oleic fatty acid compositions. *J. Food Sci.* 65(5):920-924.
- Albertazzi, P. and K. Couplad. 2002. "Polyunsaturated fatty acids: Is there a role in postmenopausal osteoporosis prevention." *Maturitas* 42(1):13-22.

- Banni, S., G. Carta, E. Angioni, E. Murru, P. Scanu, M. P. Melis, D. E. Bauman, S. M. Fischer and C. Ip. 2001. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J Lipid Res.* 42(7):1056-1061.
- Bauman, D. E., D. M. Barbano, D. A. Dwyer and J. M. Griinari. 2000. Technical note; production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. *J. Dairy Sci.* 83(11):2422-5.
- Bauman, D. E., L. H. Baumgard, B. A. Corl, J. M. Griinari. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Sci.*
- Baumgard, L. H., E. Matitashvili, B. A. Corl, D. A. Dwyer and D. E. Bauman. 2002. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85(9):2158-2163.
- Beaulieu, A. D., J. K. Drackley and N. R. Merchen. 2002. Concentrations of conjugated linoleic acid (cis-9, trans-11-octadecadienoic acid) are not increased in tissue lipids of cattle fed a high concentrate diet supplemented with soybean oil. *J. Anim. Sci.* 80(3):847-61.
- Boylston, T. D. and D. C. Beitz. 2002. Conjugated linoleic acid and fatty acid composition of yogurt produced from milk of cows fed soy oil and conjugated linoleic acid. *J. Food Sci.* 67(5): 1973-1978.
- Brondz, I. 2002. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytical Chemical Act* 465(1-2):1-37.
- Eyfield, M. 2002. Fat tries for a comeback. *Report/News magazine.*
- Calder, P. C. 2002. Conjugated linoleic acid in humans—reasons to be cheerful? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5(2):123-6.
- Campbell, W. D., M. A. Drake, and D. K. Larick. 2003. The impact of fortification with conjugated linoleic acid (CLA) on the quality of milk. *J. Dairy Sci.* 86:43-51.
- Dave, R. I., N. Ramaswamy and R. J. Baer. 2002. Changes in fatty acid composition during yogurt processing and their effects on yogurt and probiotic bacteria in milk procured from cows fed different diets. *Austr. J. Dairy Tech.* 57(3):197-202.
- Evans, M. E., J. M. Brown, and M. K. McIntosh. 2002. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *Review. J. Nutr. Biochem.* 13(9):508-516.
- Fearon, A. M. 2001. Optimising milkfat composition and processing properties. *Austr. J. Dairy Tech.* 56(2):104-108.
- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, and K. V. Nurmela. 1998. Transoctadecenoic acid and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.
- Henderson, C. W. 2000. Butter with natural fatty acid reduces risk in animals. *Cancer weekly plus.*
- Hillbrick, G. and M. A. Augustin. 2002. Milkfat characteristics and functionality: opportunities for improvement. *Aust J. Dairy Tech.* 57(1):45-51.
- Ichihara, K. 1996. An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipids* 31(5):535-539.
- Jahreis, G. K. J., R. Tischendorf, F. Schone, Ch. V. Loeffelholz. 2000. Conjugated linoleic acids: Physiological effects in animal and man with special regard to body composition. *Review. Eur J. Lipid Sci. Technol.* 102:695-703.
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids. *J. Dairy Sci.* 85(2):295-350.
- Jimenez-Flores R. 1997. Trends in research for alternate uses of milk fat. *J. Dairy Sci.* 80(10):2644-50.
- Kay, J. M., M. J. Auldust, N. A. Thomson, and D. E. Bauman. 2002. Endogenous synthesis and enhancement of conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.* 62:12-15.
- Kelly, G. S. 2001. Conjugated linoleic acid—a new weapon in the battle of the bulge? *Nutr. Bulletin* 26(1):9-10.
- Kelly, M. L., E. S. Kolver, D. E. Bauman, M. E. Van Amburgh, and L. D. Muller. 1998. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81(6):1630-6.
- Kim, Y. J. and R. H. Liu. 1999. Selective increase in conjugated linoleic acid in milk fat by crystallization. *J. Food Sci.* 64(5):792-795.
- 2002. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 67(5):1731-1737.
- Lawson, R. E., A. R. Moss, and D. I. Givens. 2001. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. *Nutr. Res. Rev.* 14(1):153-172.
- Lin, H., T. D. Boylston, M. J. Chang, L. O. Leudecke, and T. D. Shultz. 1995. Survey of the conjugated linoleic acid content of Dairy Products. *J. Dairy Sci.* 78(11):2558-2365.

- Loor, J. J., J. H. Herbein, and C. E. Polan. 2002. Trans 18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat of grazing cows fed a grain supplement containing solvent-extracted or mechanically extracted soybean meal. *J. Dairy Sci.* 85(6):1197-1207.
- Nikolova-Damyanova, B. M. 2002. Silver ion HPLC for the analysis of positionally isomeric fatty acids. *J. Liq Chromatogr R T* 25(13-15):1947-1965.
- Rainio, A. V., M. Vahvaselkä, T. Suomalainen, and S. Laakso. 2001. Reduction of linoleic acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii*. *Can J. Microbiol.* 47:735-740.
- Raloff, J. 2001. The Good trans Fat. *Sci. News* 159(9):136-138.
- Solomon, R., L. E. Chase, D. Ben-Ghedalia, and D. E. Bauman. 2000. The effect of non structural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83(6):1322-1329.
- Stanton, C. and F. I. Lawless. 1997. Dietary influences on bovine milk cis-9, trans 11-conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.* 62(5):1083-1086.
- Weststrate, J. A., A. G. Van Poppel, and P. M. Verschuren. 2002. Functional foods, trends and future. *Br. J. Nutr.* 88 Suppl. 2: S233-5.
- Yu, L., D. Adams and M. Gabel. 2002. Conjugated linoleic acid isomers differ in their free radical scavenging properties. *J. Agric. Food Chem.* 50(14):4135-40.