



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PARA
BIOSINTETIZAR ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO POR
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE IMPORTANCIA
TECNOLÓGICA**

Por:

Blanca Nayelli Ocampo Morales

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE
ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Septiembre, 2018

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Blanca Nayelli Ocampo Morales, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Aaron Fernando González Córdova
Director de Tesis



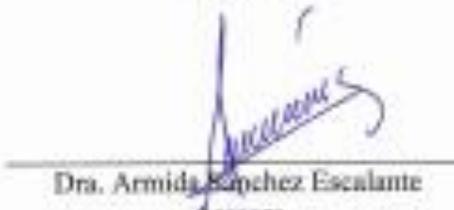
Dra. Belinda Vallejo Galland
Asesora



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor



Dra. María de Jesús Torrez Llanez
Asesora



Dra. Armida Sánchez Escalante
Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante los estudios de maestría, ya que sin ellos se me hubiera hecho más difícil lograrlo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C(CIAD), por brindarme la confianza y el apoyo para realizar mis estudios de posgrado.

A mi Director de tesis, Dr. Aarón Fernando González Córdova, por su compromiso, apoyo y formación brindado durante mi estancia por CIAD.

A mi comité de tesis, ya que gracias a su apoyo y aportaciones este trabajo de investigación llegó a un buen término. A mi asesora, Dra. Belinda Vallejo Galland, por sus aportaciones oportunas realizadas al trabajo de tesis. A mi asesor, Dr. Adrián Hernández Mendoza, por sus revisiones y contribuciones al trabajo. A mi asesora, Dra. María de Jesús Torres Llánez, por su apoyo para concluir el trabajo de tesis. A mi asesora Dra. Armida Sánchez Escalante, por sus contribuciones al desarrollo del trabajo de tesis.

A la M.C. María del Carmen Estrada Montoya, por su apoyo técnico en las técnicas cromatográficas y aportaciones para la realización de este trabajo.

Al M.C. Ricardo Reyes Díaz, por su apoyo técnico y asesoría, por su paciencia y empeño en que el experimento saliera adelante. Por animarme y escucharme siempre, por brindarme su amistad.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Lácteos. En especial quiero agradecer a Lourdes Santiago López, por su asesoría sobre microbiología, revisión del escrito final y aportaciones para la realización de este trabajo. Al Dr. Miguel Ángel Mazorra, por sus asesorías para la preparación de buffers. A la Dra. Priscilia Heredia, por su aportación en

el área de microbiología. Al cDr. José Eleazar Aguilar Toalá, por su asesoría para el uso del espectrofotómetro. A Carmen Manzanares por apoyarme en la revisión de mis presentaciones para poder mejorar. A Alejandro Santos por su apoyo en la revisión de la tesis.

A los docentes de CIAD, que aparte de ser buenos profesionistas son excelentes seres humanos. Dr. Humberto González, por sus asesorías y tener la disposición para aclarar cualquier duda durante el curso de estadística. Al Dr. Martín Valenzuela, por su paciencia, por sus asesorías en métodos estadísticos y por brindarme su amistad. Al Dr. Ramón Pacheco por aceptarme como oyente en su asignatura de lípidos, por transmitir con pasión el conocimiento. A la Dra. Osiris Álvarez, por hacer divertida la estadística multivariada, por su contribución a mi formación académica y personal. A la Dra. Marícarmen Thalía Recillas por sus consejos y amistad.

A mis compañeros de laboratorio que me apoyaron e hicieron más ameno el paso por CIAD y siempre estuvieron en la disposición de apoyarme, Alex, Alejandro, Wendy, David, Miguel, Eleazar, Lourdes y Talina.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mi hija María del Carmen Díaz Ocampo porque desde que llegaste a mi vida me impulsaste a lograr nuevas metas, a creer en lo imposible, a ser más fuerte para ti. Por todo lo que me ha enseñado, por inspirarme a ser mejor, y enseñarme el significado de amar, por creer en mí. Por ser una niña tan linda, estudiosa y lo más importante buena persona, pese a mi ausencia, espero recuperar el tiempo perdido.

A Dios por darme vida y permitirme lograr mis sueños, por acompañarme cada vez que he caído y ayudar a levantarme sin tu gracia nada sería posible.

A Adela Sánchez Segundo por creer en mí, por apoyarme en cuidar y consentir a mi Carmen mientras estudiaba la universidad, por querer a mi pequeña niña.

A mis hermanos Jaime Fernando, Andrés y Dulce por estar siempre para mí y apoyarme a lograr mis metas, por ser mis compañeros de vida y de travesuras en la infancia. Por confiar en mí y enseñarme a sobrellevar las dificultades con sentido del humor.

A mis amigos (Marichuy, Isabel y Tano), porque el tiempo nos ha ayudado a consolidar una amistad fuerte.

A la Universidad Autónoma Chapingo que me becó durante siete años; de no haber sido así, me hubiera sido imposible continuar con mis estudios.

CONTENIDO

APROBACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	2
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCION	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Bacterias Ácido Lácticas	15
2.1.1. Características Generales.....	15
2.1.2. Propiedades Tecnológicas de las BAL	16
2.2. Características y Propiedades Biológicas del CLA.....	18
2.2.1. Características Fisicoquímicas del CLA.....	18
2.2.2. Digestión de CLA	19
2.2.3. El CLA y sus Funciones Biológicas	20
2.2.3.1. Efecto antiobesogénico de CLA	20
2.2.3.2. Efecto anticarcinogénico del CLA.....	21
2.2.3.3. Efecto del CLA sobre la respuesta antiinflamatoria.	21
2.2.3.4. Efecto del CLA sobre la respuesta antiosteoporótica.	22
2.3. Métodos de Producción de CLA	23
2.3.1. Síntesis Alcalina	23
2.3.2. Producción de CLA Aislado la Enzima Linoleato Isomerasa	24
2.3.3. Producción de CLA por Células Lavadas.....	25
2.3.4. Producción de CLA por Inmovilización de la Enzima Linoleato Isomerasa.....	26
2.3.5. Producción de CLA por BAL.....	26
2.4. Mecanismos de Producción de CLA por BAL.....	27
2.5. Factores que Determinan la Producción de CLA por BAL.....	31
2.6. Grupos Específicos de BAL Productoras de CLA	33
2.6.1. <i>Enterococcus</i> spp. como Productor de CLA.....	37
3. HIPÓTESIS	38
4. OBJETIVOS	39
5. METODOLOGÍA	40
5.1. Reactivación y Propagación de Cepas.....	40
5.2. Preparación de la Solución Stock de LA.....	40
5.3. Preparación del Medio de Cultivo Enriquecido con LA	41

CONTENIDO (continuación)

5.4. Cuantificación de CLA por el Método Espectrofotométrico	41
5.5. Cuantificación e Identificación de CLA por Cromatografía de Gases.....	42
5.6. Diseño Estadístico	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1. Cuantificación de CLA por el Método Espectrofotométrico	44
6.2. Cuantificación de CLA por Cromatografía de Gases.....	47
6.2.1. Determinación de los Isómeros de CLA.....	50
6.2.2. Porcentajes de Bioconversión de LA a CLA.....	52
7. CONCLUSIONES.....	58
8. BIBLIOGRAFÍA.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de los isómeros de CLA c9, t11 y t10, c12.....	18
2	Mecanismo de hidrólisis de triglicéridos.....	24
3	Reacción de óxido reducción para la producción de CLA.....	28
4	Mecanismo de producción de los isómeros de CLA por acción de las BAL.....	29
5	Curva estándar de CLA por método espectrofotométrico.....	44
6	Concentración de CLA por cepas de <i>Enterococcus</i> spp y <i>Lactobacillus</i> spp. determinado por espectrofotometría.....	45
7	Curva estándar del isómero c9, t11 para la determinación de CLA por cromatografía de gases.....	47
8	Curva estándar del isómero CLA t10, c12 para la determinación de CLA por cromatografía de gases.....	48
9	Concentración de CLA por cepas de <i>Enterococcus</i> spp. y <i>Lactobacillus</i> spp. determinado por cromatografía de gases.....	49
10	Concentración de isómeros de CLA por cepas de <i>Enterococcus</i> spp y cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i>	51
11	Representación de los tiempos de retención para el LA y CLA de la cepa testigo <i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55739.....	55
12	Representación de los isómeros de CLA producidos por <i>Lactobacillus fermentum</i> J10.....	56
13	Representación de los isómeros de CLA producidos por la cepa de <i>Enterococcus</i> S18.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Localización de LI en BAL y producción de isómeros de CLA.....	30
2	Diferentes cepas de BAL productoras de CLA.....	36
3	Porcentaje de conversión de LA a CLA de las cepas de estudio.....	53

RESUMEN

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un ácido graso que se puede encontrar de manera natural en alimentos como carne y productos lácteos. Ha sido demostrado que el consumo diario de CLA puede tener beneficios a la salud, sin embargo, las cantidades presentes en los alimentos es baja. Por lo anterior, que se han desarrollado diversas estrategias para incrementar las concentraciones en los alimentos. Una estrategia es el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) específicas como bioconvertidoras de este compuesto, no obstante, se ha reportado que la producción de este compuesto es cepa dependiente. Debido a esto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de cepas específicas de BAL para bioconvertir CLA a partir de ácido linoleico (LA). En este estudio se emplearon cinco cepas de *Enterococcus* spp y dos cepas *Lactobacillus fermentum*, las cuales fueron reactivadas en caldo M17 y MRS, respectivamente, enriquecidos con 2 mg/mL de LA y la determinación de CLA se realizó por espectrofotometría y cromatografía de gases (CG). Con el método espectrofotométrico, se demostró que todas las cepas de estudio presentaron capacidad de biosintetizar CLA, siendo *Enterococcus* spp L45 la que mostró mayor bioconversión ($20.88 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0.05$). Sin embargo, mediante CG las cepas de *Enterococcus* spp S18 ($34.54 \pm 0.59 \mu\text{g/mL}$) y S25 ($33.07 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$) fueron significativamente ($p < 0.05$) más altas y, L45 presentó la menor bioconversión ($9.06 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0.05$). Las dos cepas de *Lactobacillus fermentum*, se caracterizaron por producir en mayor proporción, el isómero c9, t11; y las cepas de *Enterococcus* spp, produjeron ambos isómeros en proporciones similares. Finalmente, todas las cepas evaluadas mostraron un porcentaje de conversión de LA a CLA significativamente iguales a la cepa testigo *Lactobacillus reuteri*, a excepción de *Enterococcus* spp S25 y L45 que mostraron los porcentajes más bajos de bioconversión ($p < 0.05$). Los resultados sugieren que todas las cepas de estudio presentaron el potencial de biosintetizar CLA a partir de LA. Asimismo, las cepas de *Enterococcus* spp S18 y S25 pueden ser consideradas para la elaboración de productos fermentados con efectos benéficos a la salud.

Palabras clave: CLA, *Lactobacillus*, *Enterococcus*.

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is a fatty acid that may present in foods, such as meat and dairy products. It has been demonstrated that CLA may have beneficial effects on human health. However, concentrations present in foods are low, hence some strategies have been developed to increase these concentrations. One strategy may be through fermentation with specific lactic acid bacteria (LAB) as bioconverters of this compound, however the production of CLA is strain-dependent. Therefore, the objective of the present work was to evaluate specific LAB strains for their capacity to biosynthesize CLA. Five strains of *Enterococcus* spp and two strains of *Lactobacillus* were cultured in M17 and MRS broth, respectively, enriched with 2 mg/mL of linoleic acid. A spectrophotometric and gas chromatography (GC) techniques were carried out for the CLA determination. Results from the spectrophotometric assay, demonstrated that all evaluated strains had the ability to biosynthesize CLA, being *Enterococcus* L45 strain with the highest concentration ($20.88 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0.05$). Nevertheless, the GC determination *Enterococcus* S18 ($34.54 \pm 0.59 \mu\text{g/mL}$) and S25 ($33.07 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$) showed the highest ($p < 0.05$) concentration, and L45 strain presented the lowest concentration ($9.06 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0.05$). Particularly, *Lactobacillus fermentum* strains were characterized as being highly productive of isomer c9, t11, and *Enterococcus* spp strains produced both isomers in similar proportions. Finally, all evaluated strains were able to biosynthesize CLA from LA significantly the same percentage with respect the control strain (*Lactobacillus reuteri*); however, *Enterococcus* S25 and L45 presented the lowest percentages ($p < 0.05$) of bioconversion. These results suggest that all evaluated strains have the potential to biosynthesize CLA from LA. Furthermore, *Enterococcus* spp S18 and S25, may be considered for the production of fermented foods with potential beneficial effects.

Keywords: CLA, *Lactobacillus*, *Enterococcus*.

1. INTRODUCCION

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos ampliamente utilizados en la tecnología de alimentos, debido a características organolépticas como sabor, aroma y textura que estas brindan (McSweeney, 2004; Fadda et al., 2010). Además, se ha reportado que algunos géneros de BAL tienen la capacidad de liberar diferentes metabolitos con actividad biológica, como es el ácido linoleico conjugado (CLA, por sus siglas en inglés) (Park y Nam, 2015; Kuhl y De Dea, 2016) el cual se ha reportado que presenta actividad anticancerígena, antiobesogénica, antidiabetogénica, antiinflamatoria y antiarterogénica (Kuhl y De Dea, 2016).

La ingesta diaria de CLA recomendada para obtener efectos sobre la salud humana es de aproximadamente 1-3 g/día (MacDonald, 2000). Sin embargo, la ingesta media estimada de CLA en adultos es de aproximadamente 0.1-0.4 g/día (National Cattlemen´s Beef Association, 2007). Por lo que la industria ha desarrollado diferentes productos disponibles en el mercado como Tonalín que es el más ampliamente reportado, el cual tiene una composición aproximada de 80% de CLA que se compone principalmente de una mezcla de isómeros t9, c11 y t10, c12 (1:1) (EFSA, 2010). Sin embargo, en un estudio realizado por (Benjamin et al., 2015) reportan efectos adversos al consumo de CLA comerciales. Aunado a lo anterior y a las cantidades insuficientes de CLA contenidas en los alimentos para tener un efecto benéfico a la salud, es necesario el desarrollo de productos funcionales con CLA.

Diversas BAL han demostrado producir los isómeros c9, t11 y t10, c12 a partir de ácido linoleico presente en los alimentos. Éstos isómeros pueden ser sintetizados de manera *in vitro* por diferentes métodos siendo por BAL uno de los que han sido estudiados debido a que estas bacterias pueden estar presentes de forma natural en los alimentos o pueden ser incorporados. Se han encontrado cepas altamente productivas de diferentes géneros, principalmente las pertenecientes a *Lactobacillus* spp. (Kishino et al., 2002; Gorissen et al., 2011). El método de producción de CLA por BAL es un método económico,

comparado con otros métodos de producción de CLA (Salamon et al., 2012). Cepas del género *Enterococcus* spp. han sido escasamente estudiadas, por lo que, al ser poblaciones abundantes en lácteos fermentados podrían representar un área de oportunidad en la búsqueda de cepas productoras de CLA (Lahtinen et al., 2012). Sin embargo, su producción depende de factores como cepa, actividad de la enzima linoleato isomerasa (LI) y la concentración del ácido linoleico (LA) en el medio como precursor de CLA (Lin et al., 1999; Andrade et al., 2012; Gorissen et al., 2015). Por lo antes mencionado, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de cepas específicas de BAL para biosintetizar CLA.

2. ANTECEDENTES

2.1. Bacterias Ácido Lácticas

2.1.1. Características Generales

Las BAL son un grupo de microorganismos que se encuentran en dos *phyla* distintos: Firmicutes y Actinobacteria. Dentro de los Firmicutes, las BAL se clasifican en el orden Lactobacillales, que incluye los géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. El *phylum* Actinobacteria sólo incluye especies del género *Bifidobacterium*. Las BAL son gram positivas, forma de coco o bacilo, anaerobias facultativas, no esporuladas y tolerantes a los ácidos (Lahtinen et al., 2012; Patrick, 2012). Las BAL se clasifican como homofermentativas, siendo el ácido láctico el principal producto de la fermentación; y como heterofermentativas, ya que además de ácido láctico, producen cantidades significativas de CO₂, etanol y ácidos orgánicos (Gänzle et al., 2007; Lahtinen et al., 2012).

La pared celular de las bacterias gram-positivas se compone de peptidoglicanos, ácidos teicoicos, polisacáridos y proteínas que rodean el citoplasma. Chapot-Chartier y Kulakauskas (2014) reportaron que los polisacáridos expuestos a la superficie tienen funciones de adherencia a las superficies abióticas y de formación de biofilms (placa bacteriana). Además, las proteínas de superficie de las BAL facilitan la colonización de la mucosa y la persistencia en el tracto gastrointestinal.

Por otro lado, las BAL producen una gran variedad de compuestos biológicos como respuesta al estrés. Por ejemplo, el estrés ácido en presencia de azúcares (estrés osmótico)

estimula la producción de exopolisacáridos (Audy et al., 2010) y un decremento del pH estimula la producción de ácido γ -aminobutírico (GABA) (Komatsuzaki et al., 2008), así como, la producción de bacteriocinas (Abbasiliasi et al., 2017). También se ha demostrado que las BAL responden ante el estrés osmótico, ya que las células producen moléculas pequeñas llamadas osmolitos (por ejemplo, glicina, betaína, colina o prolina), para equilibrar la presión osmótica celular, permitiendo la rehidratación a través de canales asociados a la membrana (Sleator, 2002). Otro mecanismo de respuesta de las BAL es ante un compuesto tóxico, generando incremento o producción de ácidos grasos *trans* saturados e insaturados en la membrana celular (Mrozik et al., 2004). En este sentido, Coaklhan et al. (2003), reportaron que la conversión de LA a CLA es un mecanismo de desintoxicación de las BAL.

2.1.2. Propiedades Tecnológicas de las BAL

Las BAL contribuyen al desarrollo de propiedades organolépticas en los alimentos. En quesos se han identificado cambios bioquímicos durante la maduración, como son: lipólisis, proteólisis y glucólisis (McSweeney, 2004). Estos cambios tienen efectos positivos sobre las características organolépticas de los alimentos como son sabor y textura. Por ejemplo, los productos lácteos son una buena fuente de ácidos grasos, especialmente de cadena corta, que mediante lipasas y esterases contenidas en las BAL se hidrolizan, obteniéndose compuestos como metilcetonas, lactonas, ésteres, alcoholes secundarios y aldehídos, los cuales son los responsables de generar aroma y sabor (McSweeney, 2004). Además, cepas específicas de *Enterococcus* spp. se han identificado que contribuyen al sabor mediante el metabolismo de citrato donde se producen compuestos como diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol (Medina et al., 2011).

Durante el proceso de fermentación láctica, se lleva a cabo la hidrólisis por enzimas proteolíticas que se encuentran inmersas en las BAL; por consecuencia, se lleva a cabo la liberación de péptidos y aminoácidos (*e.g.*, fenilalanina, tirosina, y triptófano). (Bontinis

et al., 2012; Viana y Dias, 2017). Para los aminoácidos se describen al menos tres rutas mediante las cuales se convierten a compuestos aromáticos y de sabor. La vía α -keto participa en la conversión de aminoácidos a alcoholes; la presencia de enzimas liasas, como la cistationina β -liasa, que puede convertir la metionina en metanotiol; así como una tercera ruta, en la que se realiza la descarboxilación de aminoácidos a aminas (Smit et al., 2005).

Los compuestos antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), bacteriocinas, entre otros, que son generados por las BAL, también ayudan a prolongar la vida de anaquel de los alimentos, así como a mantener la inocuidad de los mismos al eliminar bacterias patógenas (Gálvez et al., 2010). Los ácidos orgánicos (e.g., láctico, acético, succínico, propiónico y butírico) provocan un descenso del pH (Özcelik et al., 2016), teniendo un efecto en el potencial de membrana, inhibiendo funciones metabólicas de las bacterias patógenas. Por otro lado, el diacetilo es un compuesto volátil producido por BAL como producto del metabolismo del citrato, que también inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos (Rincon-Delgadillo et al., 2012). Mientras que, el H_2O_2 tiene un efecto oxidante sobre las células bacterianas; y la presencia de bacteriocinas, como la nicina, interactúan con lípidos de la membrana y promueven la formación de poros (Viana y Dias, 2017).

Aunado a lo anterior, las BAL son empleadas en la industria de los alimentos como fuentes de vitaminas, enzimas, carbohidratos y exopolisacáridos. Los exopolisacáridos tienen una función de protección al entorno; en la industria alimentaría son empleados como estabilizantes, emulsificantes o agentes gelificantes (Viana y Dias, 2017). El ácido láctico se usa en la industria alimentaria como acidificante y agente potenciador de sabor (Florou-Paneri et al., 2013). Respecto a las enzimas, se ha reportado que las peptidasas producidas por cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* mejoran la calidad sensorial de los quesos (Patel et al., 2013). Así mismo, se ha reportado que algunas BAL tienen la capacidad de producir CLA, como metabolito secundario y en respuesta a condiciones de estrés (Ruíz et al., 2010).

2.2. Características y Propiedades Biológicas del CLA

2.2.1. Características Fisicoquímicas del CLA

El ácido octadecadienoico, también conocido como CLA, es un ácido graso de 18 carbonos que tiene un par de dobles enlaces conjugados (18:2) a lo largo de la cadena de alquilo. Teóricamente, los dobles enlaces pueden existir en cualquier lugar entre los carbonos C2 a C18 para producir 28 isómeros estructurales (Akoh y Min, 2008). Los dobles enlaces pueden tener una posición “*cis*” o “*trans*”, afectando la conformación en el espacio de la molécula; cuando es un enlace “*cis*” se genera una estructura curva a la molécula; mientras que cuando es “*trans*”, la estructura es lineal. Los isómeros más estudiados por sus propiedades biológicas son c9, t11 y t10, c12. En la Figura 1 se observa la conformación de cada uno de estos dos isómeros de acuerdo al tipo de enlace.

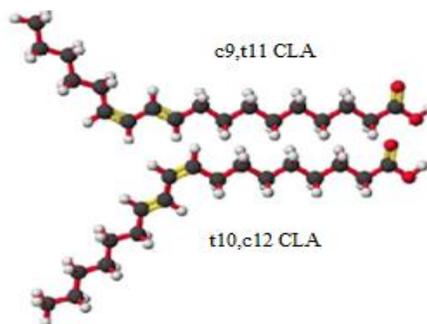


Figura 1. Estructura de los isómeros de CLA c9,t11 y t10,c12.

Las características fisicoquímicas del CLA son estabilidad a la temperatura, pero susceptibilidad a la autooxidación. Este último proceso puede acelerarse debido a factores como temperatura, luz y presencia de oxígeno (Fox, 1991). Yang et al. (2000) encontraron que el 80 % de la oxidación del CLA ocurre a las 110 h a una temperatura de 50 °C. Chen (2001) mostró que, bajo el tratamiento de temperatura o iluminación, el metil linoleato

conjugado es susceptible a degradación. Estas propiedades también se deben a su estructura química; la presencia de dos sistemas 1-4 pentadieno lo hace susceptible a la autoxidación, con lo cual se activan una serie de reacciones y la formación de compuestos como radicales libres, hidroperóxidos, aldehídos y cetonas (Akoh y Min, 2008).

2.2.2. Digestión de CLA

Para su digestión, el CLA se agrupa en micelas con ayuda de las sales biliares. La lipasa, activada por las sales biliares del páncreas, junto con la colipasa, son las principales enzimas digestivas para la hidrólisis de diglicéridos y triglicéridos que contienen CLA. Las micelas se forman espontáneamente a partir de la mezcla de ácidos grasos, monoglicéridos, ácidos biliares y fosfolípidos. Los triglicéridos se agrupan en quilomicrones con ésteres de colesterol, fosfolípidos y una molécula de apolipoproteína B48 luego, es secretada en vasos linfáticos intestinales. Las proteínas de unión a ácidos grasos 1 y 2, proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP) y proteínas adicionales son necesarias para el transporte intracelular de ácidos grasos y su subsiguiente ensamblaje y secreción de quilomicrones (Kohlmeier, 2015).

En estudios previos, Sosa-Castañeda et al. (2015), encontró que la leche fermentada con *Lactobacillus pentosus* J26, después de ser sometida a un proceso de simulación gastrointestinal, incrementó la producción de algunos isómeros de CLA hasta en un 63.63%. Por otro lado, se reportó que *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 crece en presencia de 0.3% de bilis de bovino, produciendo 118.7 µg/mL de c9, t11 CLA (Roman-Nunez et al., 2007). Las dos investigaciones anteriores sugieren que este comportamiento puede deberse a que las sales biliares podrían alterar la permeabilidad de células bacterianas y favorecer la biosíntesis de los isómeros de CLA por las BAL.

2.2.3. El CLA y sus Funciones Biológicas

De manera general, a los isómeros de CLA se les han atribuido bioactividades como; efecto antioxidante, anticarcinogénico, antiobesogénico, inmunomodulador, antiosteoporótico, antiaterosclerótico y disminución en los niveles de glucosa (Pariza y Cook, 2001; Kuhl y De Dea, 2016). El efecto antioxidante del CLA podría deberse a los dobles enlaces conjugados que contribuyen a la captura del radical (Yang et al., 2000; Faglai y Catalá, 2008). Hasta ahora, la mayoría de los estudios en los cuales se han intentado demostrar los efectos benéficos del CLA en modelos con animales y humanos, no han permitido evidenciar contundentemente diversos efectos; sin embargo, a continuación, se abordarán algunos efectos del CLA que han sido mayormente estudiados.

2.2.3.1. Efecto antiobesogénico de CLA. Hay diversos estudios en donde se analiza el efecto antiobesogénico del CLA. En un estudio clínico realizado con 20 personas, se consumió 1.8 g de CLA/día, y disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la grasa corporal después de 4, 8 y 12 semanas (Thom et al., 2001). Asimismo, en un estudio con personas con obesidad, se demostró una disminución significativa ($p < 0.05$) de la grasa corporal cuando se consumió 3.4 g de CLA (Blankson et al., 2000). Otro estudio realizado con 53 personas, entre hombres y mujeres, que ingirieron 4.2 g/día de CLA, se demostró una disminución significativa ($p < 0.05$) de la grasa corporal en un 3.8% (Smedman y Vessby, 2001). Finalmente, en una revisión realizada por Tricon et al. (2005), encontraron que cuatro de siete estudios en humanos, presentaron una posible disminución en la grasa corporal. Algunas de las variables que pudieron influenciar los resultados de estos estudios pudieran ser la alimentación y el ejercicio; además, en algunos de los estudios el tamaño de muestra no fue el adecuado y los efectos son inferiores a los observados en animales.

El mecanismo por el cual el CLA conduce a una disminución en la deposición de grasa es desconocido. Aunque se ha demostrado que la suplementación con t10, c12 CLA resulta en reducción de la grasa corporal en modelos in vivo con animales y humanos. Yang et al. (2015), reportaron que el isómero t10, c12 CLA, se asocia con la inducción de apoptosis

en cultivos de líneas celulares de preadipocitos. El isómero t10, c12 aumenta la β -oxidación, lo que conlleva a una reducción de la síntesis de triacilglicéridos y se reduce el tamaño de los adipositos (Lehnen et al., 2015).

2.2.3.2. Efecto anticarcinogénico del CLA. Aunque no existen muchos estudios sobre este potencial efecto, los estudios publicados al respecto demostraron que los isómeros de CLA inhibieron el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3) y cáncer colorectal (HT-29 y MIP-101) (Palombo et al., 2002). Una concentración de 100 μ M de CLA inhibió hasta un 95% a células HT-29. Mientras que, el isómero t10, c12, a una concentración de 100 μ M, reduce significativamente ($p < 0.05$) la proliferación de MIP-101. El CLA y los efectos sobre el cáncer de próstata del t10, c12 son mediados a través de la modulación de apoptosis y control del ciclo celular. En un estudio in vitro con células de cáncer de próstata LNCaP, se indicó que los isómeros de CLA tienen efecto antiproliferativo y podrían tener efectos variables sobre la isoforma de la proteína C quinasa (Song et al., 2005).

2.2.3.3. Efecto del CLA sobre la respuesta antiinflamatoria. La cuantificación de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1, interferón- γ (IFN) etc.), así como, citocinas antiinflamatorias (IL-10), eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos) y óxido nítrico (ON), son mediadores de la respuesta inflamatoria y son regulados por la ingesta dietética de ácidos grasos poliinsaturados. En este sentido, el efecto antiinflamatorio de los isómeros del CLA puede ser mediado por la respuesta de TNF- α (Pariza et al., 2000) como una vía principal de respuesta a los procesos inflamatorios en patologías crónicas como: arterosclerosis, carcinogénesis y obesidad (Ross, 1990; Hotamisligil et al., 1994; Suganuma et al., 1996).

Diversos estudios clínicos han reportado el efecto antiinflamatorio por el consumo de los isómeros c9, t11 y t10. Por ejemplo, en un estudio clínico se demostró que el consumo de isómeros c9, t11 y t10, c12 (50:50), por 12 semanas, disminuyó la concentración de

citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β (Song et al., 2005). Mientras que, el consumo de un 80% de los isómeros c9, t11 y t10, c12, durante 8 semanas, incrementó el número de linfocitos T (Tricon et al., 2005). Albers et al. (2003), encontraron que 71 hombres que consumieron c9, t11 y t10, c12 (50:50) incrementaron la respuesta humoral (producción de anticuerpos) contra hepatitis B. Sin embargo, en un estudio realizado por Kelley et al. (2000), no se encontraron efectos significativos ($p > 0.05$) sobre el número de leucocitos, células B y T, después de ingerir 3.9 g de CLA por día. En base a los estudios reportados, se encontró que el efecto del CLA es dependiente de la concentración y del tiempo de estudio.

2.2.3.4. Efecto del CLA sobre la respuesta antiosteoporótica. En diferentes estudios, tanto in vitro (líneas celulares) como in vivo (modelos con animales), se ha reportado haberse encontrado aumento en la absorción de calcio y la densidad ósea por efecto del CLA (Bhattacharya et al., 2006). Deguire et al. (2012), encontraron una relación significativa entre el consumo de CLA (3 g) y la composición mineral ósea en hombres. Además, la interacción del isómero c9, t11, con osteoblastos, células de hueso, incrementó en el número y tamaño de los nódulos de mineralización de hueso; esto podría deberse a un incremento de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (Platt et al., 2007). Sin embargo, Kreider et al. (2002) no observaron cambios significativos ($p > 0.05$) en la densidad ósea de 23 voluntarios que ingirieron 6 g/d de CLA.

Uno de los mecanismos propuestos del efecto antiosteoporótico del CLA se relaciona con la regulación de la leptina debido a que ésta influye negativamente en la diferenciación de osteoblastos (Hur y Park, 2007), así como, en bajar los niveles de prostaglandinas (PGE₂), lo que influye en el factor de crecimiento insulínico, y proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; alterna la resorción del hueso dependiente de PGE₂; regula la leptina y a su vez reduce la resorción ósea (Thomas y Burguera, 2002; Theoleyre et al., 2004).

2.3. Métodos de Producción de CLA

2.3.1. Síntesis Alcalina

Durante el proceso de isomerización alcalina, el LA se trata a temperaturas de 200-250 °C bajo condiciones alcalinas y atmósfera inerte (con N₂). Algunas bases fuertes, como NaOH o KOH se usan para saponificar a los triglicéridos y para isomerizar los ácidos grasos libres. Posteriormente, la fase acuosa alcalina, que contiene glicerol, separa la fase saponificada de los ácidos grasos, en su mayoría ácido cítrico, para convertirlos en ácidos grasos libres enriquecidos en CLA. El proceso de la técnica alcalina produce mezclas equimolares de c9,t11 y t10,c12 CLA con altos rendimientos (Pierre y Sels, 2011).

La producción de CLA involucra un proceso de hidrólisis de triglicéridos que se lleva a cabo en presencia de agua o una base fuerte. Más de tres moles de hidróxido de potasio o hidróxido de sodio se requieren para hidrolizar un mol de triglicérido. En la Figura 2 se observa la hidrólisis de triglicéridos por la presencia de un ácido, agua o una base, dando como resultado la separación de glicerol y tres ácidos grasos (Yurawecz, 1999; Hermansyah et al., 2010).

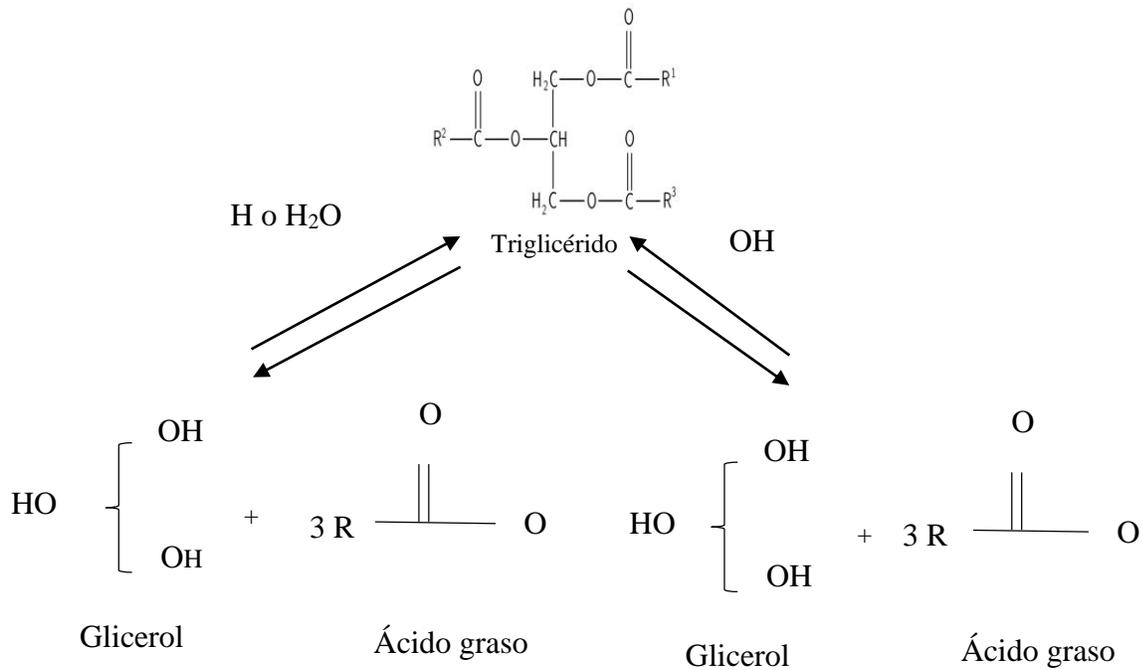


Figura 2. Mecanismo de hidrólisis de triglicéridos. Fuente: Yurawecz, (1999)

La obtención de CLA con bases alcalinas fuertes en alcohol y glicerol es el menos costoso, obteniendo un rendimiento de aproximadamente 54.6-97.2%. La producción más alta se obtiene utilizando hidróxido de potasio y como solvente etilenglicol (Philippaerts et al., 2011). Sin embargo, la desventaja por el uso de sustancias como glicerol monohídrico o polihídrico y etilenglicol, es eliminar los niveles residuales (Yurawecz, 1999), además de que el etilenglicol es un producto tóxico, que puede provocar trastornos gastrointestinales, depresión del sistema nervioso central y acidosis metabólica (Fowles et al., 2017).

2.3.2. Producción de CLA Aislado la Enzima Linoleato Isomerasa

Otro de los métodos de obtención del CLA, es mediante la utilización de la enzima LI sintetizada a partir de diferentes géneros de BAL, siendo con este método con el cual se

ha logrado obtener alta concentración de CLA. Lin et al. (2003), utilizaron el 1% (v/v) de la enzima producida por *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079, e incrementó la cantidad de CLA de 8 a 305 µg y de 116 a 439 µg, para 50 mg y 75 mg de LA, respectivamente. Mientras que, una concentración de 7.86 mg de CLA/g de célula bacteriana fue obtenida a partir de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55739 (Pariza y Yang, 1999). En otros estudios se aisló la enzima LI de *Lactobacillus plantarum* ZS2058 y se encontró que la adición de cofactores no tiene efecto sobre la actividad de la enzima LI (Chen et al., 2012).

Por otro lado el aislamiento enzimático presenta desventajas como las reportadas por Irmak et al. (2006), donde la lisis celular es el mayor impedimento para el aislamiento eficiente de LI para células microbianas. En cepas de *Lactobacillus* spp, el uso de surfactantes libero una cantidad significativa de la enzima LI en solución, sin embargo, no se pudo recuperar.

2.3.3. Producción de CLA por Células Lavadas

La producción de CLA por células lavadas presentan variabilidad debido a la cepa y condiciones de producción (Gorissen et al., 2015). Macauzent et al. (2009), demostraron que *Lactobacillus acidophilus* La-5 mostró la capacidad de convertir 4.18 mg/L de CLA a partir de una solución de 2% (v/v) de LA. Ogawa et al. (2005) encontraron 15 cepas de *Lactobacillus* spp. productoras de CLA en un rango de 70-3410 mg/L, por este método. *Lactobacillus plantarum* AKU1009, al emplear iones metálicos y metales oxidados como el Na₂MnO₄, alcanzó una productividad relativa de CLA de 427 % (Kishino et al., 2011). *Lactobacillus acidophilus* AKU 1137 mostró una capacidad de bioconversión de 4.9 mg/mL, que representa el 98% de LA a CLA, posterior a cuatro días de reacción (Ogawa et al., 2001). Asimismo, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en la producción de CLA, aumentando de 0.1 a 8.5 µg cuando el LA reaccionó con extracto de la enzima LI (Lin, 2006).

2.3.4. Producción de CLA por Inmovilización de la Enzima Linoleato Isomerasa

El método de inmovilización de la enzima LI es efectivo para la producción de CLA (Lin et al., 2005). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fue inmovilizada en geles de poliacrilamida, obteniendo un porcentaje de bioconversión de 2211 µg de CLA (Lin et al., 2005). Por otro lado, *Lactobacillus reuteri* incrementó la producción a 110 % de CLA a partir de 10 mg de células y a una concentración de 500 mg/L de LA a 55 °C en presencia de 1 mM de Cu²⁺ (Lee et al., 2003b). *Lactobacillus reuteri* ATCC 55739 inmovilizada en sílica gel a partir de 500 mg/L de LA obtuvo valores de 175 mg /L de CLA, a diferencia del método con células lavadas donde sólo se alcanzó una concentración de 32 mg/L de CLA (Lee et al., 2003a; Lee et al 2003b; Gorissen et al., 2015). Factores como pH, temperatura y cantidad de LA pueden estar involucrados en la efectividad de las bacterias y de la enzima para convertir el LA a CLA, como algunos autores lo han sugerido (Lee et al., 2003b; Lin et al., 2005).

Sin embargo, se han reportado que algunos géneros de BAL pueden convertir el LA a CLA, dependiendo del medio de fermentación, tipo de bacteria, concentración de LA y condiciones de temperatura.

2.3.5. Producción de CLA por BAL

Aunque diversos estudios han reportado la capacidad de las BAL para convertir LA a CLA, algunos estudios sugieren que su producción es baja, pero que ésta es dependiente de la cepa y concentración de la bacteria (Bergsson et al., 2002; Hayek y Ibrahim, 2013; Sosa-Castañeda et al., 2015). El mecanismo de producción de CLA por acción de las BAL es en respuesta a un proceso de estrés al que se someten por la acción tóxica del LA, afectando el crecimiento de microorganismos (Jenkins y Courtney, 2003). Los ácidos grasos de cadena larga suelen tener mayor efecto inhibitorio que los ácidos grasos de

cadena corta; mientras que, los ácidos grasos insaturados tienden a mostrar un mayor porcentaje de inhibición contra bacterias gram positivas que contra gram negativas, probablemente por la diferencia en la membrana externa o la pared celular (Bergsson et al., 2002; Desbois et al., 2006). Además, aunque el efecto antimicrobiano de los ácidos grasos ha sido bien estudiado, el mecanismo exacto por el cual los ácidos grasos inhiben el crecimiento bacteriano no ha sido bien definido (Bergsson et al., 2002).

Las condiciones óptimas reportadas para obtener una alta producción de CLA (240.69 μg / mL) son con la combinación de 3 mg/mL de LA, 4 g/L de extracto de levadura y un porcentaje de inóculo del 4% (v/v) (Khosravi et al., 2015); mientras que con la adición de 10 mg/mL de glucosa, 30 mg/mL de leche en polvo de oveja, 0.90 mg/mL de LA y una relación 1:2 de cepas de *Streptococcus:Lactobacillus*, se reportó una concentración de CLA de 42.86% (Kuhl et al., 2016). Por lo anterior, la concentración de LA, tiempo de fermentación y porcentaje del inóculo, son los factores a considerar.

2.4. Mecanismos de Producción de CLA por BAL

La actividad de la enzima LI representa una forma de desintoxicación, ya que LA y ácido linolénico (LNA) inhiben el crecimiento de muchos microorganismos (Coakley et al., 2003). La razón por la que los ácidos grasos como LA y LNA son tóxicos puede ser debida a la presencia de dobles enlaces, que alteran la forma de la molécula. La incorporación de estos ácidos grasos insaturados en la membrana celular puede interrumpir la estructura de la bicapa lipídica. Otra posibilidad, es que la difusión de ácidos grasos a través de la membrana provoque dificultades quimiosmóticas, perturbe el potencial de membrana o reduzca su permeabilidad (Maia et al., 2010). Se ha sugerido que la conversión de LA libre en CLA podría funcionar como un mecanismo de desintoxicación. Estos factores pueden ser posibles explicaciones para un cierto grado de tolerancia de LA por la cepa de *Lactobacillus reuteri* que ha sido ampliamente reportada como la principal cepa productora de CLA (Hernández-Mendoza et al., 2009).

La reacción de óxido-reducción es la responsable del cambio de la configuración del LA a CLA. La enzima LI es considerada una flavoproteína relacionada con una reacción redox en la que la abstracción temporal de electrones tiene lugar para permitir la rotación de las moléculas (Isaacson et al., 2002). El LA es un donador de electrones que se reduce y la enzima un aceptor de electrones que se oxida, como se observa en la Figura 3.

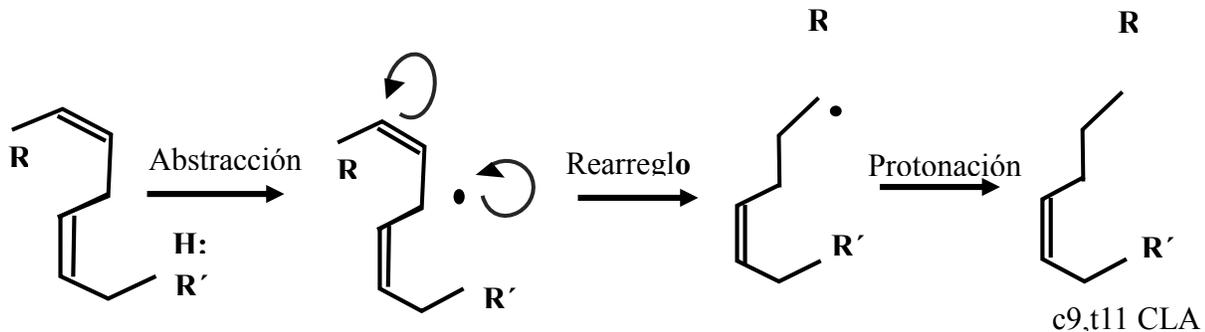


Figura 3. Reacción de óxido reducción para la producción de CLA.

La LI es una enzima que cataliza la producción de CLA y ha sido encontrada en dos estructuras celulares: en citoplasma y anclada a la membrana celular (Macauzent et al., 2010) como se observa en la Figura 4. La LI en citoplasma, producida por *Propionibacterium acnes*, produce específicamente el isómero t10, c12. La LI asociada a la membrana presente en BAL es más difícil de estudiar debido a la escasa estabilidad de la enzima cuando se recupera en forma soluble por la acción de saponificantes, pero en términos generales, estas bacterias producen el isómero c9, t11 como producto principal (Irmak et al., 2006). La localización de la enzima en la célula (Figura 4) va a determinar el tipo de isómero mayoritario que se producirá (Farmani et al., 2010).

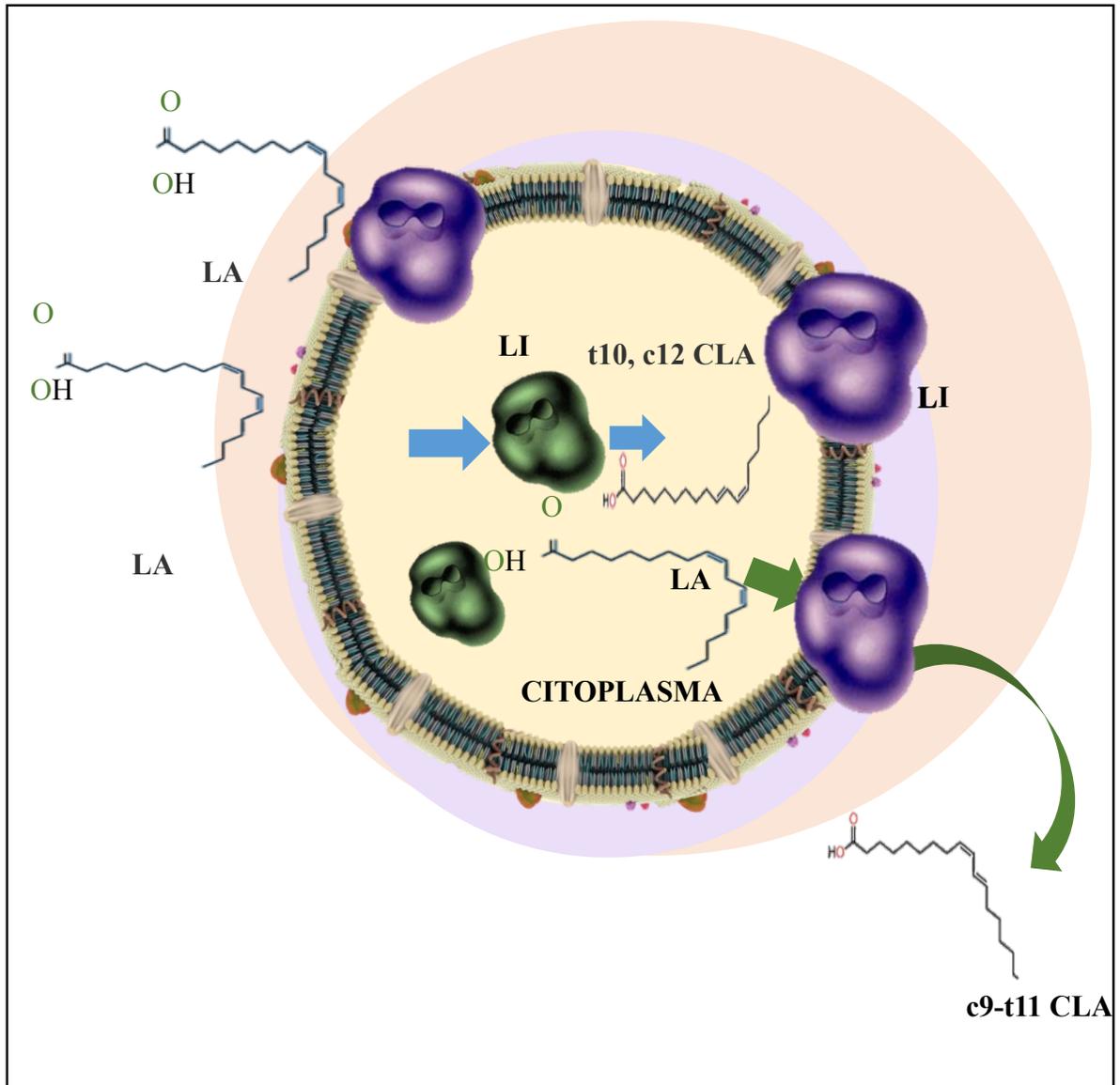


Figura 4. Mecanismo de producción de los isómeros de CLA por acción de las BAL.

Las enzimas LIs se encuentran localizadas en el citoplasma o en la membrana, de tal forma que puedan cubrir sus necesidades energéticas. Las enzimas LI de *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermani*, *Lactobacillus acidophilus*, y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* son solubles. Las LIs de *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *B. fibrisolvens* y *C. sporogenes* son enzimas que se encuentran ancladas a la membrana. En *Propionibacterium acnes*, que ha sido ampliamente utilizada, se ha identificado que se encuentra en el citoplasma y produce el isómero t10, c12, con la ayuda del cofactor

[FAD/NAD (P)] para la conversión de LA a CLA por la LI (Farmani et al., 2010). Lo que diferencia a una enzima LI anclada a la membrana es que ésta no necesita de cofactores para su funcionamiento. En *Butyrivibrio fibrisolvens* se ha encontrado que la enzima está anclada en la membrana, y que la presencia de cofactores, ATP, ADP, AMP, Mg²⁺, NAD⁺, y CoA, no incrementa la actividad de la enzima (Keper et al., 1971). Las cepas *L. plantarum* y *L. reuteri* tienen la enzima LI anclada a la membrana, y no requieren de cofactores (Farmani et al., 2010).

La razón por la que una enzima produce un determinado tipo de isómero se debe al sitio activo de la enzima. Esto se debe a que las geometrías de los sitios activos en las 9,11-isomerasas y en 10,12-isomerasas son diferentes (Liavonchanka y Feussner, 2008). En la Tabla 1 se muestran cepas cuyas enzimas se encuentran unidas a la membrana y en el citoplasma.

El isómero c9, t11 es el más abundante en la naturaleza, y es el más producido por efecto de las BAL (Kuhl et al., 2016). *Lactobacillus reuteri* es identificada como una cepa con alta producción de CLA y su característica es que tienen la enzima LI anclada a la membrana (Macouzet et al., 2010). Por lo que *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Clostridium sporogenes*, son cepas capaces de convertir LA a CLA (Tabla 1).

Tabla 1. Localización de LI en BAL y producción de isómeros de CLA.

Fuente de LI	Localización	Producto principal
<i>Propionibacterium acnes</i>	Citoplasma	t10, c12
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Membrana	t10,c12
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Membrana	t 9,t11
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Membrana	c9,t11
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Membrana	c9,t11
<i>Clostridium sporogenes</i>	Membrana	c9, t11

Fuente: Farmani et al., 2010

Entre las causas por las que las BAL producen CLA se conocen dos posibles; por la presencia de un ácido graso y por la disminución en la temperatura. La producción de ácidos grasos insaturados es un aspecto importante en la homeostasis de la membrana en las bacterias; éstas modifican la composición de su membrana, una disminución de la temperatura aumenta la rigidez de la membrana y muchas bacterias responden aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados incorporados en los fosfolípidos (Zhang y Rock, 2008). Cuando la fluidez de la membrana aumenta debido al aumento de la temperatura en el ambiente, la proporción de ácidos grasos insaturados en la membrana disminuye (Hernández-Mendoza et al., 2009). Las cepas que son resistentes al LA tienen la capacidad de incorporarlo a su membrana (Sosa-Castañeda et al., 2015).

2.5. Factores que Determinan la Producción de CLA por BAL

La producción de CLA por BAL depende de factores como la fase de crecimiento, concentración de sustrato y LA, pH, tiempo de fermentación (Gorissen et al., 2015). En diversos estudios, cepas de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus thermophilus* 99 CRL1399 mostraron la mayor producción de CLA en la fase estacionaria (Macouzet et al., 2009; Nieuwenhove et al., 2007). La naturaleza del sustrato influye en la producción de CLA y se ha demostrado que matrices alimentarias favorecen su producción (Kim y Liu, 2002; Gorissen 2015). Diferentes oleaginosas (girasol, sésamo, soya, castor, entre otros) han sido empleadas debido a que en su composición se encuentra el LA. El aceite de soya hidrolizado es un sustrato más apto para el crecimiento de BAL que el aceite de soya convencional (Xu et al., 2004). *Bifidobacterium lactis* mostró mayor producción de CLA (618.13 µg/mL) cuando se inoculó en un medio adicionado con aceite de bacalao, lo cual puede deberse a que 2.2% de su composición es LA, contrario a lo sucedido cuando se inoculó la misma cepa en un medio adicionado con aceite de girasol o aceite de linaza (Al-Saman et al., 2016). Las mezclas de ácidos grasos han demostrado tener un efecto favorable en la bioconversión a CLA. Ando et al. (2003), reportaron que *Lactobacillus plantarum* JCM 1551 produjo 1140 µg/mL de CLA cuando se inoculó en un medio

enriquecido con α -linolénico y ácido linoleico. *Lactococcus Lactis* I-01 mostró una producción alta de CLA cuando fue inoculada en leche entera adicionada de aceite de girasol debido a que cuenta con LA en su composición (Kim y Liu, 2002).

De acuerdo a recientes estudios, la concentración de LA no es directamente proporcional a la producción de CLA. Así, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL2 creció en MRS a diferentes concentraciones de LA (0, 200, 400, 500, 800 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) y el porcentaje más alto de conversión (13%) de LA fue de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Terán et al., 2015). *Lactobacillus reuteri* creció en MRS suplementado con LA a concentraciones de (5, 10, 20 y 30 mg/mL) y la producción más alta de CLA (0.108 mg/mL) fue de 20 mg/mL de LA (Hernández-Mendoza et al., 2009). Sosa-Castañeda et al. (2014) demostraron que en 20 mg/mL de LA, varió la producción de CLA de 13.44 a 50.9 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, concentraciones altas disminuyen la producción de CLA. Lin et al. (1999) inocularon *Lactobacillus acidophilus* con concentraciones diferentes de LA (0, 1000 y 5000 mg/mL) y reportaron que 1000 mg/mL de LA adicionado a leche descremada a un tiempo de incubación de 24 h generaron 105.5 mg/mL . Esto puede deberse a que la estructura de la enzima se ve afectada por la reducción del área de contacto entre la enzima LI y el sustrato (Khaskheli et al., 2013).

El pH afecta la bioconversión de LA a CLA al modificar la estructura de la enzima y con ello la actividad de la enzima responsable de la isomerización. Khaskheli et al. (2013), reportan que *Lactobacillus plantarum* a pH de 5.5 presenta una bioconversión máxima de CLA de 166 $\mu\text{g/mL}$. Park et al. (2009), encontraron que la mayor producción del isómero c9, t11 CLA fue a pH 5-5.5 por *Bifidobacterium breve* LMC 520. Hernández-Mendoza et al. (2009) reportan valores de pH de 5.5 en la producción de CLA con *Lactobacillus reuteri*. Estos estudios podrían indicar que un pH de 5.5 favorece la actividad de la enzima LI. Sin embargo, Kim y Liu (2002), reportan los valores más altos de CLA para una cepa de *Lactococcus Lactis* I-01 a un pH de 7, resultando con una concentración de CLA de 11 mg/g de grasa. Lo que sugiere que la enzima LI tiene un rango de pH amplio.

Los tiempos de fermentación son variables y modifican la proporción de isómeros de CLA. Para *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* cuando se adicionó 0.5 mg/mL a caldo MRS, y tiempos de fermentación de 24 h y se encontró producción de CLA (0.25-25.62 µg/ mL) y de los isómeros c9, t11 y t10, c12 (Terán et al., 2015). Dahiya y Puniya (2017), inocularon *Lactobacillus spp.* en 0.5 mg/mL de LA a un tiempo de fermentación de 72 h y se obtuvo producción de CLA (5.42-43.73 mg/mL). Khaskheli et al. (2013), inocularon *Lactobacillus plantarum* en LA donde se indicó que a 120 h se obtiene su mayor concentración de CLA (220 µg/mL). Con *Lactococcus Lactis* I-01 se reportó un tiempo óptimo de fermentación de 12 h, produciéndose CLA (8.3 mg/L) cuando se adicionó 0.2 g/L de aceite de soya a la mezcla (fosfato de potasio, leche en polvo (6%) y glucosa (0.3%)) (Kim y Liu, 2002). La cepa *Lactobacillus sakei* LMG 13558 cuando se inoculo en LA mostro variación en la concentración de isómeros en las primeras 14 h el isómero c9, t11 tiene una concentración máxima de 0.03 mg/mL y a 48 h de fermentación el isómero t9, t11 alcanzó su mayor concentración 0.02 mg/mL (Gorissen et al., 2011).

2.6. Grupos Específicos de BAL Productoras de CLA

Las BAL productoras de CLA han sido aisladas principalmente de productos lácteos, carnes, vegetales y del tracto gastrointestinal humano y de animales (Andrade et al., 2012). Algunas cepas del género *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* han demostrado capacidad para producir CLA (Philippaerts et al., 2011; Andrade et al., 2012; Kuhl y De Dea 2016). El género *Lactobacillus spp.* ha sido el más ampliamente estudiado, por lo que se han reportado cepas altamente productivas con la presencia de la enzima anclada a la membrana (Macauzet et al., 2010). Dahiya y Puniya (2017), encontraron 19 cepas de *Lactobacillus spp.* que presentaban una capacidad de producción de 9.8-46.18 µg/mL de CLA; dichas cepas fueron aisladas de heces fecales de infantes. Gorissen et al. (2011) encontraron tres cepas de *Lactobacillus spp.* con capacidad de bioconvertir LA a CLA en un rango de 1.6-4.2 % de CLA, siendo una cepa comercial la más productiva. Los estudios en los que se relacionan el género de BAL con la

producción de CLA son pocos; sin embargo, *Lactobacillus reuteri* se ha identificado como la cepa más productiva con respecto a *Bifidobacterium* y *Leuconostoc* (Macauzet et al., 2010).

Cepas de *Lactobacillus* spp., al ser inoculadas en leche, incrementan la producción de CLA, debido a que las proteínas de la leche pueden neutralizar el efecto tóxico del LA (Nieuwenhove et al., 2012). Cepas de *Lactobacillus* spp. mostraron una producción que osciló entre (40.94-51.68 µg/mL) de CLA cuando se inoculó en leche sin grasa después de ser adicionada con 1 mg/mL de leche y se dejó fermentar por 24 h (Rodríguez-Alcalá y Fontecha, 2011). Cuatro cepas de *Lactobacillus* mostraron una producción de 54.31-116.53 µg/mL de CLA en leche suplementada con 0.2% de ácido linoleico después de 24 h (Alonso et al., 2003).

Respecto a cepas de *Lactococcus* spp., algunas han sido identificadas por su capacidad de producir CLA. Terán et al. (2015), encontraron dos cepas de *Lactococcus* spp. con una capacidad de producción de 0.5-0.98% de CLA. No obstante, en el estudio de Pandit et al. (2012) se aislaron 155 cepas de leche cruda y queso Cheddar; de estas, doce mostraron capacidad de producir CLA, entre las cuales, *Lactococcus lactis* 4a y 4b, aisladas de queso, resultaron las más productivas, con una concentración de 1.12 y 0.87 g/100 g de ácidos grasos, respectivamente, encontrándose los isómeros c9, t11 y t10, c12, cuando se inocularon en leche con 2% de grasa. *Lactococcus lactis* LMG5 19870 produjo una mayor cantidad de CLA en leche descremada cuando se adicionó 1 mg/mL de LA, del cual, el 45.51 µg/mL corresponde a CLA (Rodríguez-Alcalá et al., 2011). En leche se ha encontrado *Lactococcus Lactis* 1-01, con una alta capacidad para producir CLA cuando se adicionó 0.1 g/L de aceite de girasol a leche entera (Kim y Liu, 2002). En la Tabla 2 se observan las condiciones en las que crecieron las BAL para la bioconversión de CLA.

En lo correspondiente al género *Streptococcus* spp., ocho cepas que se cultivaron en caldo MRS que contenía LA (200 µg/mL); *Streptococcus thermophilus* CRL728 resultó con una conversión del 33.9% de LA a CLA. La producción de CLA, por esta misma cepa, en leche de búfala adicionada con LA (200 µg/mL) fue de 52.5% de conversión

(Nieuwenhove et al., 2007). *Streptococcus thermophilus* St360 produjo 1.02 mg/mL que representa un incremento del 54% en leche de oveja (Kuhl et al., 2016). Se han estudiado asociaciones entre diferentes cepas de *Streptococcus* spp. con *Lactobacillus* spp. adicionadas en yogur, obteniéndose valores de CLA de 0.9 mg CLA/g de lípido con 24 h de fermentación, y mayor cantidad del isómero c9, t11 (0.71 mg CLA/g de lípido) (Xu et al, 2004). Se ha sugerido que las enzimas LI se unen a la superficie de la célula mediante un anclaje transmembranal amino-terminal, característica que normalmente se presenta por enzimas de *Lactobacillus reuteri* (Bath et al., 2005). Este hallazgo podría sugerir que la enzima debe estar anclada a la membrana para la alta producción de CLA.

Por otro lado, se ha intentado relacionar la actividad de la enzima LI con producción de CLA; por ejemplo, en un estudio realizado por Rene et al. (2017b) evaluaron 85 cepas de BAL aisladas de quesos artesanales para determinar su capacidad para sintetizar CLA. Cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum* y dos de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* tuvieron la capacidad de sintetizar dicho compuesto. La cantidad más alta de CLA se sintetizó en MRS después de 48 h de incubación, obteniendo un máximo de 19.26 mg/mL. Por otra parte, identificaron la presencia del gen que codifica a LI en las cepas productoras de CLA. Sin embargo, este gen también se detectó en algunas cepas que no produjeron CLA, indicando que la presencia de un gen no implica la producción del compuesto. El gen que codifica la enzima linoleato isomerasa puede estar presente en las cepas, pero su expresión puede verse afectada por diversos factores, como el pH o la temperatura, y estos efectos son a su vez dependientes de la cepa (Gorissen et al., 2011; Rene et al., 2017a).

Tabla 2. Diferentes cepas de BAL productoras de CLA.

Cepa	Medio	LA (mg/mL)	Tiempo de incubación (h)	c9, t11 (µg/mL)	t10, c12 (µg/mL)	t9, t11 (µg/mL)	Conversión LA-CLA (%)	Referencia
<i>Lactobacillus plantarum</i> LS104	MRS	0.5	48-72	10.24			10.24	Dahiya y Puniya, 2017
<i>Lactobacillus plantarum</i> LS147	MRS	0.5	48-72	12.95			12.95	Dahiya y Puniya, 2017
<i>Lactobacillus</i> spp.	MRS	50	72				1.6-4.6	Gorissen et al., 2011
<i>Lactobacillus reuteri</i>	MRS	20	30				0.108 mg/L	Hernández-Mendoza et LA., 2008
<i>Lactobacillus fermentum</i> EFL3	MRS	100	24	0.32		0.18	0.10	Terán et al., 2015
<i>Lactobacillus sakei</i> CRL1470	MRS	100	24	11.72	5.22	7.5	4.88	Terán et al., 2015
<i>Lactococcus lactis</i> – <i>diacetylactis</i> CRL967	MRS	100	24		2.52		0.5	Terán et al., 2015
<i>Lactococcus lactis</i> – <i>diacetylactis</i> CRL1061	MRS	100	24		4.88		0.98	Terán et al., 2015
<i>Bifidobacterium longum</i>	MRS	100	24	25.62		45.05	14.14	Terán et al., 2015
<i>Streptococcus thermophilus</i> CRL728	MRS	200	24				33.9	Nieuwenhove et al., 2007
<i>Lactococcus lactis</i> LMGS 19870	Leche sin grasa M17+	1	48				45.51 µg/mL de leche sin grasa	Rodriguez-Alcala et al., 2011
<i>Lactococcus lactis</i> 4b	0.5% de Lactosa	Leche con 2% de grasa		0.63	0.27		1.12 g/100 g de grasa	Pandit et al., 2012
<i>Enterococcus faecium</i> AKU 1021	MRS	0.06 (%)	24	0.04		0.06	0.1 mg/mL	Kishino et al., 2002
<i>Enterococcus faecium</i> M74	MRS	HS (1%)	24	0.63 mg CLA/g grasa				Xu et al., 2004

2.6.1. *Enterococcus* spp. como Productor de CLA

Los *Enterococcus* spp. están ampliamente distribuidos en la naturaleza, también se encuentran en productos lácteos (Lahtinen et al., 2012). Su amplia distribución se explica por su resistencia a factores como: acidez, alta concentración de sal, condiciones de secado y altas temperaturas, así como tolerancia a desinfectantes químicos. Se han identificado en algunas cepas la formación de películas, que les ayudan a sobrevivir a condiciones adversas (Goh et al., 2017). También son considerados como indicadores de calidad en alimentos, y en productos lácteos contribuyen al desarrollo de propiedades organolépticas, principalmente en quesos (Giraffa, 2002)

Ogawa et al. (2005) encontraron una cepa de *Enterococcus faecium* AKU 1021 que tuvo una conversión de 100 mg/L de CLA cuando se adicionó 0.06% de LA. *Enterococcus faecium* M74, cuando se inoculó en medio enriquecido con el 1% de aceite de soya hidrolizado, obtuvo una producción de 0.63 mg de CLA/g de grasa (Xu et al., 2004). Kishino et al. (2002) determinaron la producción de CLA por *Enterococcus faecium* AKU 1021 cuando se inoculó en medio adicionado con 0.06 % de ácido linoleico produciéndose 0.1 mg/mL. Hasta el momento, hay pocas publicaciones que reportan la producción de CLA por este género y considerando la gran diversidad de especies del género *Enterococcus*, no es arriesgado aseverar que existe una gran oportunidad de realizar más estudios que permitan poner en evidencia los beneficios de este grupo de bacterias para producir compuestos bioactivos como el CLA y, en consecuencia exponerlas como candidatas para conformar cultivos con posibles usos tecnológicos en el diseño de alimentos funcionales, o para producción biotecnológica de compuestos bioactivos

3. HIPÓTESIS

Cepas específicas de bacterias ácido lácticas, aisladas de derivados lácteos, realizan la bioconversión de ácido linoleico a ácido linoleico conjugado.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad de cepas específicas de bacterias ácido lácticas para biosintetizar ácido linoléico conjugado.

4.2. Objetivos Específicos

- 1) Seleccionar bacterias ácido lácticas en base a la capacidad de biosintetizar ácido linoleico conjugado total por espectrofotometría.
- 2) Identificar y cuantificar, mediante cromatografía de gases, los tipos de isómeros de ácido linoleico conjugado biosintetizado por las cepas de bacterias ácido lácticas de estudio.

5. METODOLOGÍA

5.1. Reactivación y Propagación de Cepas

Cinco cepas de *Enterococcus* representadas como S18, S24, S25, S29, y L45, así como, dos cepas de *Lactobacillus fermentum* J10 y J20 fueron obtenidas del Cepario del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. de Hermosillo, Sonora. Como testigo positivo se utilizó la cepa de *Lactobacillus reuteri* ATTC 55739 (L.r), la cual ha sido reportada como productora de CLA (Roman-Nunez et al., 2007; Hernández et al.,2009; Sosa-Castañeda et al.,2015).

Las cepas, almacenadas a -20 °C, se reactivaron en caldo M17 al 1% (v/v) (DIFCO, Sparks, MD) enriquecido con lactosa estéril (10 % p/v) para *Enterococcus* y MRS (Man Rogosa y Sharpe) para *Lactobacillus*, realizándose tres siembras consecutivas de 24, 18 y 16 h para *Enterococcus*, y para *Lactobacillus* de 24, 20 y 18 h, e incubados a 37 °C. Posterior al último tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron (4000 *xg*, 15 min, 4 °C), se retiró el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 3 mL de una solución de trizma-base (0.05 mol/L, pH 5.5) hasta obtener una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.80 que equivale a una concentración de 1x10⁸ UFC/mL.

5.2. Preparación de la Solución Stock de LA

La solución stock de LA se preparó al 2% (p/p), adicionado con 8 % (p/p) de fosfatidilcolina, utilizando este último como emulsificante, de acuerdo a la metodología reportada por Hernández-Mendoza et al. (2009) y Sosa-Castañeda et al. (2015). La

solución se mantuvo en agitación constante por 2 h, posteriormente, se realizó un barrido con nitrógeno y se almacenó bajo condiciones de refrigeración y en oscuridad.

5.3. Preparación del Medio de Cultivo Enriquecido con LA

Los medios de cultivo M17 y MRS fueron enriquecidos con LA a una concentración final de 2 mg/mL. Para generar la emulsión, la mezcla del medio de cultivo y LA se mantuvo en agitación durante 15 min (5 min velocidad media, 10 min velocidad alta) utilizando un homogeneizador (Ultraturrax, PRO Scientific, USA). Una vez obtenida la emulsión, ésta se esterilizó a 121 °C por 15 min (Sosa-Castañeda et al., 2015). Consecutivamente, de las soluciones bacterianas ajustadas (0.8 DO), se tomó una alícuota del 1% (v/v) y se inocularon en el medio de cultivo con LA, los cuales se dejaron incubar por 48 h a 37 °C.

5.4. Cuantificación de CLA por el Método Espectrofotométrico

Para determinar la concentración de CLA, de los cultivos de 48 h, se tomó 1 mL de muestra, que fue centrifugado (4000 \times g, 10 min, 4 °C); el sobrenadante se mezcló con 2 mL de isopropanol (~95%, grado A.C.S espectrofotométrico, Sigma-Aldrich). Posteriormente, se adicionó 1.5 mL de hexano (~85%, Backer, grado HPLC). La mezcla se centrifugó a 3000 \times g por 20 min a 4 °C. Finalmente, se tomaron 700 μ L de la fase lipídica y se colocaron en una celda de cuarzo y se midió la absorbancia a 233 nm (SpectraMaxM3 Molecular Devices, USA) (Barrett et al., 2007; Terán et al., 2015). Para determinar la concentración de CLA total de cada una de las cepas, se generó una curva estándar con concentraciones diferentes (6.67, 10, 16.67, 20, y 25 μ g/mL), utilizando hexano como blanco. El CLA se mezcló con caldo M17 y se mantuvo en agitación durante 15 min.

5.5. Cuantificación e Identificación de CLA por Cromatografía de Gases

La concentración de CLA se determinó siguiendo la metodología reportada por Park y Goins (1994). Alícuotas de 1 mL de muestra fueron hidrolizadas con 5 mL de metóxido de sodio (0.5 N) y 0.5 mL de cloruro de metileno, y los tubos fueron incubados en baño maría a 90 °C por 10 min. Posteriormente, los tubos fueron removidos y se dejaron enfriar, se adicionaron 5 mL de trifluoruro de boro en metanol (14 %) incubándose nuevamente a 90 °C por 10 min. La extracción de los ácidos grasos se llevó a cabo por la adición de 5 mL de agua y 1 mL de hexano y se mezclaron durante 1 min, seguido de centrifugación a 3000 rpm. La capa superior de cada muestra fue utilizada para la cuantificación de CLA.

Para la cuantificación de CLA se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5890 (Hewlett Packard, PLA, CA, USA) equipado con un detector de ionización de flama (FID) y columna capilar SP 2560 (100 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA), con 1 µL de los metil ésteres disueltos en hexano, que fue inyectado en modo Split. Las condiciones que se establecieron para la cuantificación de CLA fueron a una temperatura inicial en el horno de 140 °C por 5 min, seguido por un incremento de temperatura hasta 175 °C con incrementos de 10 °C/min, manteniéndola por 25 min. Posteriormente, se incrementó hasta una temperatura final de 190 °C con aumentos de 2 °C/min, manteniéndola nuevamente por 30 min. Como gas acarreador se utilizó helio, a una velocidad de 1.5 mL/min; siendo la temperatura del inyector de 250 °C y detector de 280 °C. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Como estándar interno se utilizó ácido heptadecanoico (C17:0), adicionado a la muestra a una concentración final de 70 µg/mL. El CLA de las muestras fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de los estándares 9(Z),11(E)-metil octadecadionato y 10(E),12(Z)- metil octadecadionato (99% de pureza Sigma-Aldrich). Además, se realizó una curva estándar con las siguientes concentraciones: 6.67, 10, 16.67, 23.33, 35 µg/mL.

Adicionalmente, se calculó el porcentaje de conversión de LA a CLA utilizando la siguiente fórmula (Gorissen et al., 2011; Terán et al., 2015; Villar-Tajadura et al., 2014).

$$\text{CLA (\%)} = \sum \text{CLA} / (\text{LA} + \sum \text{CLA}) \times 100$$

5.6. Diseño Estadístico

El diseño estadístico empleado fue un Diseño Completo al Azar con un análisis de varianza de una vía (ANOVA), la comparación de medias se llevó a cabo por la prueba de Tukey-Kramer, con un nivel de significancia de 95%. Los datos fueron analizados en el programa estadístico NCSS 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cuantificación de CLA por el Método Espectrofotométrico

La concentración de CLA total de cada una de las muestras se calculó de acuerdo a la ecuación obtenida a partir de la curva estándar (Figura 5), donde se observa que hay una relación lineal entre las concentraciones de CLA y la absorbancia, y la variabilidad de los datos se explica en un 98%.

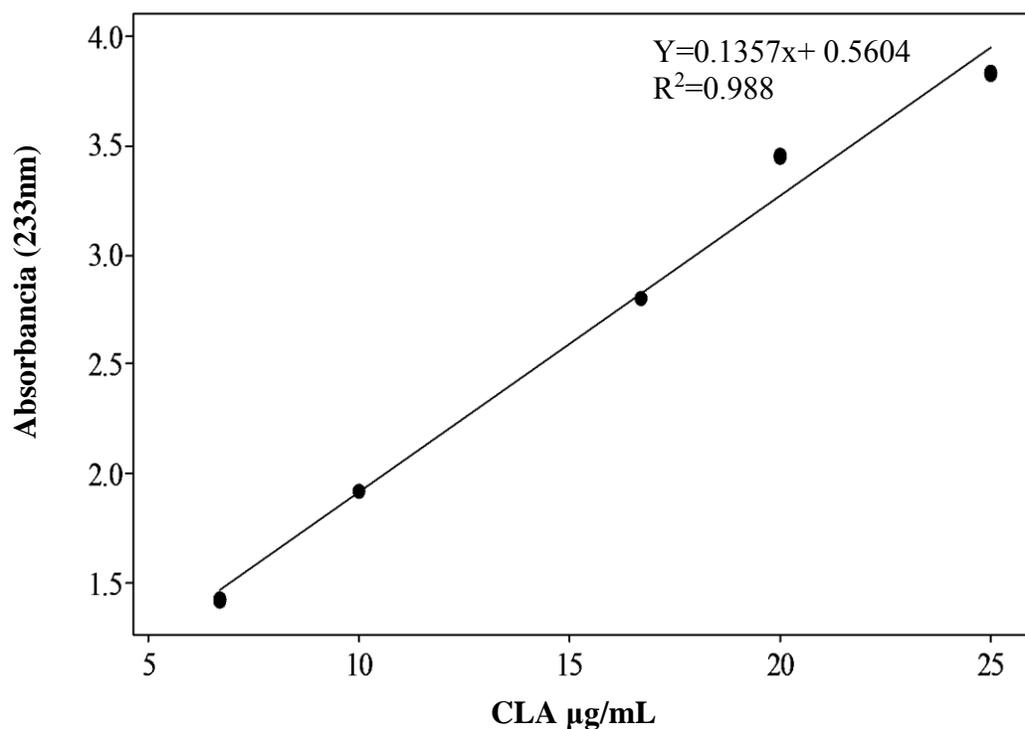


Figura 5. Curva estándar de CLA por método espectrofotométrico.

La concentración de CLA total de las cepas de *Enterococcus* spp., se encontró en un rango de 7.89-20.88 µg/mL (Figura 6), siendo la cepa L45 la que mostró la mayor concentración de CLA (20.88 µg/mL), significativamente mayor que la cepa testigo *Lactobacillus*

reuteri, y la cepa S18 fue que presentó la menor ($p<0.05$) concentración de CLA (7.89 $\mu\text{g/mL}$). Por otro lado, la cepa más productiva para *Lactobacillus spp* fue la cepa J20 con una concentración de 20.86 $\mu\text{g/mL}$ de CLA ($p<0.05$) con una concentración mayor ($p<0.05$) que la cepa testigo. Los resultados de concentración obtenidos en este estudio fueron menores a lo reportado por Dahiya y Puniya (2017) quienes encontraron concentraciones de 19.5-71.5 $\mu\text{g/mL}$.

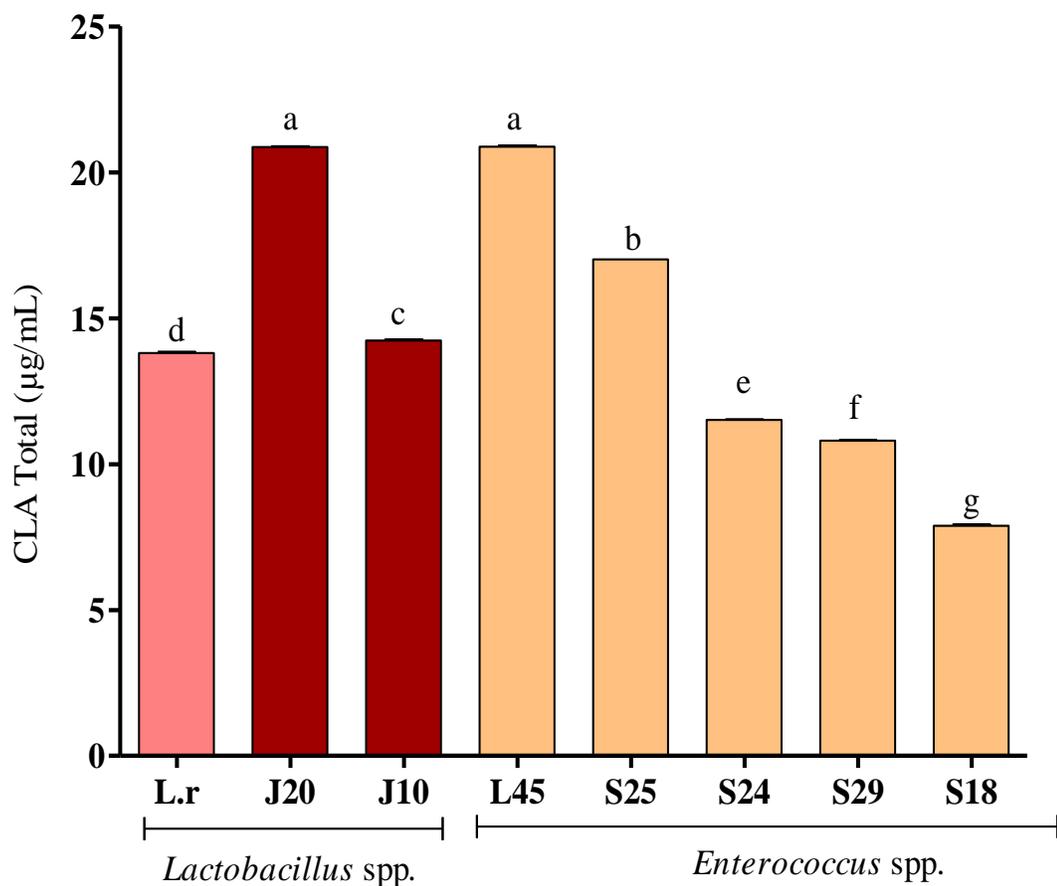


Figura 6. Concentración de CLA por cepas de *Enterococcus spp* y *Lactobacillus spp.* determinado por espectrofotometría. Literales diferentes muestran diferencia estadística ($p<0.05$) entre las cepas de estudio. Los datos representan la media \pm desviación estándar de $n=3$.

En un estudio realizado por Ribeiro et al. (2018) reportaron que cepas de *Enterococcus faecalis* que se cultivaron en caldo MRS y se incubaron durante 48 h, mostraron una concentración de 2.16-2.44 µg/mL de CLA, con porcentajes de conversión de 0.43-0.93%, a partir de una concentración de 0.5 mg/mL de LA. Sin embargo, este método de cuantificación no permite diferenciar entre los isómeros de las muestras.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos pueden atribuirse a la presencia de la enzima LI, que ha sido identificada principalmente en cepas del género *Lactobacillus* spp. y la efectividad de bioconversión de LA a CLA es dependiente de la capacidad de la bacteria a sintetizar la enzima (Farmani et al., 2010).

Los factores que intervienen en la producción de CLA son: concentración de LA, tiempo de fermentación, tipo de cepa. Por ejemplo, la concentración de LA empleada por Kumar y Kumar (2017) fue de 0.5 mg de LA/mL adicionada en caldo MRS y con tiempos de fermentación de 48 h, mostró una mayor capacidad de conversión a CLA, mientras que, en este estudio, una concentración de 2 mg/mL presentó menor capacidad de conversión, contrario a lo que ha sido reportado con anterioridad (Hernandez-Mendoza et al., 2009; Sosa-Castañeda et al., 2015). Otros estudios sugieren que una alta concentración de LA puede afectar la estructura de la enzima, reduciendo el área de contacto entre la enzima y el sustrato (Khaskheli et al., 2013); además, el método de cuantificación no diferencia entre el tipo de isómero, debido a que la determinación se basa en la medición del doble enlace en el ácido graso (Rodríguez-Alcalá et al., 2011). Uno de los factores, además de tipo de cepa, tiempo de incubación y cantidad de LA, es el método de extracción. Al respecto, un estudio demostró que los porcentajes se ven influenciados por el tipo de solvente utilizado en el proceso de extracción. Por ejemplo, la extracción con cloroformo/metanol y hexano/2-propanol ha mostrado porcentajes de conversión de 88.3 y 85.6 %, respectivamente (Jung et al., 2006).

6.2. Cuantificación de CLA por Cromatografía de Gases

En la Figura 7 y 8 se muestran las regresiones lineales de los isómeros c9, t11 y t10, c12. Para el isómero c9, t11 se observa una relación lineal $y=0.0076x-0.0085$ y los datos se explican con el 99.79% de variabilidad. La ecuación determinada para el isómero t10,c12 fue de $y=0.0088x+0.0118$ y un coeficiente de determinación que explica el 99.81% de la variabilidad de los datos.

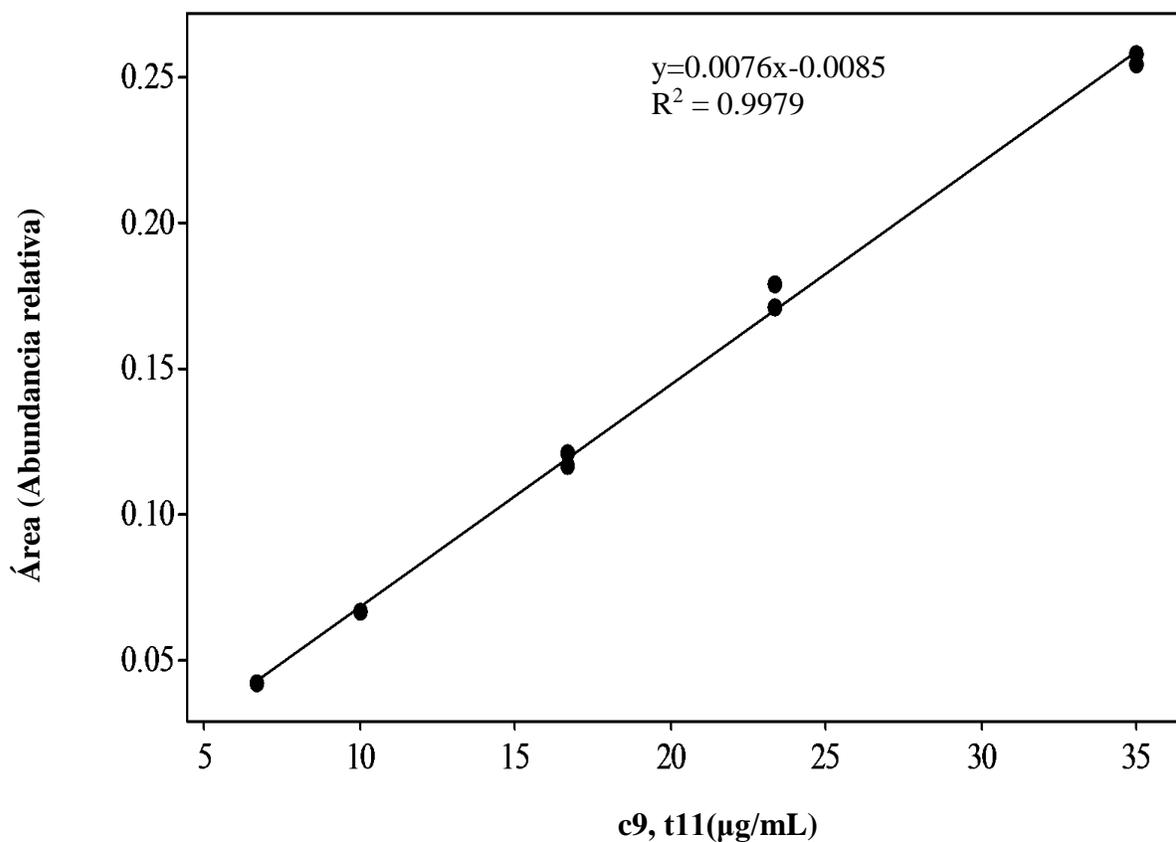


Figura 7. Curva estándar del isómero c9, t11 para la determinación de CLA por cromatografía de gases.

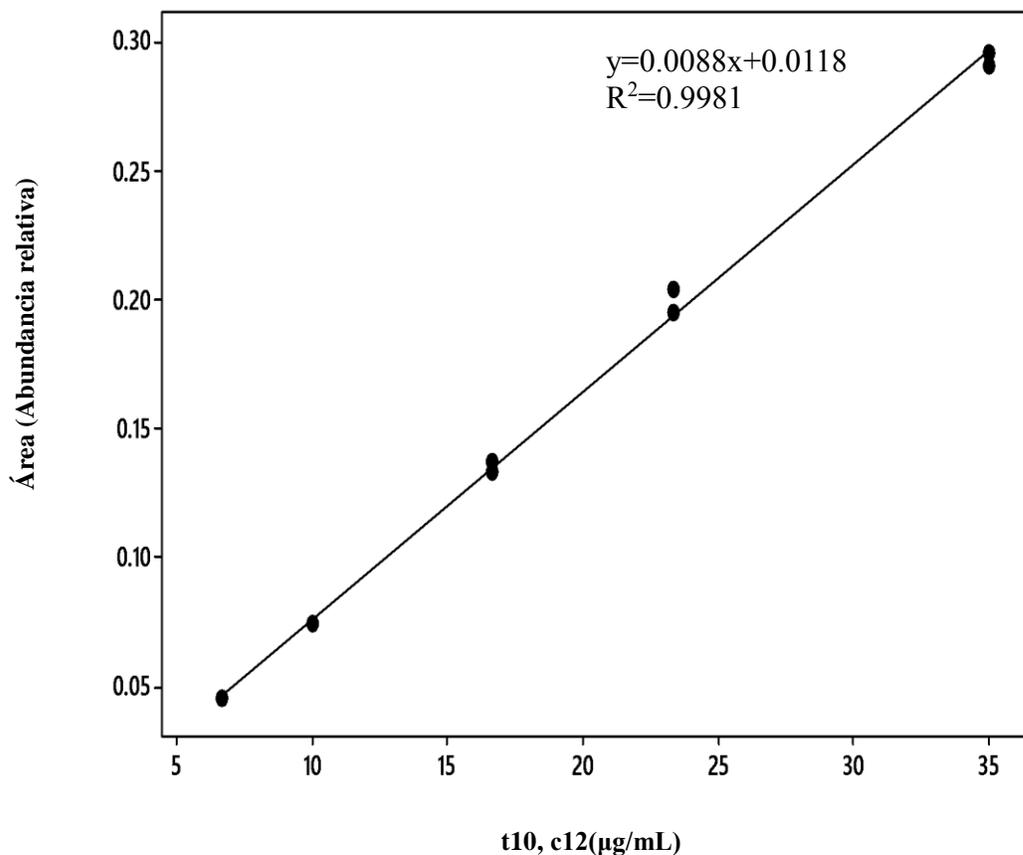


Figura 8. Curva estándar del isómero CLA t10, c12 para la determinación de CLA por cromatografía de gases.

La producción de CLA por *Lactobacillus* spp. fue de 28.5–31.18 µg/mL, siendo la cepa J10 con la concentración más alta con 31.18 µg/mL de CLA ($p<0.05$), pero menor que la cepa testigo, la cual presentó una concentración de 42.12 µg/mL. La producción de CLA por las cepas de *Enterococcus* spp fue de 9.06–34.54 µg/mL, siendo la cepa S18 la que presentó la mayor concentración ($p<0.05$) y L45 la menos productiva. Lo cual difiere de los resultados obtenidos por el método espectrofotométrico, donde la cepa L45 y J20 fueron las de mayor concentración, y S18 y J10 con la menor capacidad de producción (Figura 9). Los valores más bajos obtenidos, en relación a la concentración de CLA por el método espectrofotométrico, podría deberse a que posiblemente no se logró una extracción eficiente del CLA contenido en las muestras, por lo que es necesaria la estandarización de la extracción.

Comparando los resultados obtenidos en nuestro estudio con lo reportado por otros estudios, donde se utilizaron cepas de *Lactobacillus* spp; Dahiya y Puniya (2018), reportaron valores de 9.8-40.02 $\mu\text{g/mL}$ a una concentración de LA de 0.5 mg/mL, siendo estos valores mayores a lo obtenido en el presente estudio.

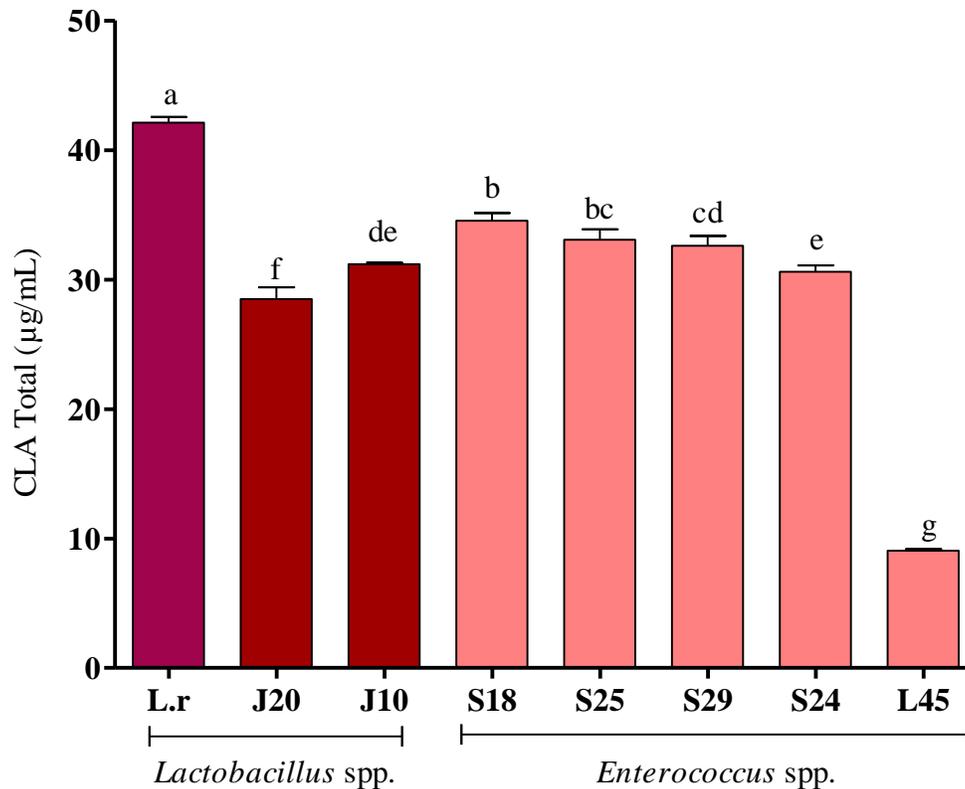


Figura 9. Concentración de CLA por cepas de *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. determinado por cromatografía de gases. Literales diferentes indican diferencia estadística ($p < 0.05$). Los datos representan la media \pm desviación estándar de $n=3$.

Renes et al. (2017b), reportaron que a la misma concentración de LA (0.5 mg/mL) y 48 h de incubación obtuvieron valores de CLA de 8.87-27.1 $\mu\text{g/mL}$. Por el contrario, a una concentración de 20 mg/mL se reportó una concentración de 108 $\mu\text{g/mL}$ a condiciones de 10 °C y 30 h de incubación en caldo MRS (Hernández-Mendoza et al., 2009). Cuando se utilizó como matriz leche adicionada con 0.5 mg/mL de LA, la concentración de CLA fue de 0.25-16.94 $\mu\text{g/mL}$ (Terán et al., 2015), mientras que, a una concentración de 20 mg/mL

las concentraciones reportadas fueron de 0.26-50.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sosa-Castañeda et al., 2015). Con los resultados reportados en los diferentes estudios y los obtenidos en esta investigación, la capacidad de conversión de LA a CLA es dependiente del tipo de cepa, concentración de LA, temperatura y tiempo de incubación, debido a que, los estudios reportan que a una mayor concentración de LA, aún en leche, la capacidad de conversión es similar e incluso mayor cuando la bacteria se incubaba en medio de cultivo a una misma concentración de LA (Hernández-Mendoza et al., 2009).

Para el género *Enterococcus* spp., pocos estudios han sido reportados. Por ejemplo, en un estudio realizado por Kishino et al. (2002), quienes utilizaron la técnica de lavado de células, la cepa *Enterococcus faecium* AKU 1021 reportó una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLA en caldo MRS adicionado con 0.06% de LA. Sin embargo, cuando la leche es enriquecida con el 1% de aceite de soya hidrolizado y se inoculó con la cepa *Enterococcus faecium* M74 se obtuvo una concentración de 630 μg de CLA/g del compuesto lipídico (Xu et al., 2004).

6.2.1. Determinación de los Isómeros de CLA

Las cepas que presentaron una mayor ($p < 0.05$) concentración del isómero c9, t11 fueron S18 y S25, mientras que, para el isómero t10, c12 fue la cepa S18. Sin embargo, la cepa más ($p < 0.05$) productiva para los dos isómeros fue S18 con concentraciones de 17.33 y 17.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 48 h de incubación, pero menor ($p < 0.05$) con respecto a la cepa testigo. Las cepas de *Lactobacillus* spp. presentaron un valor para c9, t11 de 15.73-17.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y del isómero t10, c12 fue de 12.77-13.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo la cepa de *Lactobacillus fermentum* J10 la más productiva ($p < 0.05$) para ambos isómeros, pero menor ($p < 0.05$) que la cepa testigo (Figura 10).

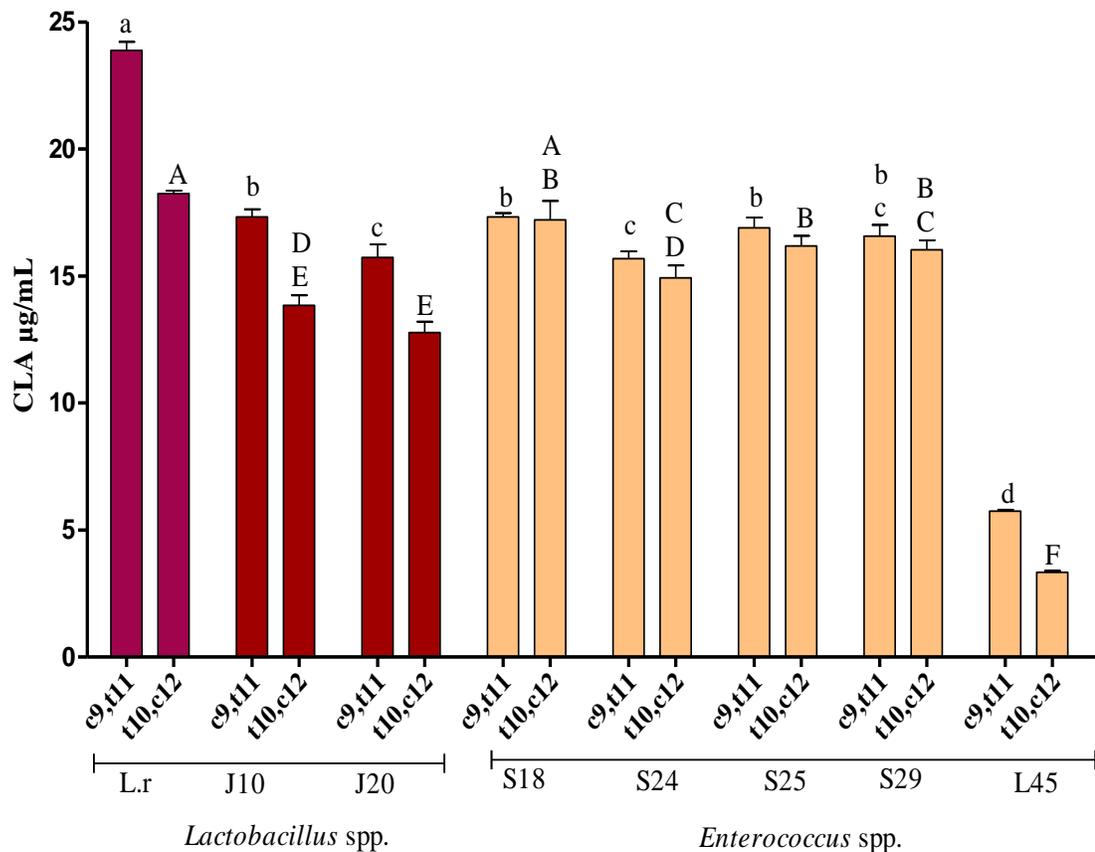


Figura 10. Concentración de isómeros de CLA por cepas de *Enterococcus* spp y cepas de *Lactobacillus fermentum*. Literales minúsculas diferentes representan diferencia estadística ($p < 0.05$) entre cepas para el isómero c9, t11; literales mayúsculas diferentes representan diferencia estadística ($p < 0.05$) entre cepas para el isómero t10, c12. Los datos representan la media \pm desviación estándar de $n=3$.

Las cepas de *Lactobacillus* spp de estudio mostraron una mayor concentración del isómero c9, t11. Sin embargo, las cepas de *Enterococcus* spp biosintetizaron el isómero c9, t11 y t10, c12 en proporciones similares. La cepa L45 produjo en mayor cantidad el isómero c9, t11.

En un estudio realizado por Terán et al. (2015) para cepas de diferentes géneros, encontraron una proporción de 1:1 para la concentración de los dos isómeros c9, t11: t10, c11 con un tiempo de fermentación de 48 h. Mientras que Xu et al. (2004) reportaron que

la concentración de los isómeros incrementó de 24 a 48 h de incubación, con lo cual demostraron que la concentración de CLA es dependiente de la cepa y de la fuente lipídica. Kishino et al. (2002) reportaron una relación de isómeros c9, t11 o t9, c11 y t9, t11 (40:60) $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 72 h de fermentación, para diferentes cepas de *Enterococcus spp.* Mientras que, para *Lactobacillus sakei* LMG 13558 en caldo MRS, a medida que transcurre el tiempo de fermentación, cambia la concentración de los isómeros, teniendo su concentración máxima de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 48 h de incubación. El isómero t9, t11 CLA alcanzó su mayor concentración (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a las 48 h de fermentación (Gorissen et al., 2011).

Renes et al. (2017b) reportaron valores de 5.79-23.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el isómero c9, t11, y 3.08-5.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del isómero t10, c12 de CLA, para cepas de *Lactobacillus spp.*, sugiriendo que las enzimas específicas para la bioconversión de los isómeros, podrían verse afectadas por la concentración de otros isómeros, o incluso por el pH.

6.2.2. Porcentajes de Bioconversión de LA a CLA

Las cepas de *Enterococcus spp.* tuvieron una conversión de LA a CLA total de 0.26-0.58%, inferiores ($p < 0.05$) a la cepa testigo, que presentó 0.73 %. Las cepas de *Enterococcus spp.* S18, S24 y S29 mostraron un porcentaje de conversión igual ($p > 0.05$) de CLA entre ellas y representan el valor más alto ($p < 0.05$). La cepa con menor ($p < 0.05$) porcentaje de conversión fue L45 (Tabla 3). Las cepas de estudio *Lactobacillus* J10 y J20 mostraron porcentajes significativamente iguales de conversión de CLA total de 0.57 y 0.58%, respectivamente; sin embargo, fueron menores ($p < 0.05$) a lo obtenido por la cepa testigo. El porcentaje de conversión total de CLA de estas dos cepas fue igual ($p > 0.05$) con respecto a *Enterococcus spp.* (S18, S24, S29).

En otros estudios se han reportado porcentajes de bioconversión para cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium spp.*, con valores de 0.07-14.14 % (Terán et al., 2015). Mientras que, para cepas específicas de *Bifidobacterium spp.* el rango es de

Tabla 3. Porcentaje de conversión de LA a CLA de las cepas de estudio.

Cepas	Porcentaje de conversión (%)		
	c9,t11	t10,c12	CLA Total
L. r	0.39 ± 0.02 ^a	0.34 ± 0.01 ^a	0.73 ± 0.03 ^a
J10	0.29 ± 0.02 ^{ab}	0.28 ± 0.01 ^{ab}	0.57 ± 0.02 ^{ab}
J20	0.29 ± 0.05 ^b	0.29 ± 0.05 ^{ab}	0.58 ± 0.10 ^{ab}
S18	0.25 ± 0.02 ^{bc}	0.29 ± 0.01 ^{ab}	0.53 ± 0.03 ^{ab}
S24	0.27 ± 0.01 ^b	0.31 ± 0.01 ^{ab}	0.58 ± 0.01 ^{ab}
S25	0.24 ± 0.01 ^c	0.27 ± 0.01 ^b	0.50 ± 0.03 ^b
S29	0.27 ± 0.11 ^{bc}	0.31 ± 0.11 ^{ab}	0.57 ± 0.21 ^{ab}
L45	0.13 ± 0.00 ^d	0.13 ± 0.00 ^c	0.26 ± 0.00 ^c

Literales diferentes en la misma columna representan diferencia estadística entre cepas ($p < 0.05$).

29.6-41.6 % (Villar-Tajadura et al., 2014). Para el caso de cepas específicas de *Lactobacillus* spp., se reportan valores de conversión de CLA de 1.6-4.6% cuando se usó 1% de inóculo en medio MRS adicionado con 0.5 mg/mL de LA, y 72 h de incubación, reportándose la presencia de tres isómeros (c9, t11; t10, c12 y t9, t11) (Gorissen et al., 2011).

Los porcentajes de conversión del isómero c9, t11 osciló entre 0.13-0.27% para cepas de *Enterococcus* spp.; estas cepas mostraron una conversión igual ($p > 0.05$), excepto la cepa L45 que presentó el menor ($p < 0.05$) porcentaje de conversión. Ribeiro et al. (2018) en cepas de *Enterococcus* spp aisladas de queso artesanal Pico, presentaron porcentajes de conversión de 0.43-0.93% para el isómero c9, t11, siendo valores superiores a lo reportado en este estudio.

Los porcentajes de conversión del isómero c9, t11 para las dos cepas de *Lactobacillus* spp, fueron menores ($p < 0.05$) que la cepa testigo y no mostraron diferencia significativa al menos con tres cepas de *Enterococcus* spp. En otros estudios con cepas de *Lactobacillus* spp., se han reportado porcentajes de conversión de 0.42-37.78% del isómero c9,t11 (Yang et al., 2014), valores mayores a lo encontrado en este estudio, a una mayor concentración de LA.

En este estudio, los porcentajes de conversión para el isómero t10, c12 para el caso de cepas de *Lactobacillus* J10 y J20 fueron de 0.28 y 0.29%, respectivamente. Al respecto, Yang et al. (2014) reportaron valores de conversión de 0.47-6.35% para este mismo isómero a partir de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. y de una concentración de 0.55 mg/mL de LA. Los porcentajes de conversión del isómero t10, c12 para cepas de *Enterococcus* spp. varió entre 0.13-0.31%, siendo las cepas S29, S24 y S18 las que presentaron el porcentaje más alto de conversión, pero no mostraron diferencia significativa ($p>0.05$). La cepa que mostró el menor ($p<0.05$) porcentaje de conversión fue L45 con 0.13% (Tabla 3).

En la Figura 11 se muestran los tiempos de retención del LA y de los isómeros respectivos. En la Figura 12 y 13, se muestra el cromatograma de *Lactobacillus fermentum* J10 y *Enterococcus* spp., donde se observa ácido linoleico y los dos isómeros, donde no se marcan diferencias en las áreas de cada una de las cepas.

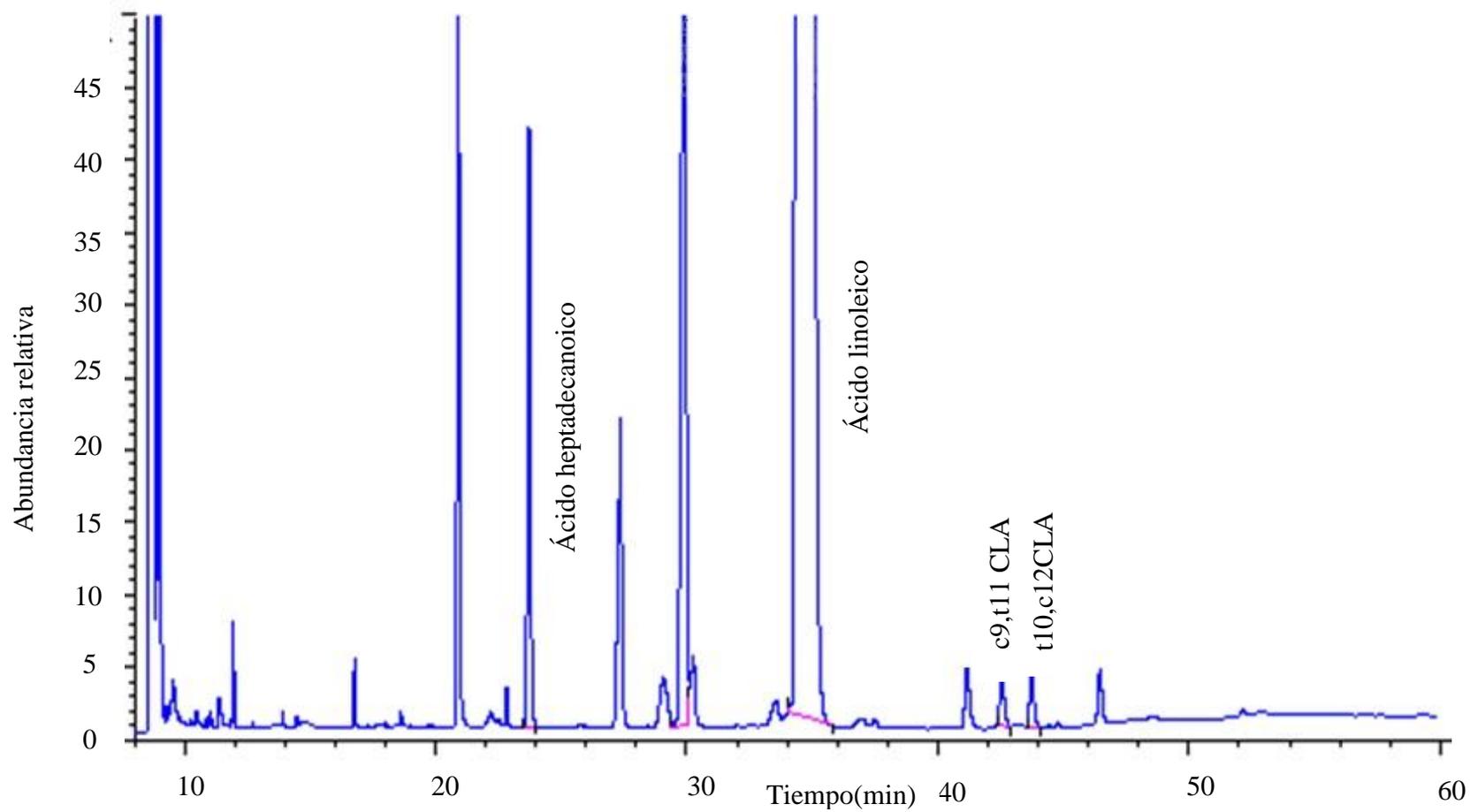


Figura 11. Representación de los tiempos de retención para el LA y CLA de la cepa testigo *Lactobacillus reuteri* ATCC 55739.

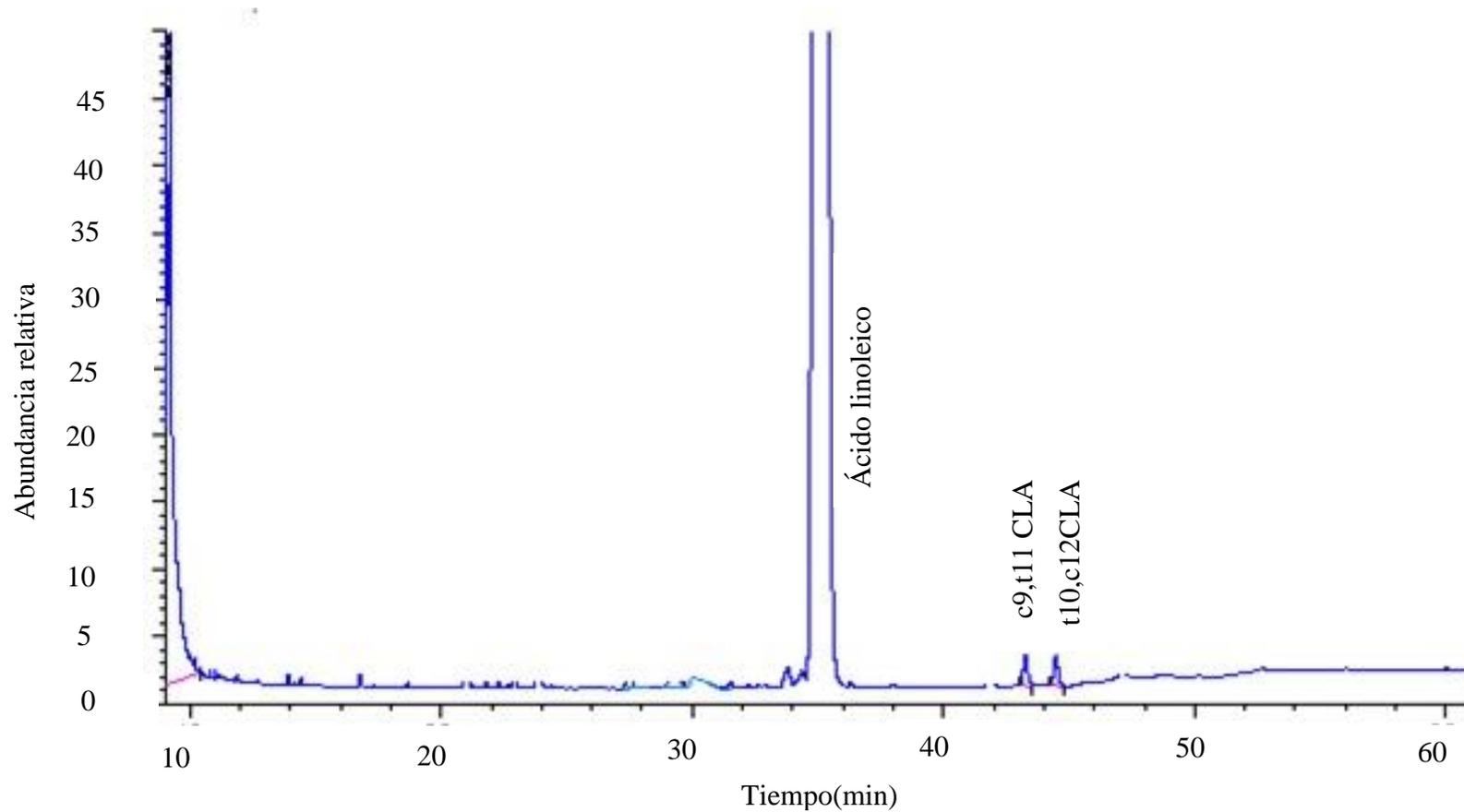


Figura 12. Representación de los isómeros de CLA producidos por *Lactobacillus fermentum* J10.

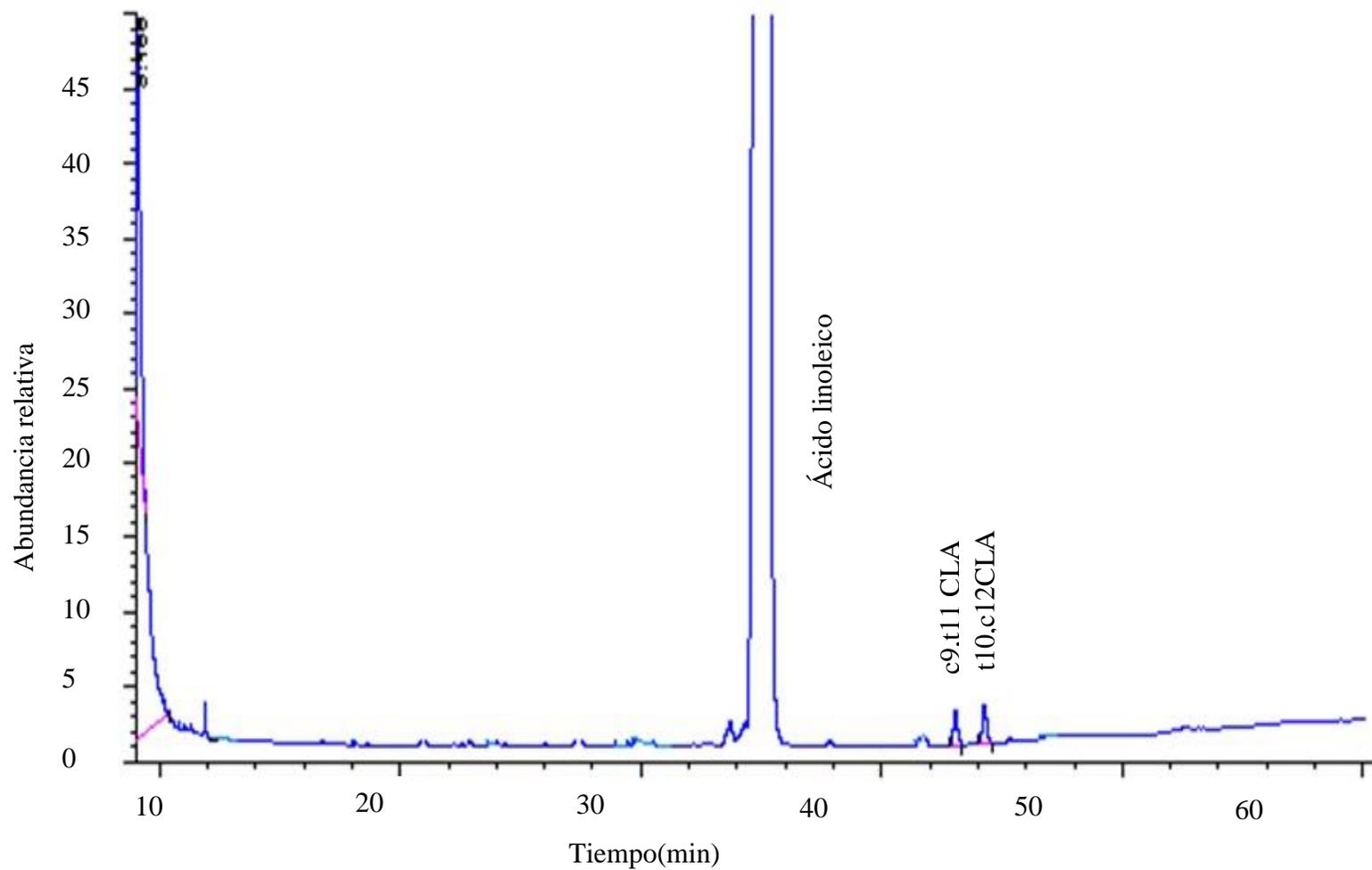


Figura 13. Representación de los isómeros de CLA producidos por la cepa de *Enterococcus* S18.

7. CONCLUSIONES

Todas las cepas de estudio, pertenecientes a los géneros *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus* spp., mostraron capacidad de biosintetizar CLA a partir de un medio de cultivo enriquecido con LA, lo cual fue demostrado con el método espectrofotométrico y por cromatografía de gases; sin embargo, la diferencia en concentración de CLA por ambos métodos sugiere la necesidad de estandarizar los procesos de extracción del método espectrofotométrico para lograr una mayor precisión en la cuantificación de dicho compuesto.

Los resultados sugieren que todas las cepas de estudio presentan el potencial de poder producir CLA y que las cepas de *Enterococcus* spp S18 y S25 pueden ser consideradas con potencial a nuevos estudios para correlacionar con efectos en la salud y poder conformar cultivos microbianos diseñados tecnológicamente para producir CLA.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasiliasi S., Tan J. S., Ibrahim T., Bashokouh T. A., Ramakrishnan F., Mustafa N. R., S., Ariff A. B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *RSC Advances*. 7(47):29395-29420.
- Akoh C. C., Min D. B. (2008). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology* (3rd ed). Boca Raton: CRC Press: Taylor & Francis Group.
- Albers R., Wielen V. D., Brink P. J., Hendriks E. J., Dorovska-Taran V. N., Mohede I. C. (2003). Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57(4):595-603.
- Alonso L., Cuesta E. P., Gilliland S. E. (2003). Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *Journal of Dairy Science*. 86(6):1941-1946.
- Al-Saman A., Rafaat M. E. Elhadary A. E. (2016). The impact of oil type and lactic acid bacteria on conjugated linoleic acid production. *JOBIMB*. 4(2):25-29.
- Ando A., Ogawa J., Kishino S., Shimizu S. (2003). CLA production from ricinoleic acid by lactic acid bacteria. *JAOCs*. 80(9): 889–894.
- Andrade J.C., Ascenca K.O., Gullo P.N., Henriques S.M., Pinto J.M., Rocha-Santos T.A., Freitas A.C., Gomes A.M. (2012). Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review. *International Journal of Dairy Technology*. 65:1-13.
- Audy J., Labrie S., Roy D., and Pointe L. (2010). Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum subsp. longum* CRC 002. *Microbiology*. 156(3):653-664.
- Barrett E., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C. (2007). Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(7):2333-2337.
- Báth K., Roos S., Wall T., Jonsson H. (2005). The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. *FEMS Microbiology Letters*. 253:75–82.
- Benjamin S., Prakasan P., Sajith S., Andre-Denis G. W., Spener F. (2015). Pros and cons of CLA consumption: an insight from clinical evidences. *Nutrition and Metabolism*. 12(4):1-20.
- Bergsson G., Olafur S., Halldor T. (2002). Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 20: 258-262.
- Bhattacharya A., Banu J., Rahman M., Causey J., Fernandes G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 17(12):789-810.

- Blankson H., Stakkestad J. A., Fagertun H., E. Thom E., Wadstein J., Gudmundsen O. (2000). Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *The Journal of Nutrition*. 130(12):2943–2948.
- Bontinis T. G., Mallatoua H., Pappa E.C., Massourasb T., Alichanidis E. (2012). Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Research*. 105:193–201.
- Chapot-Chartier M. P., Kulakauskas S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 13(1): 1-23.
- Chen H., Yang B., Gu S., Zhang B., Xu Q., Ye Q., Song Y., Chen Y. Q., Zhang H., Chen W. (2012). Purification and characterization of a linoleate isomerase from *Lactobacillus plantarum* ZS2058. *African Journal of Biotechnology*. 11(20): 4579-4587.
- Chen J. F. (2001). Effects of conjugated linoleic acid on the degradation and oxidation stability of model lipids during heating and illumination. *Food Chemistry*. 72:199-206.
- Coakley M., Ross R.P, Nordgren M., Fitzgerald G., Devery R., Stanton C. (2003). Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 138–145.
- Dahiya D. K., Puniya, A. K. (2017). Isolation, molecular characterization and screening of indigenous lactobacilli for their abilities to produce bioactive conjugated linoleic acid (CLA). *Journal of Food Science and Technology*. 54(3):792-801.
- DeGuire J. R., Makarem N., Vanstone C. A., Morin S., Duque G., Weiler H. A. (2012). Conjugated linoleic acid is related to bone mineral density but does not affect parathyroid hormone in men. *Nutrition Research*. 32(12):911-920.
- Desbois A.P., Valerie J. S. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85 (6):1629–1642.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2010). Scientific Opinion on the safety of “conjugated linoleic acid (CLA)-rich oil” (Tonalin® TG 80) as a Novel Food ingredient: Safety of conjugated linoleic acid (CLA)-rich oil (Tonalin®). *EFSA Journal*, 8(5): 1600. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1600>
- Fadda S., López C., Vignolo G. (2010). Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science*. 86(1):66-79.
- Faglai N., Catalá A. (2008). Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques. *Biophysical Chemistry*. 137(1): 56-62.
- Farmani J., Safari M., Roohvand F., Razavi S. H., Aghasadeghi, M. R., Noorbazargan H. (2010). Conjugated linoleic acid-producing enzymes: A bioinformatics study. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 112(10):1088-1100.

- Florou-Paneri P., Christaki E., Bonos E. (2013). Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. J. M. Kongo (Ed.), Lactic acid bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes. InTech.Croatia.589-614.
- Fowles J., Banton M., Klapacz J., Shen H. (2017). A toxicological review of the ethylene glycol series: Commonalities and differences in toxicity and modes of action. Toxicology Letters. 278:66-83.
- Fox J. (1981). Fatty acids' spontaneous oxidation clarified. Polyunsaturated fatty acids autoxidize by three competing pathways, yielding products similar to physiologically active biological products. Chemical Engineering News. 59(43):18-19.
- Gálvez A, Abriouel H, Benomar N., Lucas R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. Current Opinion in Biotechnology. 21:142-148
- Gänzle M.G., Vermeulen N., Vogel R. F. (2007). Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. Food Microbiology. 24(2):128-138.
- Giraffa G. (2002). *Enterococci* from foods. FEMS Microbiology Reviews. 26(2):163-171.
- Goh, H. M. S., Yong, M. H. A., Chong, K. K. L., Kline, K. A. (2017). Model systems for the study of *Enterococcal* colonization and infection. Virulence. 8(8):1525-1562.
- Gorissen L., Leroy F., Vuyst L., Smet D., S., Raes K. (2015). Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: A technological challenge. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 55(11):1561-1574.
- Gorissen L., Weckx S., Vlaeminck B., Raes K., Vuyst D.L., Smet D.S., Leroy F. (2011). Linoleate isomerase activity occurs in lactic acid bacteria strains and is affected by pH and temperature. Journal of Applied Microbiology. 111(3):593-606.
- Hayek A. S., Ibrahim A. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A Review. Food and Nutrition Sciences. 4:73-87.
- Hermansyah H, Wijanarko A, Dianursant M. G., Wulan P.P.D.K., Arbianti R., Soemantojo R.W., T.S. Utami, Yuliusman, M. Kubo, Shibasaki-Kitakawa N., Yonemoto T. (2007). Kinetic model for triglyceride hydrolysis using lipase: Review. Makara Journal of Technology. 11 (1):30-35.
- Hernandez-Mendoza A., Lopez-Hernandez A., Hill C.G., Garcia H.S. (2009). Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus reuteri* under different growth conditions. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 84(2):180-185.
- Hotamisligil G. S., Spiegelman B. M. (1994). Tumor Necrosis Factor α : A key component of the obesity-diabetes link. Diabetes. 43:1271-1278.
- Hur S. J., Park Y. (2007). Effect of conjugated linoleic acid on bone formation and rheumatoid arthritis. European Journal of Pharmacology. 568(1-3):16-24.
- Irmak S., Dunford N. T., Gilliland S. E., Banskalieva V., Eisenmenger M. (2006). Biocatalysis of linoleic acid to conjugated linoleic acid. Lipids. 41(8): 771–776.

- Isaacson T., Ohad I., Beyer P., Hirschberg J. (2004). Analysis *in vitro* of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiology*. 136:4246–4255
- Jenkins K., Courtney D. (2003). *Lactobacillus* growth and membrane composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. *Journal of Microbiology*. 49: 51–57.
- Jung M. Y., Kim G.B., Jang E. S., Jung Y. K., Park S. Y., Lee B. H. (2006). Technical Note: Improved extraction method with hexane for gas chromatographic analysis of conjugated linoleic acids. *Journal of Dairy Science*. 89(1):90-94.
- Khaskheli A.A., Farah N. T., Demir A. S., Cebeci A., Jawaid S. (2013). A highly selective whole cell biocatalysis method for the production of two major bioactive conjugated linoleic acid isomers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2:328–332.
- Kepler C.R., Tucker W.P., Tove S.B. (1971). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*. 246(9): 2765-2771.
- Kelley D.S., Taylor P.C., Rudolph I.L., Benito P., Nelson G.J., Mackey B.E., Erickson K.L. (2000). Dietary conjugated linoleic acid did not alter immune status in young healthy women. *Lipids*. 35(10):1065-1071.
- Khosravi A., Faramarzi M., Khodaiyan F., Mohammad S., Gharibzadeh T. (2015). Bioconversion enhancement of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* using the culture media manipulation and numerical optimization. *Journal of Food Science and Technology*. 52(9):5781–5789.
- Kim, Y. J., Liu, R. H. (2002). Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*. 67(5):1731-1737.
- Kishino S., Ogawa J., Yokozeki K., Shimizu S. (2011). Linoleic acid isomerase in *Lactobacillus plantarum* AKU109a proved to be a multi-component enzyme system requiring oxidoreduction cofactors. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 72(2):318-322.
- Kishino S., Ogawa J., Omura Y., Matsumura K., Shimizu S. (2002). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79(2):159–163.
- Kohlmeier M. (2015). Fatty Acids. *En Nutrient Metabolism*. Elsevier. pp. 111-186
- Komatsuzaki N., Nakamura T., Kimura T., Shima J. (2008). Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 278-285.
- Kreider R. B., Ferreira M. P., Greenwood M., Wilson M., Andanthony L.A (2002). Effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training on body composition, bone density, strength, and selected hematological markers. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 16(3):325–334.

- Kuhl, G., De Dea L. J. (2016). Biohydrogenation of linoleic acid by lactic acid bacteria for the production of functional cultured dairy products: A Review. *Foods*. 5(1):1-11.
- Lahtinen S., Ouwehand A.A, Seppo S., Wring A.V. (2012). *Lactic acid bacteria*. Londres. CRC Pres. 1-14.
- Lee S., C. Kim C., Choi J., Ji E., Deok-Kun Oh. (2003a). Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnology Letters*. 25:935–938.
- Lee S. O., Hong G. W. Oh D. K. (2003b). Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid by immobilized *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnology Progress*. 19:1081–1084
- Lehnen T.E., Ramos da Silva M., A. Camacho A., A. Marcadenti and A. Machado (2015). A review on effects of conjugated linoleic fatty acid (CLA) upon body composition and energetic metabolism. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 12:1-11.
- Liavonchanka A. Feussner I. (2008). Biochemistry of PUFA double bond isomerases producing conjugated linoleic acid. *Chemistry and Sustainability Energy and Materials*. 9:1867 – 1872
- Lin T.Y. (2006). Conjugated linoleic acid production by cells and enzyme extract of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with additions of different fatty acids. *Food Chemistry*. 94:437–441.
- Lin T.Y., Hung T.H., Cheng T.S.J. (2005). Conjugated linoleic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. *Food Chemistry*. 92:23–28.
- Lin T.Y., Lin C.W., Wang Y. J. (2003). Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079. *Food Chemistry*. 83:27-31.
- Lin Tung Y., Lin C.W., Lee C.H. (1999). Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chemistry*. 67(1):1–5
- MacDonald, H. B. (2000). Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. *Journal of the American College of Nutrition*, 19 (2 Suppl): 111S-118S.
- Macouzet, M., Lee B. H., and Robert N. (2010). Genetic and structural comparison of linoleate isomerases from selected food-grade bacteria: Linoleate isomerases from food-grade bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 109(6): 2128-2134.
- Macouzet M., Lee B.H., and Robert N. (2009). Production of conjugated linoleic acid by probiotic *Lactobacillus acidophilus* La-5. *Journal of Applied Microbiology*. 106:1886–1891.
- Maia M.R., Chaudhary L.C., Bestwick R.C.S., McKain A.J., Larson N.T.R., Graham I.A., and Wallace R.J. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BmcMicrobiology*. 10(52): 1-10.

- McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 57:127–144.
- Medina R. B., Oliszewski R., Mukdsi A.M.C., Van Nieuwenhove C. P., González S. N. (2011). Sheep and goat's dairy products from South America: Microbiota and its metabolic activity. *Small Ruminant Research*. 101:84-91.
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Kabużek S. (2004). Cytoplasmatic bacterial membrane responses to environmental perturbations. *Polish Journal of Environmental Studies*. 13(5):487-494
- National Cattlemen's Beef Association (2007). Conjugated linoleic acid and dietary beef. *Human Nutrition Research*. 1-8.
- Nieuwenhove V. C. P., Teran V., Nelina S. (2012). Conjugated linoleic and linolenic acid production by Bacteria: Development of Functional Foods Probiotics. 55-80.
- Nieuwenhove C.P.V., Oliszewski R., Gonzalez S.N. Perez C.A.B. (2007). Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. *The Society for Applied Microbiology. Letters in Applied Microbiology*. 44:467–474.
- Ogawa J., Matsumura K., Kishino S., Omura Y., Shimizu S. (2001). Conjugated linoleic acid accumulation via 10-Hydroxy-12- octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and environmental microbiology*. 67(3):1246–1252.
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando A., Sugimoto S., Mihara K., Shimizu S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100(4): 355-364.
- Özcelik S., Kuley E., Özogul F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid. *Food Science and Technology*. 73: 536-542.
- Palombo J. D., Ganguly A., Bistrain B. R., Menard, M. P. (2002). The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Letters*. 177(2):163-172.
- Pandit A., Anand S., Kalscheur K., Hassan A. (2012). Production of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria in milk without any additional substrate. *International Journal of Dairy Technology*. 65(4):603-608.
- Pariza M. W., Park Y., Cook M. E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*. 40(4): 283-298.
- Pariza M. W., Park Y., Cook M. E. (2000). Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 223(1):8-13.
- Pariza M. W., Yang X.Y. (1999). Method of Producing Conjugated Fatty Acids. U.S. Patent. 5,856,149.
- Park P.W., Goins R.E. (1994). In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in food. *Journal of food Science*. 59(6):1262-1266.

- Park H. G., Cho S. D., Kim J. H., Lee H., Chung S. H., Kim S. B., Kim Y. J. (2009). Characterization of conjugated linoleic acid production by *Bifidobacterium breve* LMC 520. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(16):7571-7575.
- Park Y. W., Nam M. S. (2015). Bioactive peptides in milk and dairy products: A review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 35(6):831-840.
- Patel A., Shah N., Prajapati J.B. (2013). Biosynthesis of vitamins and enzymes in fermented foods by lactic acid bacteria and related genera - A promising approach. *International Journal of Dairy Technology*. 65(4):603-608.
- Patrick O. M. (2012). Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. *Rwanda Journal of Health Sciences* 1(1):39-50.
- Philippaerts A., Goossens S., Jacobs P. A., Sels B. F. (2011). Catalytic production of conjugated fatty acids and oils. *Chemistry and Sustainability Energy and Materials*. 4(6): 684-702.
- Pierre J., Sels B.F. (2011). Catalytic production of conjugated fatty acids and oils. producing conjugated linoleic acid. *Chemistry and Sustainability Energy and Materials*. 9:1867–1872.
- Platt I., Rao L.G., Medel-Sohemy A. (2007). Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on mineralized bone nodule formation from human osteoblast-like cells. *Experimental Biology and Medicine*. 232: 246
- Renes E., Linares D. M., González, L., Fresno J. M., Tornadijo M. E., Stanton C. (2017a). Production of conjugated linoleic acid and gamma-aminobutyric acid by autochthonous lactic acid bacteria and detection of the genes involved. *Journal of Functional Foods* 34: 340-346.
- Renes E., Linares D. M., González L., Fresno J. M., Tornadijo M. E., Stanton C. (2017b). Study of the conjugated linoleic acid synthesis by *Lactobacillus* strains and by different co-cultures designed for this ability. *Journal of Functional Foods*. 35: 74-80.
- Ribeiro S. C., Stanton C., Yang, B., Ross R. P., Silva C.C.G. (2018). Conjugated linoleic acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* isolated from Pico cheese. *Food Science and Technology*. 90:403-411.
- Rincon-Delgado M. I., Lopez-Hernandez A., Wijaya I., Rankin S. A. (2012). Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 95:1128–1139.
- Rodríguez-Alcalá L. M., Braga T., Malcata X.F., Gomes A., Fontecha J. (2011). Quantitative and qualitative determination of CLA produced by *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag⁺-HPLC techniques. *Food Chemistry*. 125(4): 1373-1378.
- Roman-Nunez, Cuesta-Alonso E.P., Gillil E. (2007). Influence of sodium glycocholate on production of conjugated linoleic acid by cells of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55739. *Journal of Food Science*. 72(4).M140-M143.

- Ross R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 362:801–809.
- Ruiz B., Chávez A., Forero A., García-Huante Y., Romero A., Sánchez M., Rocha D., Sánchez B., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Langley E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*. 36(2): 146–167.
- Salamon R. V., Visi E. V., Andras C. D., Kiss, Z. C., Csapo J. (2012). Synthetic methods for obtaining conjugated linoleic acids (CLA) by catalysis. *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria*. 5:32–51.
- Sleator R.D., Hill C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*.26:49–71.
- Smedman A., Vessby B. (2001). Conjugated linoleic acid supplementation in humans-metabolid effects. *Lipids*. 36(8):773-781.
- Smit G., Smit B.A., Engels J.M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 591–610.
- Song H.J., Grant I., Rotondo D., Mohede I., Sattar N., Heys S. D., Wahle K.W.J. (2005). Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*. 59(4):508-517.
- Sosa-Castañeda J., Hernández- Mendoza A., González-Córdova A.F., Vallejo-Cordova B. (2014). Producción de ácido linoleico conjugado (ALC) por bacterias ácido lácticas (BAL) y su efecto benéfico para la salud. *Interciencia* 39(8): 540-546.
- Sosa-Castañeda J., Hernández-Mendoza A., Astiazarán-García H., Garcia H.S., Estrada-Montoya M.C., González-Córdova A.F., Vallejo-Cordoba B. (2015). Screening of *Lactobacillus* strains for their ability to produce conjugated linoleic acid in milk and to adhere to the intestinal tract. *Journal of Dairy Science*. 98 (10): 6651-6659.
- Suganuma M., Okabe S., Sueoka E., Iida N., Komori A., Kim S.J., Fugiki H. (1996). A new process of cancer prevention mediated through inhibition of tumor necrosis factor expression. *Cancer Research*. 56:3711–3715.
- Terán V., Pizarro P. L., Zacarías M. F., Vinderola G., Medina R., Van Nieuwenhove C. (2015). Production of conjugated dienoic and trienoic fatty acids by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Functional Foods*. 19:417-425.
- Theoleyre S., Wittrant Y., Tat S. K., Fortun Y., Redini F., Heymann D. (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 15(6):457-475.
- Thom E., Wadstein J., Gudmundsen A. (2001). Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *The Journal of International Medical Research*. 29: 392–396.
- Thomas T., Burguera B. (2002). Is Leptin the Link Between Fat and Bone Mass? *Journal of Bone and Mineral Research*. 17(9):1563-1569.

- Tricon S., Burdge G. C., Williams C. M., Calder P. C., Yaqoob P. (2005). The effects of conjugated linoleic acid on human health-related outcomes. *Proceedings of the Nutrition Society*. 64(02): 171-182.
- Viana de Souza J., Silva Dias F. (2017). Protective, technological, and functional properties of select autochthonous lactic acid bacteria from goat dairy products. *Current Opinion in Food Science*. 13:1-9.
- Villar-Tajadura M. A., Rodríguez-Alcalá L. M., Martín V., Gómez de Segura A., Rodríguez J. M., Requena T., Fontecha J. (2014). Production of conjugated linoleic and conjugated α -linolenic acid in a reconstituted skim milk-based medium by Bifidobacterial strains isolated from human breast milk. *BioMed Research International*. 1-6.
- Xu S., Boylston T. D., Glatz B. A. (2004). Effect of lipid source on probiotic bacteria and conjugated linoleic acid formation in milk model systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 81(6): 589–595.
- Yang B., Chen H., Stanton C., Ross R. P., Zhanga H., Yong Q., Wei C. (2015). Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*. 15:314–325.
- Yang B., Chen H., Gu Z., Tian F., Ross R. P., Stanton C., Zhang H. (2014). Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 117(2):430-439.
- Yang L., Leung L. K., Huang Y., Chen Z.Y. (2000). Oxidative stability of conjugated linoleic acid isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(8):3072-3076.
- Yurawecz M. P. (1999). *Advances in conjugated linoleic acid research*. Ed. AOCS Press. USA. 39-53.
- Zhang Y.M., Rock C.O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 6:222–233.