

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

“PRODUCCIÓN DE LOS ISÓMEROS *cis*-9:*trans*-11
y *trans*-10:*cis*-12 DEL ÁCIDO LINOLEICO
CONJUGADO POR CEPAS ESPECÍFICAS DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS”

Por:

MONTSERRAT VARGAS NEGRETE

TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

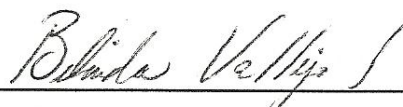
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA.

DICIEMBRE DEL 2011


APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Ing. Montserrat Vargas Negrete, la han encontrado satisfactoria y recomienda que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Belinda Vallejo Galland

Director de Tesis



Dr. Aarón Fernando González Córdova

Sinodal



Dr. Adrián Hernández Mendoza

Sinodal



Dr. Hugo Sergio García Galindo

Sinodal

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Pacheco', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)*, por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo de investigación.

Al *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.* por darme la oportunidad de desarrollarme académicamente.

A la **Dra. Belinda Vallejo Galland** por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, pero sobre todo por su apoyo durante la realización del proyecto, por su amistad y paciencia. Muchísimas gracias doctora.

Al **Dr. Aarón González**, por sus consejos y su gran amistad. Gracias por ser un gran apoyo durante el proyecto y un gran amigo, por escucharme y siempre tener una palabra de aliento y de regaño.

Al **Dr. Adrián Hernández**, por su apoyo durante el presente trabajo, así como su gran amistad. Muchas gracias por ayudarme a crecer como persona, por creer en mí y por todo el cariño.

A mi comité de tesis integrado por: Dra. Belinda Vallejo Galland, Dr. Aarón F. González Córdova, Dr. Adrián Hernández Mendoza y Dr. Hugo Sergio García, por sus valiosas aportaciones y observaciones a lo largo del trabajo de investigación.

A la **Dra. Gloria Yepiz**, Coordinadora de Programas Académicos, por su apoyo durante el proyecto.

A la **M. en C. María del Carmen Estrada Montoya** por el apoyo técnico recibido en el laboratorio, así como en la utilización de equipos analíticos durante el trabajo, pero sobre todo por su paciencia y amistad.

Al personal del CIAD, A. C., en especial a Laura García, Argelia Marin, Verónica, Héctor, Gerardo, Antonio, Fernando Leyva, por su gran ayuda durante mi estancia en ésta institución.

A mis compañeros de laboratorio de Lácteos: Ricardo, Lizz, Ángel, Fausto, Isidro, Trinidad, Julio, José Carlos, Graciela, Elvia, Rogelio, Cristóbal, Jesús Monzón, Jesús Sosa, Priss, Vane, Sara, Clemen, Lilia, por su apoyo durante la maestría y por el agradable tiempo compartido.

A mis **compañeros de maestría**, en especial a mis **Amig@s**: Karina, Vianey, Melissa, Anita, Gaby, Erika, Camelia, Liliana, Karla, Karina Galdámez, Cynthia y Carlos, gracias por haber sido parte de mi vida por compartir hermosos momentos y por convertirse en mi familia durante estos dos años.

A Ricardo Reyes, Lizz Paz, Ángel Estrada, Fausto Cantú, Isidro Méndez, Vianey Guerrero, Melissa Amaya, Karina Chávez y Gabriela Maldonado, no existen palabras para agradecer su amistad, cariño, apoyo y comprensión. Gracias a ustedes mi estancia en Hermosillo fue muy agradable, me llevo

hermosos recuerdos y el mejor regalo que es su amistad, los voy a extrañar mucho....

A A Alma Campa, Karla Martínez, M.C. Guille, Dr. Juan Pedro C, por apoyarme en cada momento.

DEDICATORIA

“El camino ha sido difícil, pero gracias a ustedes valió la pena”

Este trabajo está dedicado a mi hermosa familia, que aún estando lejos siempre estuvieron a mi lado en cada paso que daba, ayudándome a levarme cada vez que caía y dándome una palabra de aliento cada vez que el miedo trataba de vencerme.....

A mis padres

Crispin Vargas Rojas, Norma A. Negrete Suárez.

El amor por un hijo es tan grande que no existen palabras para describirlo, gracias por su amor incondicional, por apoyarme cada día y estar en cada momento conmigo....

Gracias a ustedes sé que cada sueño se puede cumplir, lo más difícil fue estar lejos, pero sé que valió la pena.

Éste nuevo logro es de ustedes y para ustedes

Los Quiero mucho!!!

A mis hermanos y hermosas sobrinas

Orlando Vargas, Christal Vargas, Janet García, “Zua Vargas, Christina Rodríguez”.

Fue difícil estar lejos y perderme tantos hermosos momentos, pero cada día estuvieron en mi corazón y fueron una inspiración para seguir adelante....gracias por ser esa luz en la oscuridad...los quiero.

A mi familia en Toluca y D.F.

Julia Suárez, Gloria Rojas, Guadalupe Negrete, Julissa N., Miguel N., Sandra N., Gloria Flores, Rebeca F., Familia Negrete Suárez, y Familia Vargas. Gracias por su amor y cariño incondicional....

A mi novio Florencio Espínola Alvarado....

Gracias por tu paciencia, apoyo, por darme palabras de aliento y también por tus regaños, por ser una de mis razones para seguir luchando, por creer en mí, pero sobre todo por el gran amor que siempre me has tenido.....

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO	ix
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
LECHE	3
Lactosa	3
Proteínas	3
Sales	4
Lípidos	4
ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA)	6
Definición	6
Fuente natural de CLA	7
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL CLA	9
Actividad antioxidante	9
Actividad anticarcinogénica	9
Modificación en el metabolismo de los lípidos	10
SÍNTESIS DE CLA	11
Métodos químicos	11
Métodos bioquímicos	12
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)	14

INCREMENTO DE CLA EN PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS.....	18
<i>HIPÓTESIS.....</i>	22
<i>OBJETIVOS.....</i>	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	23
Reactivación de Bacterias Ácido Lácticas	23
Acondicionamiento	24
Preparación de muestras.....	24
Fermentación de la leche adicionada con aceite de girasol por BAL.....	24
Determinación de CLA por cromatografía de gases.....	25
Extracción de la grasa	25
Metilación de la grasa.....	26
Cuantificación de CLA por cromatografía de gases	26
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>	28
<i>CONCLUSIONES.....</i>	49
<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fuente de CLA en alimentos.....	8
Tabla 2. BAL con potencial probiótico aisladas de queso Cocido	15
Tabla 3. <i>Lactococcus lactis</i> aislados de diferentes fuentes.....	16
Tabla 4. Producción de CLA (mg.L-1) por BAL empleando diferentes sustratos	17
Tabla 5. Producción de CLA en productos lácteos	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ácido linoleico.....	5
Figura 2. a) isómeros <i>cis-9:trans-11</i> , b) isómero <i>trans-10:cis-12</i>	7
Figura 3. Rutas para la síntesis del CLA.....	12
Figura 4. Vía para la biosíntesis del CLA (9- <i>cis</i> , 11- <i>trans</i> – C18:2)	13
Figura 5. Cromatograma típico de los isómeros <i>cis-9:trans-11</i> y <i>trans-10:cis-12</i> del CLA.....	29
Figura 6. Cromatograma típico del perfil de ácidos grasos de leche fermentada con <i>Lb. johnsonii</i>	30
Figura 7. Curva de calibración de ácido linoleico conjugado (CLA) total.	31
Figura 8. Producción de CLA de BAL en leche adicionada con aceite de girasol (0.1%) y 16 h de incubación.....	34
Figura 9. Producción de los isómeros <i>cis-9:trans-11</i> y <i>trans-10:cis-12</i> por <i>Lactobacillus</i> , <i>Propionibacterium</i> y <i>Bifidobacterium</i> en leche adicionada con aceite de girasol (0.1%) y 16 h de incubación.....	36
Figura 10. Producción de los isómeros <i>cis-9:trans-11</i> y <i>trans-10:cis-12</i> por cepas de <i>Lactococcus lactis</i> en leche adicionada con aceite de girasol (0.1%) y 16 h de incubación.....	38
Figura 11. Producción de los isómeros <i>cis-9:trans-11</i> y <i>trans-10:cis-12</i> de cepas de <i>Lactobacillus</i> en leche adicionada con aceite de girasol (0.1%) y 16 h de incubación.....	41
Figura 12. Producción de CLA por <i>Lactobacillus johnsonii</i> en leche con diferentes concentraciones de aceite de girasol y 16 h de incubación.....	43
Figura 13. Producción de CLA por <i>Lactobacillus reuteri</i> en leche con diferentes concentraciones de aceite de girasol y 16 h de incubación.....	44
Figura 14. Producción de CLA de BAL con cultivo iniciador en leche adicionada con aceite de girasol (.1 %) y 8 h de incubación.....	46

Figura 15. Producción de los isómeros *cis*-9:*trans*-11 y *trans*-10:*cis*-12 de BAL con cultivo iniciador en leche adicionada con aceite de girasol (.1 %) y 8 h de incubación48

RESUMEN

El ácido linoleico conjugado (CLA) se produce de forma natural en el rumen de las vacas como parte de la biohidrogenación del LA por microorganismos ruminales, como *Butirivibrio fibrisolvens*. El interés de aumentar el aporte de CLA en los alimentos se debe a la actividad biológica que se ha asociado a su consumo, ya que estudios sugieren que el consumo dietario de CLA puede proveer efectos positivos en la salud humana. Dichos efectos incluyen: actividad anticarcinogénica, reducción de grasa corporal, y de la actividad de lipasas lipoproteicas, y estimulación de proteínas-moduladoras del sistema inmunológico, entre otros. Por esto, se ha buscado inducir la producción de CLA en productos lácteos con diferentes bacterias ácido lácticas. El objetivo general de este trabajo fue evaluar la capacidad productora de CLA de cepas específicas de bacterias ácido lácticas (BAL) a través de la bioconversión de ácido linoleico en leche adicionada con aceite de girasol. Para esto, se comparó la producción de los isómeros *cis-9:trans-11* y *trans-10:cis-12* de CLA producidos por *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* y *Propionibacteria*. Por otro lado se estudio el efecto de la concentración de aceite de girasol en leche sobre la producción de CLA total y de cada uno de los isómeros *cis-9:trans-11* y *trans-10:cis-12*. Finalmente, se evaluó la producción de los isómeros *cis-9:trans-11* y *trans-10:cis-12* por cepas específicas de *Lactococcus* y *Lactobacillus* en la presencia de un cultivo iniciador para yogurt. Los resultados mostraron que la producción de CLA total dependió de la cepa específica utilizada para transformar el LA presente en la leche. Además se observó una menor producción de CLA cuando aumentó la concentración de aceite de girasol. Por otro lado la producción de CLA fue mejor cuando *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri* y *L. lactis* se encontraron en la presencia de un cultivo iniciador para yogurt. Por lo anterior, estas cepas podrían ser utilizadas en la elaboración de leches fermentadas que ofrezcan un mayor aporte de CLA.

INTRODUCCIÓN

El ácido linoleico conjugado (CLA), es un término genérico usado para nombrar a una mezcla de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico (LA).

El CLA se produce de forma natural en el rumen de las vacas como parte de la biohidrogenación del LA por microorganismos ruminales, como *Butirivibrio fibrisolvens* (Coakley *et al.*, 2003). Su presencia en la leche y sus derivados se ha relacionado a la acción bacteriana durante la fermentación que se lleva a cabo en el rumen de las vacas por las bacterias ruminales. Por esto, se ha buscado inducir la producción de CLA en productos lácteos con diferentes bacterias ácido lácticas. Esto proporcionaría una alternativa para la elaboración de productos lácteos enriquecidos con un mayor contenido de CLA.

El interés de aumentar el aporte de CLA en los alimentos se debe a la actividad biológica que se ha asociado al consumo de CLA. Múltiples estudios basados principalmente en modelos animales y cultivos celulares sugieren que el consumo dietario de CLA puede proveer efectos positivos en la salud humana. Dichos efectos incluyen: actividad anticarcinogénica y antiarteriosclerótica (Haugen *et al.*, 2003; Copper *et al.*, 2008), reducción de grasa corporal, del contenido de triacilglicéridos y de la actividad de lipasas lipoproteicas (Haugen *et al.*, 2003; Gnädig, 2002) y estimulación de proteínas-moduladoras del sistema inmunológico (Thiel *et al.*, 2001), entre otros efectos.

A pesar de que ensayos clínicos realizados en humanos no han dado resultados tan concluyentes como los realizados en animales, existen en el

mercado varios suplementos conteniendo CLA, adicionando un producto obtenido por síntesis química a partir de aceites vegetales.

En la actualidad existen investigaciones en curso para lograr un aumento de los niveles de CLA en la leche y sus derivados a través del manejo de la dieta de los animales, o mediante el uso de BAL como catalizadores biológicos. Sin embargo, aún no existen en el mercado este tipo de productos.

Por lo que, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad productora de CLA de cepas específicas de bacterias ácido lácticas a través de la bioconversión de ácido linoleico en leche adicionada con aceite de girasol.

ANTECEDENTES

LECHE

La leche es un fluido biológico secretado por todas las hembras mamíferos, y cuya composición varía dependiendo de la especie animal, raza, salud, estado nutricional, estado de lactancia, y edad (Mulder y Walstra, 1974). Ésta ha sido diseñada para la alimentación animal, por lo que contiene los nutrientes necesarios para que sean fácilmente digeribles por sus crías. Además del valor nutricional de la leche, otras propiedades fisiológicas de sus componentes han originado gran interés (Miller *et al.*, 2007).

Desde un punto de vista fisicoquímico, los principales constituyentes en la leche son: agua, grasa, lactosa, proteínas, vitaminas, minerales, entre otros (Fox y McSweeney, 1998).

Lactosa

La lactosa es un disacárido compuesto de D-glucosa y D-galactosa que, se encuentra aproximadamente en un 4.6 % (Fox y McSweeney, 1998; Walstra *et al.*, 1998), contribuye al valor nutritivo de la leche y sus productos, así como en la textura de ciertos productos concentrados y congelados. La lactosa también está implicada en los cambios de color y sabor de productos lácteos y es un constituyente esencial en la elaboración de productos lácteos fermentados con bacterias ácido lácticas (Fox y McSweeney, 1998).

Proteínas

La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra en forma de proteína. La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0 %. Su

función es la de proveer aminoácidos esenciales necesarios para el desarrollo de músculos y otros tejidos de las crías (Fox y McSweeney, 1998).

En la leche, las proteínas se agrupan en dos fracciones: caseínas (80 %) y proteínas séricas (20 %). Las caseínas se encuentran dispersas como un gran número de partículas sólidas tan pequeñas que no sedimentan y permanecen en suspensión. Estas partículas se llaman micelas y la dispersión de las mismas en la leche se llama suspensión coloidal. (Spreer y Mixa, 1998).

Sales

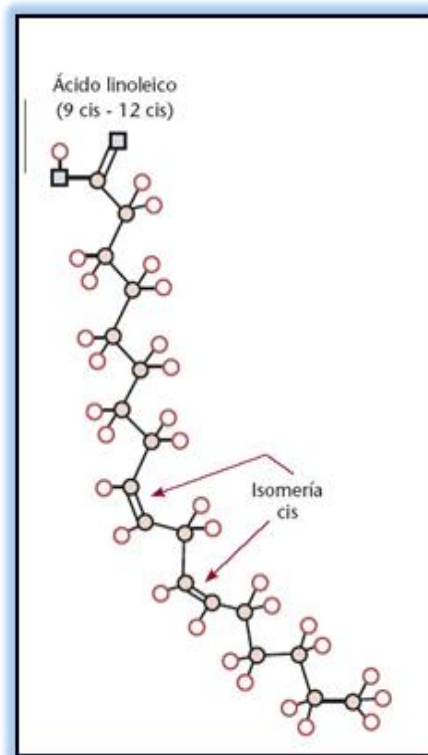
La leche contiene sales (0.8 %), dentro de las principales se encuentran fosfatos, citratos, cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos de sodio, potasio, calcio y magnesio. Estas sales son de importancia en la alimentación, procesamiento y almacenamiento de los productos lácteos debido a su marcada influencia en la conformación y estabilidad de las proteínas, lípidos y actividad de algunas enzimas (Fox y McSweeney, 1998).

Lípidos

La leche contiene aproximadamente 3.5 % de grasa, la cual depende del tipo de alimentación, edad, estación, y etapa de lactancia de la vaca. La grasa proporciona sabor, propiedades reológicas, y una fuente de energía requerida, así como una fuente de ácidos grasos esenciales (Fox y McSweeney, 1998). Los lípidos de la leche están constituidos principalmente por triacilgliceridos (del 97 al 99 % de los lípidos totales) y el resto consiste sobre todo de fosfolípidos y esteroides, especialmente colesterol.

Los triacilgliceroides contienen, principalmente, ácidos grasos saturados (60 a 70 %). Una proporción importante es de ácidos grasos de punto de fusión

elevado (ácido palmítico, ácido esteárico), pero también de ácidos grasos de cadena corta (butírico, caproico, cáprico y caprílico). Asimismo, los triacilgliceroles contienen del 25 al 30 % de ácidos monoinsaturados, y del 2 al 5 % de ácidos poliinsaturados, siendo el ácido linoleico (LA) uno de los principales representantes (1.6 % en peso de los ácidos grasos totales) (Lindmark-Månsson, 2008). Este ácido graso esencial (Figura 1), además de estar presente en la leche, también se puede encontrar en diversos aceites vegetales. Tales como el de girasol (65 -68 %), el de soya (51-54%), el de olivo (10%), y el de maíz (58%) (Beare-Rogers *et al.*, 2001).



(Gnädig, 2002)

Figura 1. Ácido linoleico

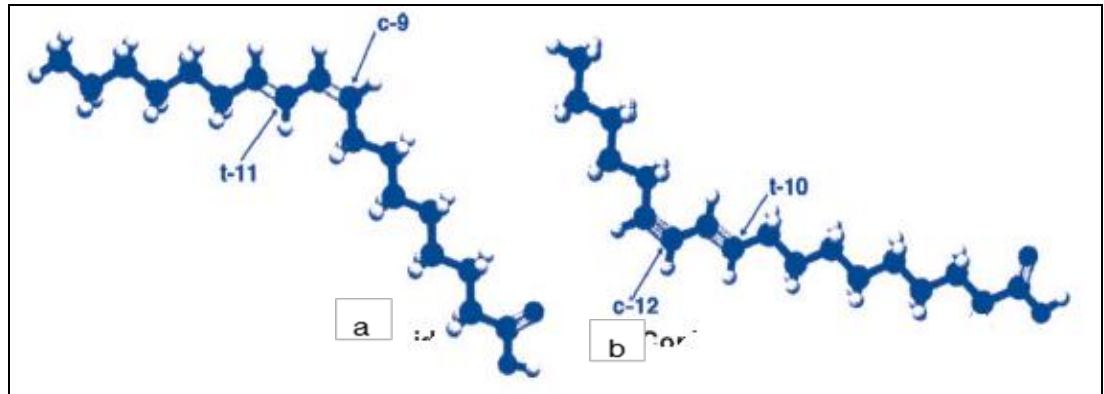
Las funciones metabólicas que aprovechan al ácido linoleico lo utilizan como precursor en la biosíntesis de los eicosanoides, hormonas tisulares que actúan mediando en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune. Además como sustrato para la síntesis endógena de CLA, ácido graso al cual se le han atribuido diversos efectos benéficos para la salud.

ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA)

A principios de los 80's Pariza y Hargraves (1985), reportaron un extracto obtenido a partir de carne de res molida cocinada a la parrilla, que mostraba una actividad antimutagénica (Gnädig, 2002), y anticarcinogénica en animales de laboratorio (Schmid *et al.*, 2005). El responsable de dicha actividad fue identificado más tarde como ácido linoleico conjugado (CLA).

Definición

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un término utilizado para nombrar una mezcla de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico, (cis-9, cis-12-ácido octadienoico), caracterizado por presentar dos enlaces dobles (18:2). Existen un total de 28 isómeros y se encuentran en una gran variedad de alimentos, de los cuales la carne y la leche de rumiantes presentan un mayor contenido (Thiel *et al.*, 2001). Los isómeros *cis-9*, *trans-11* y *trans-10*, *cis-12* (Figura 2), se encuentran en mayor abundancia en la naturaleza, y exhiben una mayor actividad biológica (Pariza *et al.*, 2001; Rocha-Uribe y Hernández, 2004; Hernández-Mendoza *et al.*, 2009; Agueda *et al.*, 2009, Rodríguez-Alcalá *et al.*, 2011).



(Gnädig, 2002)

Figura 2. a) isómeros *cis-9:trans-11*, b) isómero *trans-10:cis-12*

Fuente natural de CLA

La principal fuente de CLA proviene de los productos cárnicos y lácteos (Tabla 1), así como de ciertos vegetales y productos marinos (Adamczak *et al.*, 2008).

Tabla 1. Fuente de CLA en alimentos

Alimento	CLA (mg/g grasa)	(%) isómero c-9:t-11
Carne		
Carne picada	4.3	85
Ternera	2.7	84
Cordero	5.6	92
Carne de cerdo	0.6	82
Aves		
Pollo	0.9	84
Pavo fresco	2.5	76
Productos marinos		
Salmón	0.3	n.d.
Trucha de lago	0.5	n.d.
Camarón	0.6	n.d.
Productos lácteos		
Leche homogenizada	5.5	92
Mantequilla	4.7	88
Crema agria	4.6	90
Yogurt	4.8	84
Helado	3.6	86
Queso cheddar	3.6	93
Queso mozzarella	4.9	95
Queso cottage	4.5	83
Queso suizo reducido en grasa	6.7	90
Queso amarillo	5	92
Aceites vegetales		
Cártamo	0.7	44
Girasol	0.4	38
Canola	0.5	44
Maíz	0.2	39

n.d.= no determinado (National Cattlemen's Beef Association, 2007)

La ingesta de CLA en la alimentación de los humanos es muy variada. Se ha reportado que adultos en los E.U. ingieren alrededor de 0.2 g/día,

mientras que en otros países como Alemania, ingieren aproximadamente 0.4 g/día. En Canadá, el consumo promedio del isómero *cis-9:trans-11* CLA es entre 0.02-0.17 g/día (National Cattlemen's Beef Association, 2007). Se ha sugerido que la dosis diaria para obtener un efecto protector del CLA es de 3.5 g. CLA/día para una persona de 70 Kg (Huesca-Toral *et al.*, 2005).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL CLA

Desde el descubrimiento del CLA, éste ha sido objeto de diversos estudios en modelos animales confirmando un efecto benéfico significativo, aunque los ensayos clínicos realizados en humanos no han dado resultados tan concluyentes. Algunos de los efectos benéficos reportados, se citan a continuación:

Actividad antioxidante

Los antioxidantes son conocidos por poseer actividad contra la acción de radicales libres. Experimentos *in vitro* han demostrado que el CLA presenta una elevada actividad antioxidante, y puede proteger la membrana celular contra la acción de radicales libres así como inhibir la formación benzo(a)-pireno inducido en ratones (Adamczak *et al.*, 2008).

Actividad anticarcinogénica

La actividad anticarcinogénica del CLA ha sido confirmada por diferentes estudios; sin embargo, los mecanismos por los cuales se lleva a cabo este efecto, aún no han sido bien establecidos. Se ha reportado que dicho efecto

podría estar ligado a su capacidad antioxidante, protegiendo contra radicales libres a la membrana celular, a la capacidad para modular la vía de transducción en el ciclo de replicación celular, y/o la inhibición de la síntesis de nucleótidos y proteínas en células cancerígenas (Haugen, *et al.*, 2003; Pariza, y Yeong, 1990). Otra teoría que se ha postulado, es la modulación de las células del sistema inmune, ya que afectan la actividad de los linfocitos y los macrófagos (Adamczak *et al.*, 2008).

Modificación en el metabolismo de los lípidos

El efecto del CLA sobre el perfil lipídico de los animales ha sido extensamente estudiado; sin embargo, los ensayos de intervención en humanos son ambiguos, y presentan discrepancias y resultados controversiales (Agueda *et al.*, 2009). Estudios han demostrado que el CLA reduce la grasa corporal debido al aumento de la apoptosis de los adipocitos. Así mismo, que está relacionado con la reducción del colesterol HDL (Haugen *et al.*, 2003), el contenido de triacilgliceroles y la actividad de lipasas lipoproteicas (Gnädig, 2002). Causando un incremento de los ácidos grasos insaturados y una reducción en los ácidos grasos saturados (Lo Fiego *et al.*, 2005).

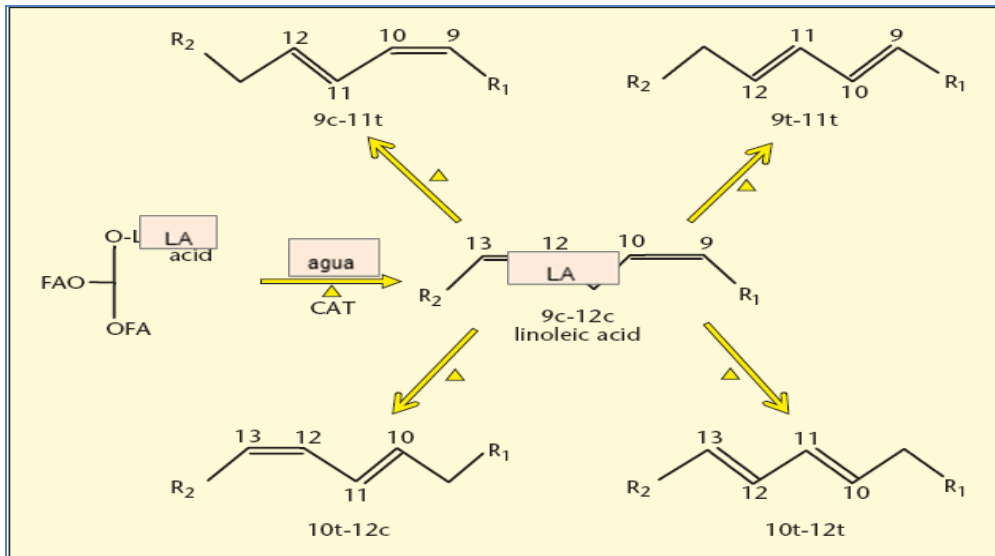
Por sus efectos benéficos en la salud, se ha considerado al CLA como una alternativa para la protección contra enfermedades crónicas, y la prevención de enfermedades cancerígenas. Sin embargo, el contenido de CLA presente en los alimentos está por debajo de los niveles necesarios para obtener dichos efectos benéficos. Por lo que han surgido diferentes estrategias para producir suplementos de CLA o alimentos adicionados o enriquecidos. Algunas de estas estrategias se citan a continuación.

SÍNTESIS DE CLA

Las estrategias para la obtención de CLA (Coakley *et al.*, 2003; Hernández-Mendoza *et al.*, 2009) se pueden agrupar principalmente en métodos químicos y bioquímicos.

Métodos químicos

El CLA puede ser sintetizado a gran escala por métodos químicos, ya sea por una isomerización de aceite rico en linoleato (Figura 3), usando catalizadores alcalinos, o por deshidratación de aceite rico en ácido ricinoleico, usando un catalizador ácido (Adamczak *et al.*, 2008). Los productos de esta reacción, difieren usualmente en composición, y en sus propiedades físicas. Una desventaja de la preparación química del CLA es que la reacción es una mezcla de diferentes isómeros (Hernández-Mendoza *et al.*, 2009).

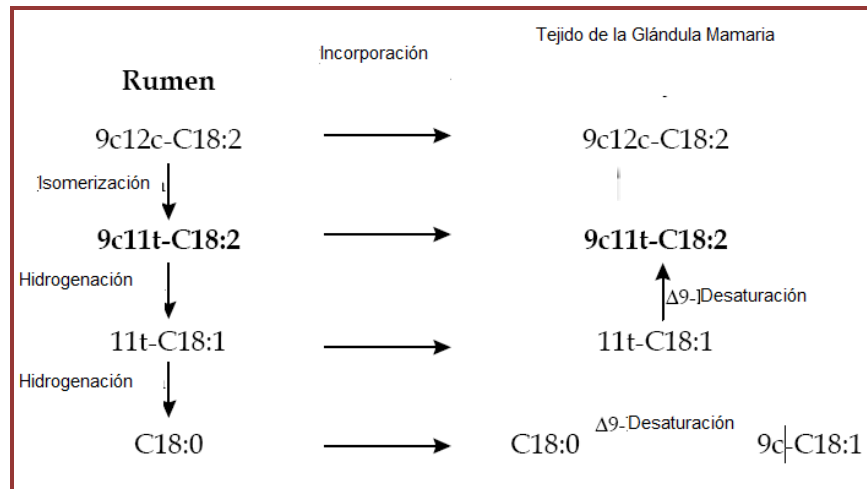


(Adamczak *et al.*, 2008)

Figura 3. Rutas para la síntesis del CLA

Métodos bioquímicos

La biosíntesis del CLA ocurre de manera natural en el estómago de los rumiantes como parte de su biohidrogenación (Figura 4), a través de bacterias ruminales tales como *Butirivibrio fibrisolvens* y *Megasphaera elsdenii* (Rodríguez-Alcalá *et al.* 2011). Durante este proceso se producen principalmente los isómeros cis-9, trans-11 (Haugen *et al.*, 2003).



(Gnädig, 2002)

Figura 4. Vía para la biosíntesis del CLA (9-cis, 11-trans – C18:2)

El hecho de que parte del CLA sea producido en el rumen por la bacteria *Butirivibrio fibrisolvens*, ha generado la expectativa de que otras bacterias, puedan producir CLA. Por lo que diferentes estudios han reportado la capacidad diversa de bacterias ácido lácticas (BAL) empleadas en la industria alimentaria para producir CLA a partir de ácido linoleico libre (Conte-Junior y Soncin, 2007).

Por otra parte diversos estudios indican que la incorporación de BAL, principalmente cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Lactococcus*, podría causar ligeros incrementos en la concentración de CLA de leches fermentadas (Lin *et al.*, 1999; Kishino *et al.*, 2002; Coakley *et al.*, 2003).

BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Este grupo de bacterias tienen la capacidad de crecer en una amplia variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas, por lo cual comprenden una amplia gama de géneros y especies, dentro de las más importantes se encuentran *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* (Klein *et al.*, 1998).

La capacidad para producir ácido láctico es probablemente una de las propiedades más importantes de las BAL (Ballesteros *et al.*, 2006). Es indispensable considerarlas, ya que juegan un papel importante en los procesos de fermentación de una amplia variedad de alimentos, particularmente en los productos lácteos (Palacios *et al.*, 2004).

Según su morfología se clasifican en cocos y bacilos, y de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento, se clasifican en mesofílicos (20-30⁰C) y termofílicos (35-45⁰C). Estas comprenden varios géneros, y las utilizadas como iniciadoras en productos lácteos, pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, (Walstra *et al.*, 1999).

Heredia (2011) aisló 144 cepas de BAL en diferentes etapas del proceso de elaboración del queso cocido de Sonora (leche, queso, cuajada y suero). Dichas BAL fueron identificadas mediante su perfil bioquímico utilizando un kit comercial BBL CRYSTAL™ ANR (Becton Dickinson NJ, USA) para bacterias anaerobias, y por técnicas moleculares, de las cuales 18 cepas pertenecen al género *Lactobacillus*, 30 a *Lactococcus* y 30 al género *Streptococcus*.

Así mismo, se probó el potencial probiótico de 13 de las BAL, las cuales se enlistan en la Tabla 2 (Santiago, 2011).

Tabla 2. BAL con potencial probiótico aisladas de queso Cocido

Microorganismo
<i>Pp. propionicum</i>
<i>Bifidobacterium</i>
<i>Lb. acidophilus</i> 1
<i>Lb. casei</i> 1
<i>Lb. acidophilus</i> 2
<i>Lb. johnsonii</i>
<i>Lb. casei</i> 2
<i>Lb. casei</i> 3
<i>Lb. acidophilus</i> 3
<i>Lb. rhamnosus</i>
<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. acidophilus</i> 4
<i>Lb. acidophilus</i> 5

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero (González-Martínez *et al.*, 2003). Elie Metchnikoff afirmó, que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles”

La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos que contienen bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*

(FAO 2006), por los efectos benéficos adicionales a los nutritivos, estos alimentos se consideran en el grupo de los alimentos funcionales.

Por otra parte en el 2008 Gutiérrez-Méndez, aisló BAL del género *Lactococcus*, de diferentes nichos, las cuales mostraron tener actividad inhibitoria con cepas indicadoras (Paz, 2010), capacidad productora de aroma en queso fresco (Reyes, 2010), actividad autolítica (Rivera, 2010), capacidad proteolítica y producción de péptidos bioactivos (Rodríguez, 2008) (Tabla 3)

Tabla 3. *Lactococcus lactis* aislados de diferentes fuentes

Fuente de aislamiento		Código de cepa
Vegetal	Betabel	B7
Lácteos	Suero de queso Chihuahua	R7
	Queso Chihuahua	Q1, Q2, Q5

Por otro lado también se han estudiado BAL productoras de CLA Bisig *et al.*, (2007) presentan una recopilación de cepas bacterianas seleccionadas bajo condiciones controladas de laboratorio, empleando medios o sistemas modelo en la producción de CLA (Tabla 4).

Tabla 4. Producción de CLA (mg.L-1) por BAL empleando diferentes sustratos

Bacteria	Especie	reacción/ sustrato	c9: t11	t10:c12	Producción de CLA (Mg L-1)	Conversión de LA a
						CLA (%)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>	c/LA	46	34	3.5	
	<i>angulatum</i>	c/LA	50	50	1.2	
	<i>bifidum</i>	c/LA	100		1	
	<i>breve</i>	c/LA	91		398	65
	<i>dentium</i>	c/LA	78	1	160	
	<i>infantis</i>	c/LA	74	7	24.6	
	<i>lactis</i>	c/LA	90	2	170	
	<i>pseudocatenulatum</i>	c/LA	72	9	23.3	
	<i>breve</i>	c/LA	96		160	78
	<i>pseudocatenulatum</i>	c/LA	93		135	69
	<i>breve</i>	c/LA			350	56.5
<i>Butirivibrio</i>	<i>fibrisolvens</i>	c/LA	95		220	
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	r/LA	85	10	131	
	<i>casei</i>	c/LA	85	12	111	
	<i>reuteri</i>	r/LA	59	41	300	
	<i>acidophilus</i>	r/LA	67		4,900	
	<i>plantarum</i>	r/LA	38		40,000	
	<i>plantarum</i>	r/RA	21		2,400	
	<i>plantarum</i>	r/CO	26		2,700	
	<i>acidophilus</i> 74-2	ch/hSO	48	52	0.94d	
	<i>delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	r/LA	15	27	41.8	
	<i>delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	r/LAj	56	2	208	
	<i>rhamnosus</i>	ch/hSO	58	42	1.68d	
<i>Megaspaera</i>	<i>elsdenii</i>	c/LA	15	85	7c	
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	c/SF			11d	
<i>Propionibacterium</i>	<i>freudenreichii</i>	c/LA	93		265	
	<i>freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> 51	ch/hSO	85	15	1.65d	
Cultivo de BAL para Yogurt		ch/hSO	79	21	0.90d	

c) cultivado, r) reacción con células en reposo, e) extracto enzimático, LA) ácido linoleico libre, SF) aceite de girasol, RA) ácido ricinoleico, CO) aceite de ricino, d) mg g⁻¹ grasa, e) lipasa (Bisig *et al.*, 2007)

De acuerdo a los datos presentados por Bisig *et al.*(2007), *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Megasphaera*, *Butirivibrio* y *Lactobacillus*, son BAL que producen mayor CLA utilizando como sustrato LA. Sin embargo, cada género tiene la capacidad de producir CLA total y sus isómeros, en mayor o menor cantidad.

INCREMENTO DE CLA EN PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

Diversos estudios se han realizado para evaluar los factores que afectan el contenido de CLA en la leche y derivados lácteos, dada la creciente popularidad que han alcanzado los alimentos funcionales en los últimos años. La influencia del procesamiento de la leche en la concentración de CLA de los productos derivados, ha sido objeto de una gran variedad de trabajos.

La composición general de los productos lácteos producidos por la adición de bacterias iniciadoras, está determinada principalmente por la composición de leche inicial (Salamon *et al.*, 2009). Además de forma particular, el procesamiento y los métodos de producción contribuyen a la gran variedad en el contenido de CLA.

La fermentación microbiana a través de las reacciones de biohidrogenación catalizadas por las isomerasas y reductasas contribuye al incremento de CLA durante la producción de diferentes productos tales como

quesos madurados y mantequillas. En este aspecto diferentes estudios han sido realizados para determinar la capacidad de las BAL de incrementar el contenido de CLA en productos lácteos empleando diferentes sustratos. En la Tabla 5 se presentan algunos de los productos que han sido empleados como matriz alimentaria para llevar a cabo la biotransformación de LA a CLA

Tabla 5. Producción de CLA en productos lácteos

Producto	Bacteria	Sustrato	Producción de CLA
Mantequilla	<i>Lactococcus lactis</i>	-	n.d.
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	n.d.
Leche desnatada	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ATCC 6702	ácido linoleico libre	Incrementó
	<i>Propionibacterium freudenreichii propioni-6</i>	ácido linoleico libre	Incrementó
	<i>Lactococcus lactis</i>	aceite de girasol	n.d.
Leche descremada	<i>Lactococcus lactis</i> 1-01	aceite de girasol	Incrementó
	<i>Propionibacterium freudenreichii shermanii-56</i>	aceite de girasol	n.d.
	<i>Lactococcus rhamnosus</i>	aceite de soya	Incrementó
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	aceite de soya	Incrementó
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ácido linoleico	incrementó c-9:t-11
Leche fermentada	<i>Lb. Delbrueckii ssp. Bulgaricus</i>	ácido linoleico	incrementó c-9:t-11
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ácido linoleico	incrementó c-9:t-11
Cultivos iniciadores	<i>Propionibacterium freudenreichii shermanii-56</i>	aceite de soya	Incrementó
	<i>Propionibacterium freudenreichii shermanii-51</i>	aceite de soya	Incrementó
	<i>Propionibacterium freudenreichii shermanii-23</i>	aceite de soya	Incrementó

n.d.= no detectado

(Bisig *et al.*, 2007)

Los resultados reportados aún presentan gran controversia, y sugieren que la concentración de CLA en los productos lácteos, depende principalmente de la concentración de estos isómeros en la leche, y de las reacciones que tomen lugar durante los procesos de transformación. (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Actualmente los consumidores no sólo demandan alimentos que cumplan con los requerimientos de una buena calidad nutricional y sensorial, sino incluso que sean reconocidos como benéficos para la salud. En este contexto la industria alimentaria se ha visto en la necesidad de ofrecer alimentos funcionales que además de nutrir, puedan aportar beneficios para la salud del hombre y mejorar su calidad de vida. Por lo que los productos lácteos fermentados enriquecidos con ácido linoleico conjugado podrían resultar benéficos a la salud de los consumidores, sobre todo en personas propensas a padecer diferentes enfermedades.

HIPÓTESIS

La producción de los isómeros *cis-9:trans-11* y *trans-10:cis-12* de CLA durante la fermentación en leche depende de las cepas específicas de BAL utilizadas y de la concentración de aceite de girasol adicionada.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la capacidad productora de CLA de cepas específicas de BAL a través de la bioconversión de ácido linoleico en leche adicionada con aceite de girasol.

Objetivos particulares

Determinar la producción de CLA de cepas específicas de BAL en leche adicionada con aceite de girasol.

Comparar la producción de los isómeros *cis-9:trans-11* y *trans-10:cis-12*, del CLA de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* y *Propionobacteria* en leche adicionada con aceite de girasol.

Comparar la producción de CLA de cepas específicas de BAL en leche adicionada con diferentes concentraciones de aceite de girasol.

Evaluar la producción de los isómeros *cis-9:trans-11*, y el *trans-10:cis-12* de cepas específicas de *Lactococcus* y *Lactobacillus* en la presencia de un cultivo iniciador para yogurt.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivación de Bacterias Ácido Lácticas

Las cepas de BAL fueron obtenidas de una del laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos y Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. de Hermosillo, Sonora, México (Tabla 4 y 5). Así *Lb. reuteri* fue una cepa fue donada por la UNIDA del Instituto Tecnológico de Veracruz. El cultivo iniciador para yogurt empleado fue del Centro Sperimentale del Latte (Zelo Buon Persico LO Italy).

Para la reactivación de las cepas se siguió la metodología reportada por Hernández-Mendoza *et al.* (2009). Para las cepas del género *Lactobacillus*, se tomó una alícuota de cada cultivo que se encontraba en glicerol a -80°C y se inoculó en medio MRS (Difco TM) al 1%. Estas fueron incubadas a 37°C por 14 horas en condiciones de anaerobiosis. De igual forma, pero partiendo de este nuevo cultivo se realizaron dos reactivaciones más antes de usar las cepas y fueron incubados por 12 y 8 h, respectivamente.

Para el caso de la reactivación de las cepas de *Lactococcus lactis* se realizó de la misma forma, pero se llevó a cabo en medio M17 (Difco TM), enriquecido con 5 % (v/v) de una solución estéril de lactosa al 10 % (p/v). Éstas fueron incubadas a 30°C por 18, 14 y 12 horas para cada reactivación.

Por otra parte, para el cultivo iniciador (CI), éste se reactivó en leche por un lapso de 24 horas.

Acondicionamiento

Después del proceso de reactivación de las cepas, se les dio un tiempo de acondicionamiento en leche. Para la preparación de las muestras se utilizó leche descremada en polvo (Organic Valley® USDA Organic Grade A, La Farge, WI, EUA). La leche se reconstituyó al 10% (p/v) y se esterilizó a 110 °C por 10 min. Posteriormente, se tomó una alícuota y se inoculó en la leche al 1 % y se incubó por 24 horas (Rodríguez-Alcalá *et al.*, 2011) a 37 °C y 30 °C para los *Lactobacillus* y *Lactococcus*, respectivamente hasta alcanzar una densidad de población de 10⁷-10⁸ UFC/ mL. La densidad de población (UFC/mL) se determinó por conteo en placa mediante siembra en superficie.

Preparación de muestras

Fermentación de la leche adicionada con aceite de girasol por BAL

Posterior al acondicionamiento de las BAL en leche, se tomó una alícuota de este cultivo y se inoculó (3%) en leche descremada en polvo reconstituida al 10%. Previo a la inoculación, la leche fue suplementada con aceite de girasol al 0.1% (v/v) y tween al 1% (v/v) como emulsificante y se esterilizó a 110 °C/10 min. Una vez que se llevó a cabo la inoculación, las leches fueron incubadas a 30 y 37 °C para *Lactococcus* y *Lactobacillus*, respectivamente por 16 h.

Para el estudio del efecto de la concentración del aceite de girasol, éste fue añadido a la leche al 0.1, 1 y 2 % y las muestras fueron fermentadas por *Lb. johnsoni* o *reuteri* e incubadas for 16 h.

Para el estudio del efecto de la inclusión del cultivo iniciador (CI) de yogurt además de *Lb. jonnnsoni*, *Lb. reuteri* o *L. lactis* Q5, se tomó una alícuota (3 %) de este cultivo y se inoculó en leche e incubó por 8 h.

Determinación de CLA por cromatografía de gases

Extracción de la grasa

Para la extracción de grasa se tomaron 2mL de la leche fermentada y 20 mL de una solución Cloroformo-metanol (2:1), y se agitaron por un lapso de 1 min. Posteriormente, se adicionaron 4 mL de KCl (0.88%), se agitó nuevamente y se dejó reposar hasta observar una separación de 2 capas. Se tomó la fase orgánica y se colocó en un tubo previamente pesado, se prosiguió a secar el solvente con nitrógeno para finalmente pesar la muestra con el tubo y obtener el peso de la muestra por diferencia. Posteriormente se llevó a cabo la metilación de la grasa dentro del mismo tubo como se indica a continuación.

Metilación de la grasa

Después de haber extraído la grasa de la muestra, se procedió a metilarla conforme a la metodología reportada por Park y Goins (1994). A la muestra contenida en el tubo, se le adicionaron 100µL de diclorometano y 1mL de NaOH 0.5 N en metanol. El oxígeno fue removido a través de una corriente de gas nitrógeno, se cerró el tubo y se llevó a una temperatura de 90 °C por un lapso de 10 minutos en baño maría. Transcurrido este tiempo las muestras fueron removidas del baño, y llevadas a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 1mL de Trifloruro de Boro (BF₃), se pasó una corriente de gas nitrógeno y se calentó nuevamente a 90 °C por 10 minutos. Finalmente, se adicionó 0.5 mL de hexano (grado HPLC a 99%) y 1 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente durante un minuto y una vez separada la muestra en dos fases, se tomó la capa superior con una pipeta pasteur y fue transferida a un vial ámbar con un inserto de 250 µL para realizar los análisis en cromatografía de gases.

Cuantificación de CLA por cromatografía de gases

Para la determinación de CLA se utilizó un cromatógrafo de gases (CG) (Hewlett Packard serie, Wilmington, DE), con un detector de ionización de flama (FID). Se usó una columna capilar SPTM-2560 (100m x 0.25mm x 0.2 µm). El Helio fue utilizado como gas acarreador con un flujo de 1mL min⁻¹. La rampa de temperatura del horno para el análisis de GC fue de 150 °C a 225 °C, con un incremento de temperatura de 20 °C min⁻¹. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 220 °C. El CLA fue identificado por medio de los tiempos de retención de estándares de referencia de alta pureza (*cis*-9:*trans* 11 y *trans*-10:*cis*-12) (Sigma, USA), los cuales fueron disueltos en hexano y metilados siguiendo el procedimiento antes mencionado.

Las concentraciones de los isómeros del CLA de las muestras se calcularon a partir curvas de calibración elaborada para la mezcla de estándares analíticos de los dos isómeros y para cada uno de ellos por separado. Las concentraciones iniciales para las soluciones iniciales fueron: 1.7 mg/ mL para el isómero *cis*-9:*trans*-11 y 1.55 mg/ mL para el isómero *trans*-10:*cis*-12 en hexano. De estas soluciones iniciales se derivaron diluciones para elaborar las siguientes concentraciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 5 se muestra un cromatograma típico de los isómeros *cis*-9:*trans*-11 y *trans*-10:*cis*-12 del CLA. Los picos que se muestran corresponden al estándar interno, que es el ácido mirístico con un tiempo de retención de 21.739 min. Por otra parte, los picos en los tiempos de retención 48.354 y 49.705 minutos, corresponden a los dos isómeros de CLA. Una buena separación de los dos isómeros de los estándares analíticos de CLA fue crucial para poder identificarlos en las muestras bajo estudio.

En la Figura 6 se muestra el perfil de ácidos grasos típico de una muestra de leche fermentada con *Lactobacillus johnsonii*. Se pudo observar una buena separación de los dos isómeros de CLA producidos por esta BAL, además de los ácidos oleico y linoleico provenientes de la leche adicionada con aceite de girasol y el emulsificante.

La curva de calibración ($y = 0.0009x + 0.0467$, $R^2=0.9979$) para la cuantificación de CLA total se presenta en la Figura 7. La “x” corresponde a la suma de las áreas de los dos picos de los isómeros y la “y” corresponde a los mg de CLA/ mL. Además se generaron curvas de calibración para cada isómero, $y = 0.0008x+0.0203$, $R^2 = 0.9983$ para el isómero *cis*-9:*trans*-11 y $y = 0.001x + 0.0279$, $R^2 = 0.9971$ para el isómero *trans*-10:*cis*-12.

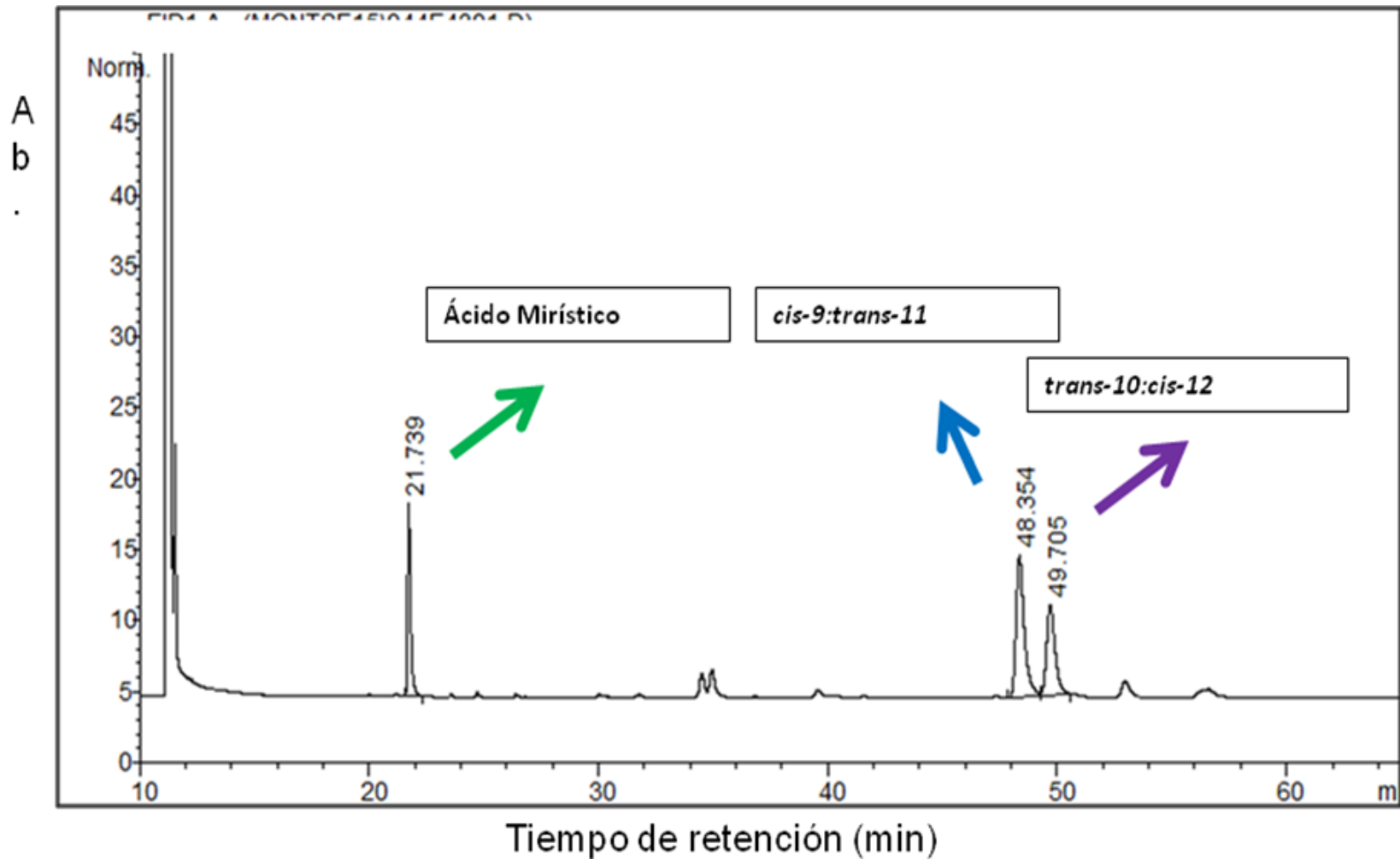


Figura 5. Cromatograma típico de los isómeros *cis-9:trans-11* y *trans-10:cis-12* del CLA.

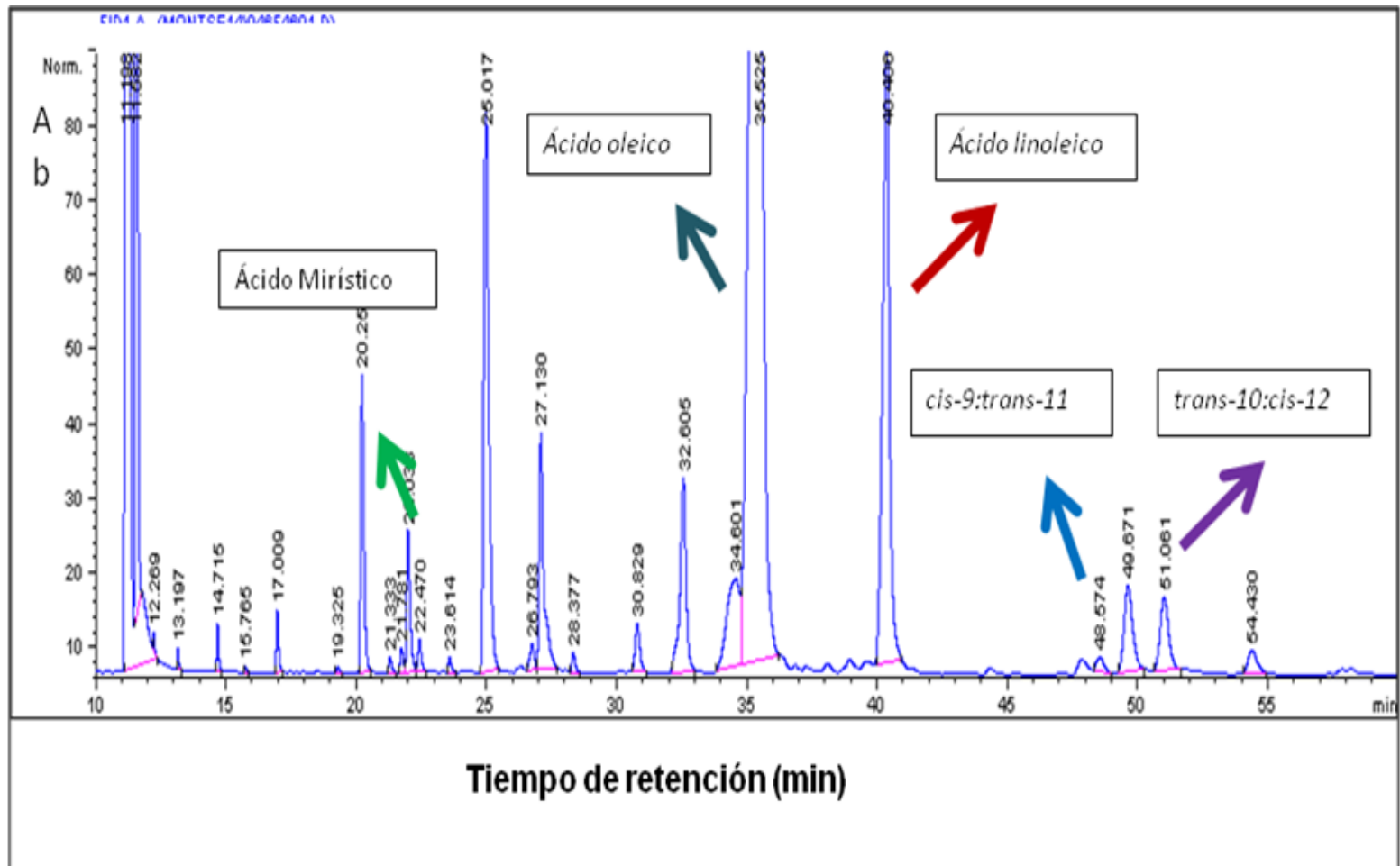


Figura 6. Cromatograma típico del perfil de ácidos grasos de leche fermentada con *Lb. johnsonii*.

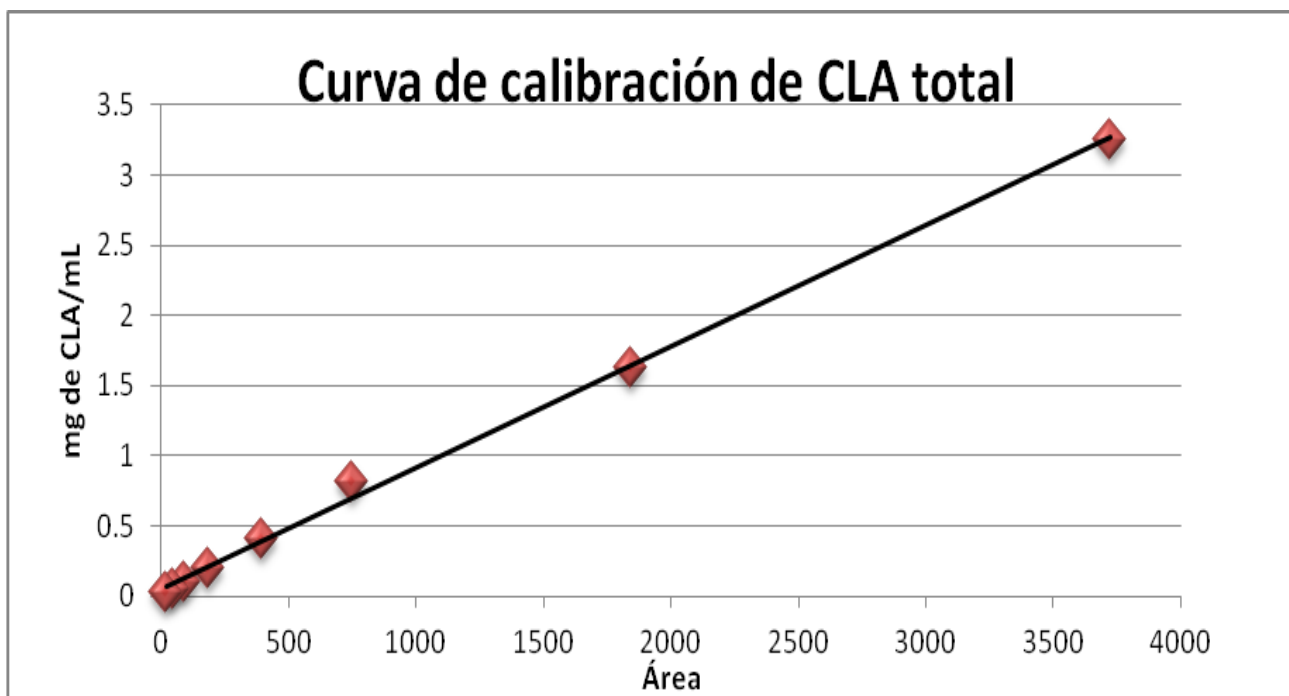


Figura 7. Curva de calibración de ácido linoleico conjugado (CLA) total.

Las concentraciones de CLA total encontradas en las muestras de leche fermentadas, con 19 diferentes cepas de BAL se presentan en la Figura 8. Se pudo observar que la producción de CLA dependió de la BAL utilizada en la fermentación. *Lactobacillus johnsonii*, fue la BAL que presentó una mayor producción de CLA (6.45 ± 0.65 mg/g grasa) y fue significativamente ($p \leq 0.05$) diferente del CLA producido por el resto de las BAL. En contraste, *Lactobacillus acidophilus* 2 y *Lactococcus lactis* R7 no produjeron concentraciones significativas de CLA

El grupo que presentó mayor producción de CLA estuvo formado por *Lactobacillus acidophilus* 5, (4.35 ± 0.55 , mg/g grasa), *Lactococcus lactis* Q1 (3.92 ± 0.14 mg/g grasa), *Lactobacillus casei* 2 (3.88 ± 0.37 mg/g grasa), *Lactobacillus reuteri* (3.76 ± 0.39 mg/g grasa), y *Lactococcus lactis* Q5 (3.31 ± 0.04 mg/g grasa). La producción de CLA de las cepas de este grupo no mostró diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre ellas.

El siguiente grupo con mayor concentración de CLA que no presentó diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre las cepas, estuvo formado por *Bifidobacterium* (2.96 ± 0.38 mg/g grasa), *Lb. acidophilus* 1 (2.78 ± 0.52 mg/g grasa) y *Lc. lactis* Q2 (2.53 ± 0.0945). Por otro lado, el grupo formado por *Lb. casei* 3 (1.40 ± 0.09 mg/g grasa), *Lb. acidophilus* 4 (1.02 ± 0.11 mg/g grasa) y *L. lactis* B7 (1.40 ± 0.32 mg/g grasa), tampoco presentaron concentraciones de CLA significativamente diferentes ($p \geq 0.05$).

Finalmente, las concentraciones de CLA producidas por el grupo formado por *Propionibacterium propionicum* (0.47 ± 0.09 mg/g grasa), *Lb. fermentum* (0.52 ± 0.14 mg/g grasa), *Lb. rhamnosus* (0.60 ± 0.14 mg/g grasa), *Lb. casei* 1 (0.66 ± 0.63 mg/g grasa) y *Lb acidophilus* 3 (0.87 ± 0.14 mg/g grasa) no fueron significativamente diferentes.

Los resultados de este estudio mostraron que la producción de CLA es específica para cada cepa y es independiente del género y de la especie. Se ha reportado que la mayor o menor producción de CLA puede deberse a la actividad de la ácido linoleico isomerasa de cada una de las BAL, ya que se han identificado diferencias en la actividad de esta enzima independiente del género y especie (Sieber, 2004; Xu *et al.* 2004).

Diversos estudios se han realizado utilizando diferentes BAL, con el fin de conocer cuáles llevan a cabo la mayor producción de CLA. Rodríguez-Alcalá *et al.* (2011), reportaron concentraciones de 2.72-3.44 y 0.31-1.53 mg CLA/g grasa cuando utilizaron LA y aceite de cártamo, respectivamente, como sustrato en leche. Algunos de los grupos de BAL de este estudio tuvieron capacidades similares a los reportados por Rodríguez-Alcalá y algunas presentaron una mayor capacidad como fue el caso de *Lb. johnsonii*.

Por otro lado, Akalin *et al.* (2007), reportaron concentraciones de CLA de 4.5-8.2 mg/ g grasa en yogurt. En otro estudio *Lactococcus lactis*, produjo 8.5 mg de CLA/ g grasa, y fue la BAL que presentó una mayor producción de este ácido graso (Kim y Liu, 2002). En contraste, ninguna de las cepas de *L. lactis* de este estudio presentaron concentraciones equivalentes a las reportadas por Kim y Liu (2002).

Xu *et al.* (2004) trabajaron con 11 BAL, y reportaron que la mayor producción de CLA la presentó *Propionibacterium freudenreichii* (1.64 ± 0.78 mg/g grasa) en leche adicionada con aceite de soya hidrolizada. En este estudio se encontró menor producción de CLA por cepas del género *Propionibacterium*.

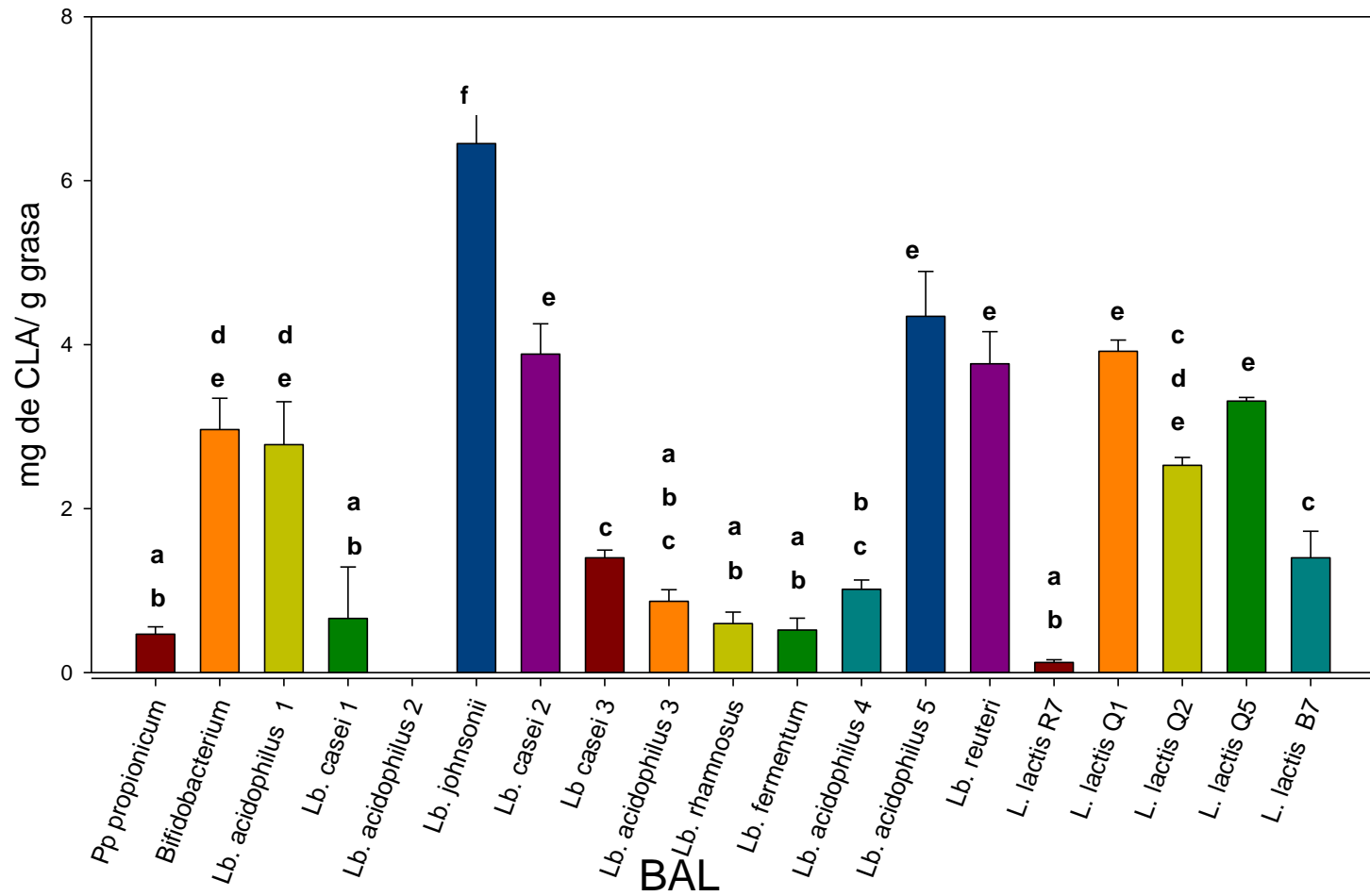


Figura 8. Producción de CLA de BAL en leche adicionada con aceite de girasol (0.1%) y 16 h de incubación.

Los dos isómeros de CLA *cis*-9:*trans*-11 (isómero 1) y *trans*-10:*cis*-12 (isómero 2), de importancia en este estudio se observan en la Figura 9. La cepa de *Lactobacillus johnsonii* tuvo la mayor producción de los dos isómeros del CLA, (3.15 ± 0.41 y 3.15 ± 0.22 mg/g grasa) y no hubo diferencias significativas entre ambos ($p \geq 0.5$).

Lactobacillus reuteri presentó una mayor producción del isómero 2, (2.18 ± 0.34 mg/g grasa que del isómero 1 (1.51 ± 0.24 mg/g grasa); así mismo, éste no fue diferente a los dos isómeros de *Bifidobacterium* (1.30 ± 0.023 y 1.59 ± 0.41 mg/g grasa).

Pocos estudios se han realizado utilizando aceites vegetales en matrices alimentarias para probar la producción de CLA por *Bifidobacterium*, Xu *et al.*, (2004), reportó una producción de 0.46 ± 0.15 y 0.20 ± 0.14 mg/g grasa para los isómeros 1 y 2 respectivamente, utilizando aceite de soya hidrolizada. Además Rodríguez-Alcalá (2011), encontraron 0.02229 mg de CLA/mL de leche utilizando aceite de cártamo. En contraste, la cepa de *Bifidobacterium* reportada en este estudio presentó una mayor producción de ambos isómeros de CLA. Estas diferencias podrían atribuirse a la cepa bajo estudio; sin embargo, otro factor importante podría ser el aceite utilizado.

Por otra parte, la cepa de *Propionibacterium* de este estudio, produjo sólo el isómero 2 (0.48 ± 0.1 mg/g grasa), no encontrándose diferencias significativa ($p \geq 0.5$), con los isómeros 1 y 2 de *Lactobacillus rhamnosus* (0.12 ± 0.01 y 0.31 ± 0.11 mg/g grasa) y *Lactobacillus fermentum* (0.04 ± 0.00 y 0.42 ± 0.06 mg/g grasa).

Xu *et al.* (2004), cuantificaron la producción de CLA de diferentes cepas de *Propionibacterium* mostrando una producción de los dos isómeros 1 y 2; sin embargo, el isómero cuantificado en este estudio fue mayor.

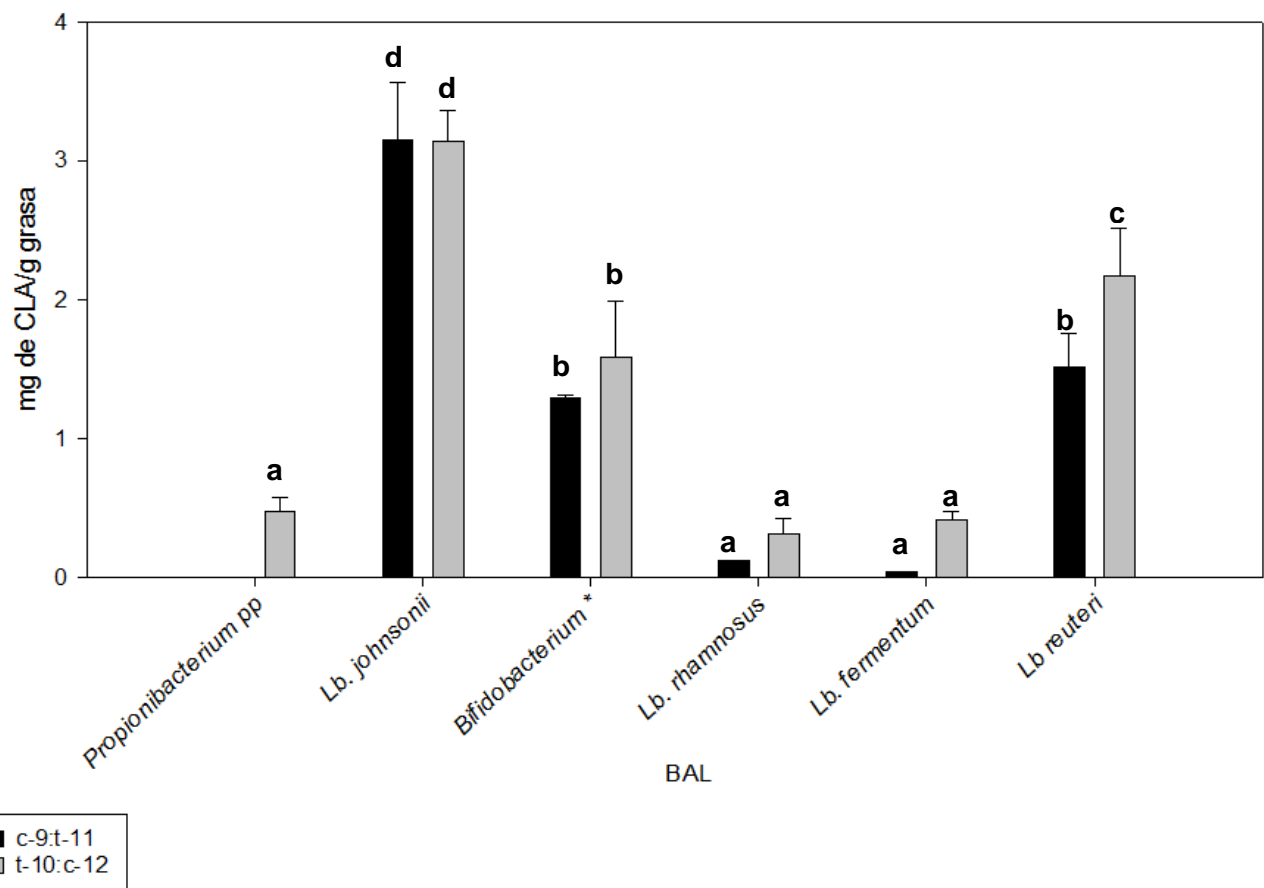


Figura 9. Producción de los isómeros *cis-9:trans-11* y *trans-10:cis-12* por *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* en leche adicionada con aceite de girasol (0.1%) y 16 h de incubación.

La Figura 10 muestra la producción de los isómeros 1 y 2 por cepas de *L. lactis*. Se observó que la cepa de *L. lactis* Q1 presentó la mayor producción de los dos isómeros 1 y 2 (1.66 ± 0.05 y 2.19 ± 0.12 mg/g grasa) de este grupo. En contraste *L. lactis* R7 el cual no produjo el isómero 1. *L. lactis* Q5 produjo el isómero 1 (1.65 ± 0.0376 mg /g grasa) y el isómero 2 y (1.49 ± 0.08 mg/g grasa) siendo este último significativamente igual ($p \geq 0.5$) a los isómeros 1 de *L. lactis* Q2 (1.29 ± 0.080). Por otra parte el isómero 2 de *L. lactis* Q2 (1.07 ± 0.02 mg/g grasa) fue significativamente igual ($p \geq 0.5$) al isómero 1 de *L. lactis* B7 (0.98 ± 0.1 mg/g grasa). Finalmente el isómero 2 de *L. lactis* B7 (0.24 ± 0.07 mg/g grasa), fue significativamente diferente al isómero 2 de *L. lactis* R7 (0.15 ± 0.02 mg/g grasa).

La producción de los isómeros de CLA por cepas de *L. lactis* de este estudio fueron menor a la reportada por Kim y Liu (2002), en el cual tuvieron una producción de 11 mg de CLA/g grasa. Sin embargo, son muchas las variables que difieren con este estudio. Ambos en ambos estudios utilizaron aceite de girasol como sustrato de LA, y concentraciones de 0.1g/L, en ese estudio utilizaron leche entera, y no pudieron discriminar entre los isómeros 1 y 2 y otros isómeros del CLA, por lo cual ellos reportaron la suma de 8 isómeros de CLA.

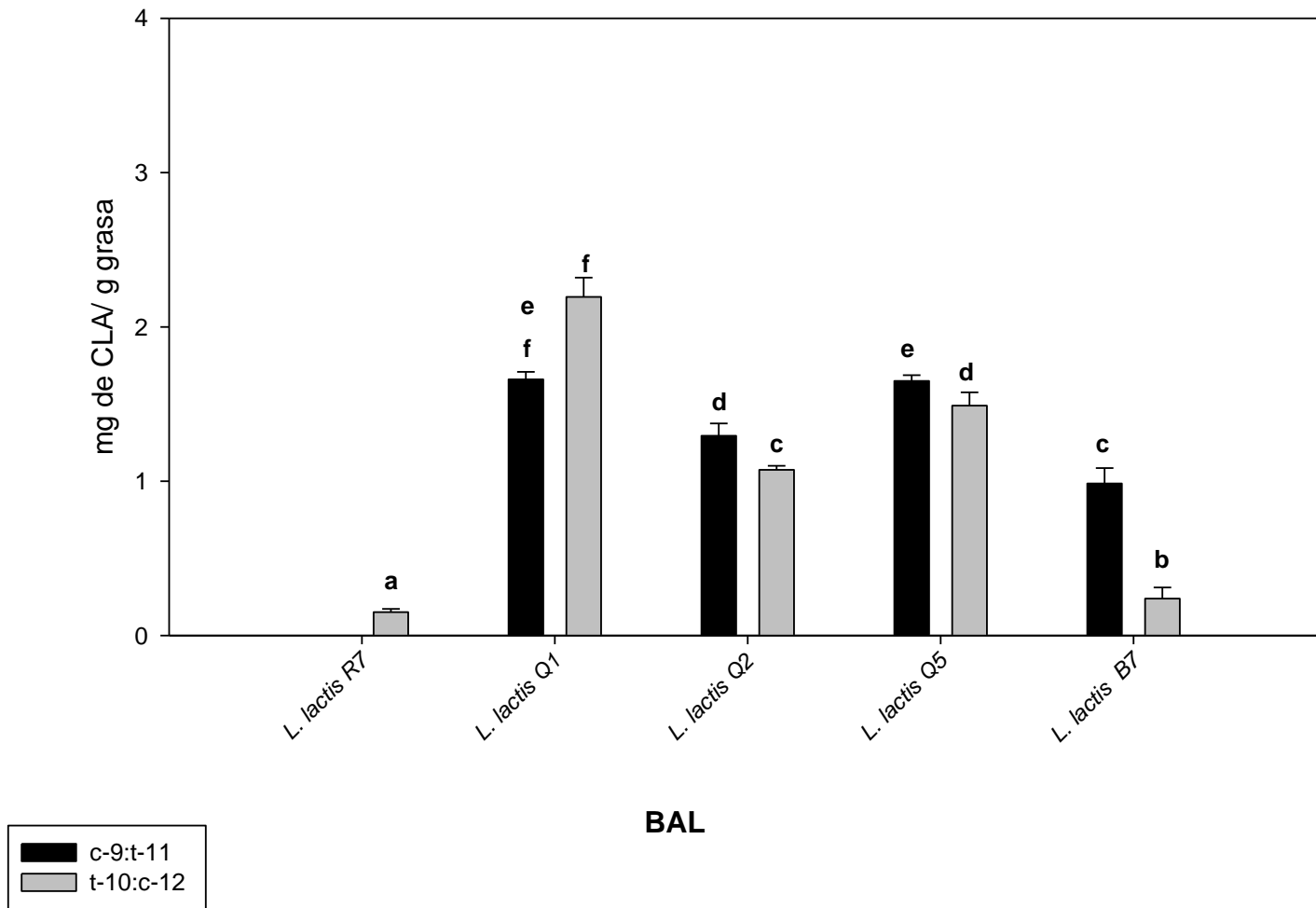


Figura 10. Producción de los isómeros *cis*-9:*trans*-11 y *trans*-10:*cis*-12 por cepas de *Lactococcus lactis* en leche adicionada con aceite de girasol (0.1%) y 16 h de incubación.

En la Figura 11 se presentan las cepas de *Lb. acidophilus* y *Lb. casei*. *Lb. acidophilus* 5, fue la que produjo una mayor cantidad de los dos isómeros 1 y 2 del CLA (2.12 ± 0.46 y 2.09 ± 0.17 mg/g grasa) y no hubo diferencia significativa ($p \geq 0.5$) con los isómeros 1 y 2 de *Lb. casei* 2, (1.80 ± 0.16 y 1.97 ± 0.21 mg/g grasa). Por otra parte *Lactobacillus acidophilus* 2 no tuvo producción de CLA.

El isómero 2 de la cepa de *Lb. acidophilus* 1 (1.40 ± 0.24 mg/g de grasa) presentó diferencias estadísticas ($p \leq 0.5$) con el isómero 1, (1.28 ± 0.27 mg/g grasa); sin embargo, este último no fue diferente del isómero 2 de *Lb. acidophilus* 3 (1.20 ± 0.41 mg/g grasa). El isómero 2 de la cepa de *Lb. casei* 3 (0.76 ± 0.03 mg/g grasa) y *Lb. casei* 1 (0.94 ± 0.41 mg/g grasa) no presentaron diferencias ($p \geq 0.5$), así mismo no hubo producción del isómero 1 para esta última.

Los isómeros 1 y 2 de la cepa *Lb. acidophilus* 4 no presentaron diferencias significativas (0.55 ± 0.17 y 0.35 ± 0.04 mg/g grasa) entre ellos y con el isómero 1 de *Lb. casei* 3 (0.57 ± 0.13 mg/g grasa) y *Lb. acidophilus* 3 (0.24 ± 0.01 mg/g grasa).

En estudios similares también encontraron BAL que no produjeron CLA (Kim y Liu, 2002; Xu, *et al.*, 2004, Rodríguez-Alcalá *et al.*, 2011) y se argumentó que puede deberse a las isomerasas, así como a la tolerancia de las BAL al aceite.

Para el caso de *Lactobacillus casei*, se encontró que la cepa 2, fue la que presentó una mayor producción de CLA (3.89 ± 0.37 mg/g grasa), seguido por la cepa 3 (1.40 ± 0.09 mg/g grasa) y la cepa 1, que sólo produjo el isómero 2 (0.66 ± 0.62 mg/g grasa). Los valores encontrados, en este estudio para *Lb. casei* estuvieron en los rangos de CLA reportados por Kim and Liu (2002), Salamon *et al.*, (2009) y Xu (2004).

La BAL que presentó una mayor producción de CLA en este estudio, fue *Lactobacillus johnsonii*, razón por la cual se utilizó para conocer si al incrementar la concentración de aceite de girasol aumentaba el contenido de CLA.

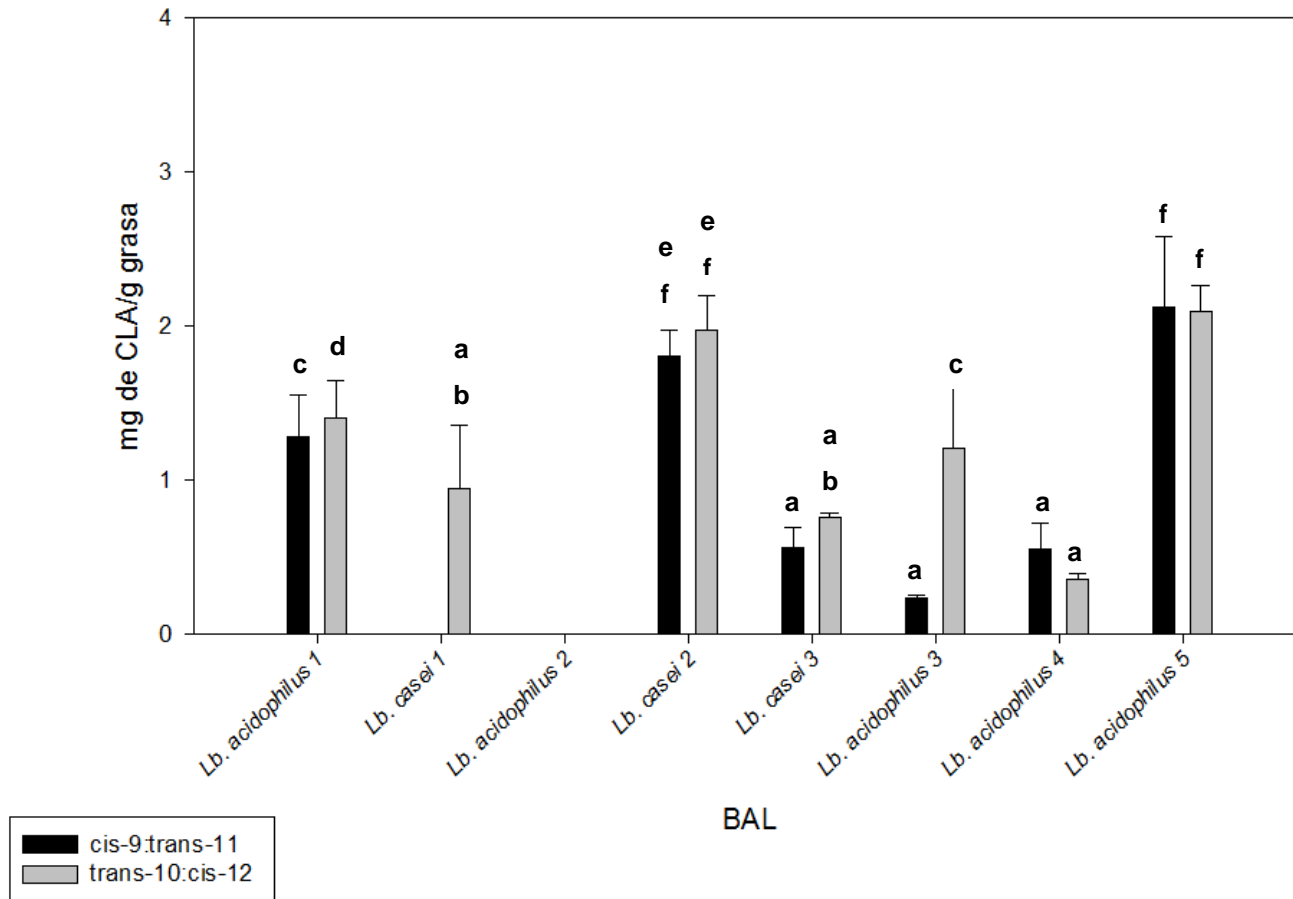


Figura 11. Producción de los isómeros *cis-9:trans-11* y *trans-10:cis-12* de cepas de *Lactobacillus* en leche adicionada con aceite de girasol (0.1%) y 16 h de incubación.

En la Figura 12 se observa que a mayor concentración de aceite de girasol, disminuye el contenido de CLA, con una producción de 6.47 ± 0.63 , 3.85 ± 0.0589 y 1.41 ± 0.14 con 0.1, 1 y 2% de aceite de girasol, respectivamente. El mismo comportamiento se observó para *Lb reuteri*, (Figura 13).

Los resultados de este estudio, coinciden con los reportados por Salamon *et al.* (2009) donde se encontró que a medida que aumentó la concentración de aceite de girasol (50-1500 $\mu\text{L}/100\text{mL}$) en leche, disminuyó la producción de CLA por cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus acidophilus*.

La disminución de la concentración de CLA al incrementar el contenido del aceite de girasol, podría deberse a la saturación de las bacterias con el aceite como lo menciona Puniya *et al.* (2009); sin embargo, no existe una explicación clara para este comportamiento

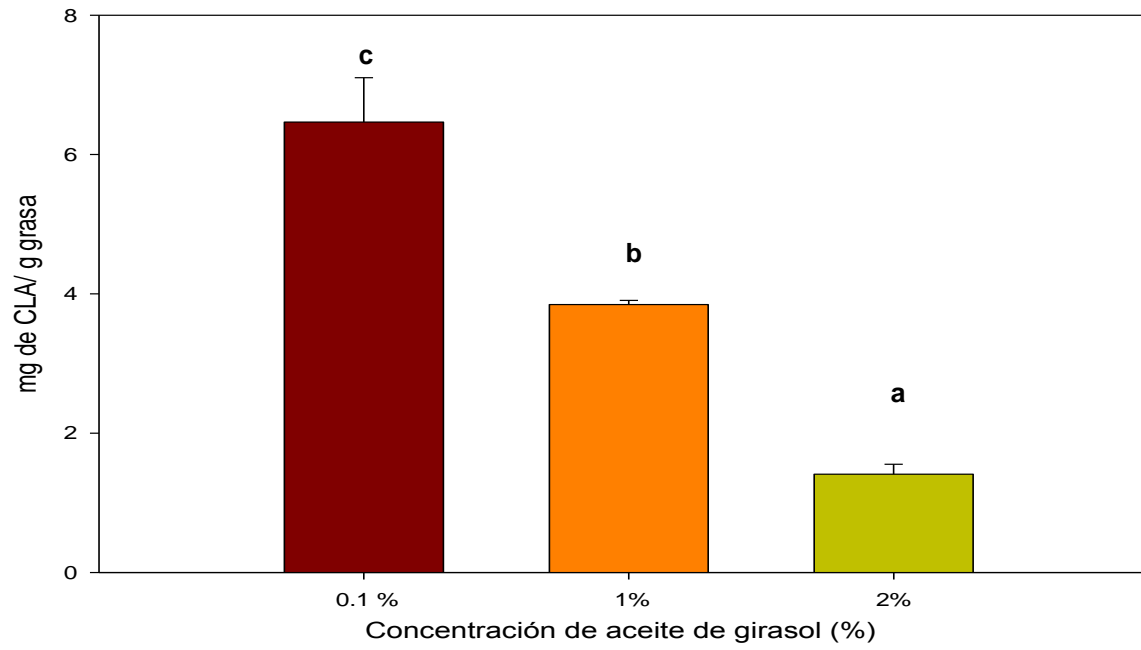


Figura 12. Producción de CLA por *Lactobacillus johnsonii* en leche con diferentes concentraciones de aceite de girasol y 16 h de incubación.

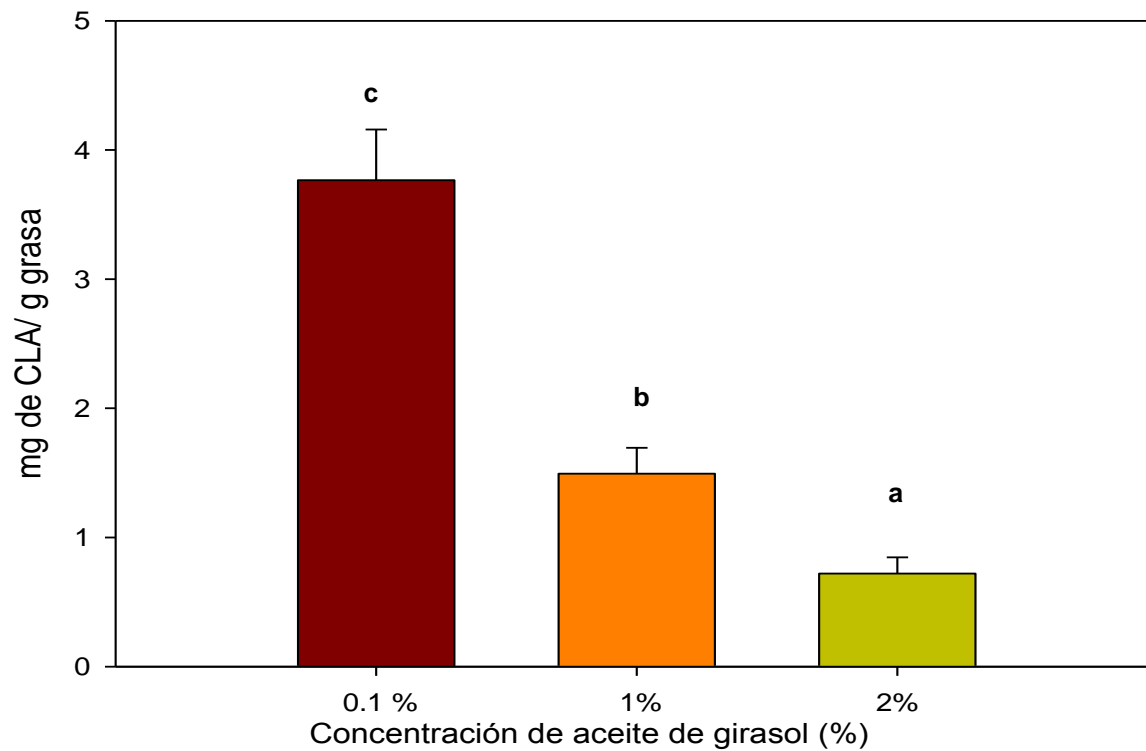


Figura 13. Producción de CLA por *Lactobacillus reuteri* en leche con diferentes concentraciones de aceite de girasol y 16 h de incubación.

Con la finalidad de estudiar el comportamiento de algunas de estas cepas en presencia de un cultivo iniciador para yogurt, se evaluó su capacidad para producir CLA. La Figura 14 muestra la producción de CLA de un cultivo iniciador para yogurt, *Lb reuteri*, *Lb johnsonii* y *L. lactis* y de las mezclas de estos con CI.

La producción de CLA por el CI fue de 5.96 ± 0.007 mg/g grasa encontrándose diferencias ($p \leq 0.5$), con las demás BAL.

La producción de CLA para cada una de las cepas bajo estudio fue significativamente ($p \leq 0.5$) mayor que la del CI. Por otro lado la presencia del CI potenció la producción de CLA para *Lb johnsonii* y *L. lactis*; sin embargo, este no fue el caso para *Lb reuteri* (Figura 17).

La mezcla de *Lb. johnsonii* y el CI, presentó la mayor producción de CLA (9.96 ± 0.02 mg/ g grasa). Además se encontraron diferencias significativa ($p \leq 0.05$) con, *L. lactis* Q5+CI (9.30 ± 0.00 mg /g grasa) y *Lb. reuteri*+CI (8.08 ± 0.23 mg/g grasa). Estas concentraciones fueron significativamente mayores a las encontradas por Akalin *et al.*, (2007), (6.01 mg/g grasa) utilizando *Bifidobacterium animalis*, CI y fructooligosacáridos.

Es importante resaltar que la producción de CLA presentada en el último experimento (Figura 14) fue obtenida a las 8 h de incubación, mientras que los primeros experimentos fueron realizados con 16 horas de incubación. La producción de CLA por *Lb. johnsonii* y *Lb reuteri* fue significativamente mayor ($p \leq 0.5$) a las 8 h de incubación (Figura 14) que a las 16 h (Figura 11). Este comportamiento podría deberse a que hubo una mayor producción de CLA en el período de crecimiento exponencial de las cepas

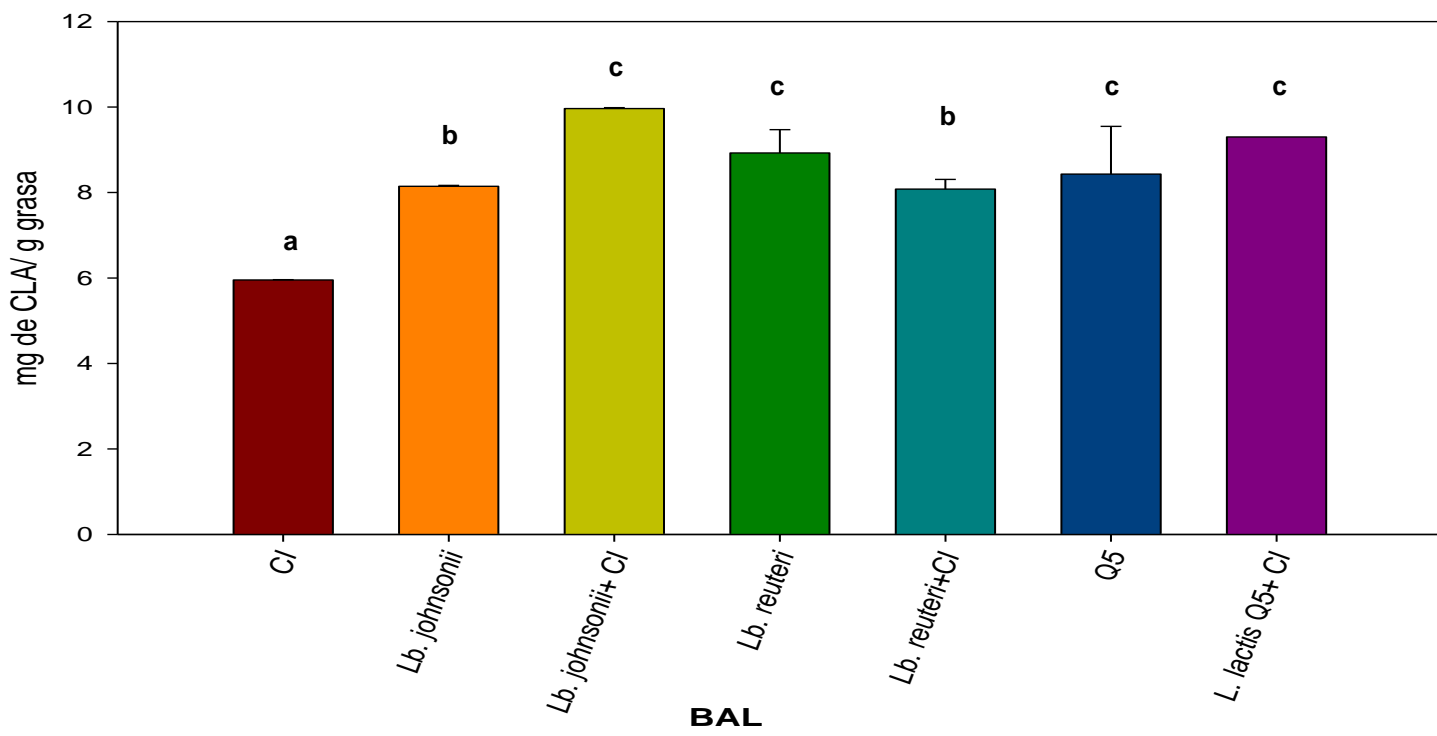


Figura 14. Producción de CLA de BAL con cultivo iniciador en leche adicionada con aceite de girasol (.1 %) y 8 h de incubación.

En la Figura 15, se muestra la concentración de los dos isómeros del CLA en donde la mayor concentración, fue producida por *Lb. johnsonii* +CI (5.30 ± 0.02 y 5.22 ± 0.05 mg /g grasa) isómero 1 y 2, respectivamente. En contraste, CI produjo la menor concentración de los isómeros (3.26 ± 0.04 y 3.32 ± 0.06 mg/g grasa).

Por otro lado, no hubo diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en la concentración del isómero 1 para *Lb. johnsonii* (4.47 ± 0.007 mg/g grasa), *Lb reuteri* + CI (4.46 ± 0.12 mg/g grasa), los dos isómeros de *Lb reuteri* (4.80 ± 0.40 y 4.69 ± 0.10 mg/g grasa), *L. lactis* Q5+ CI (4.99 ± 0.01 y 4.87 ± 0.02 m/g grasa) y *L. lactis* Q5 (4.64 ± 0.58 y 4.34 ± 0.51).

Gutiérrez *et al.*, (2010) reportaron resultados similares a los encontrados en este estudio cuando analizaron diferentes productos lácteos existentes en el mercado que contenían cultivos iniciadores además de cepas específicas.

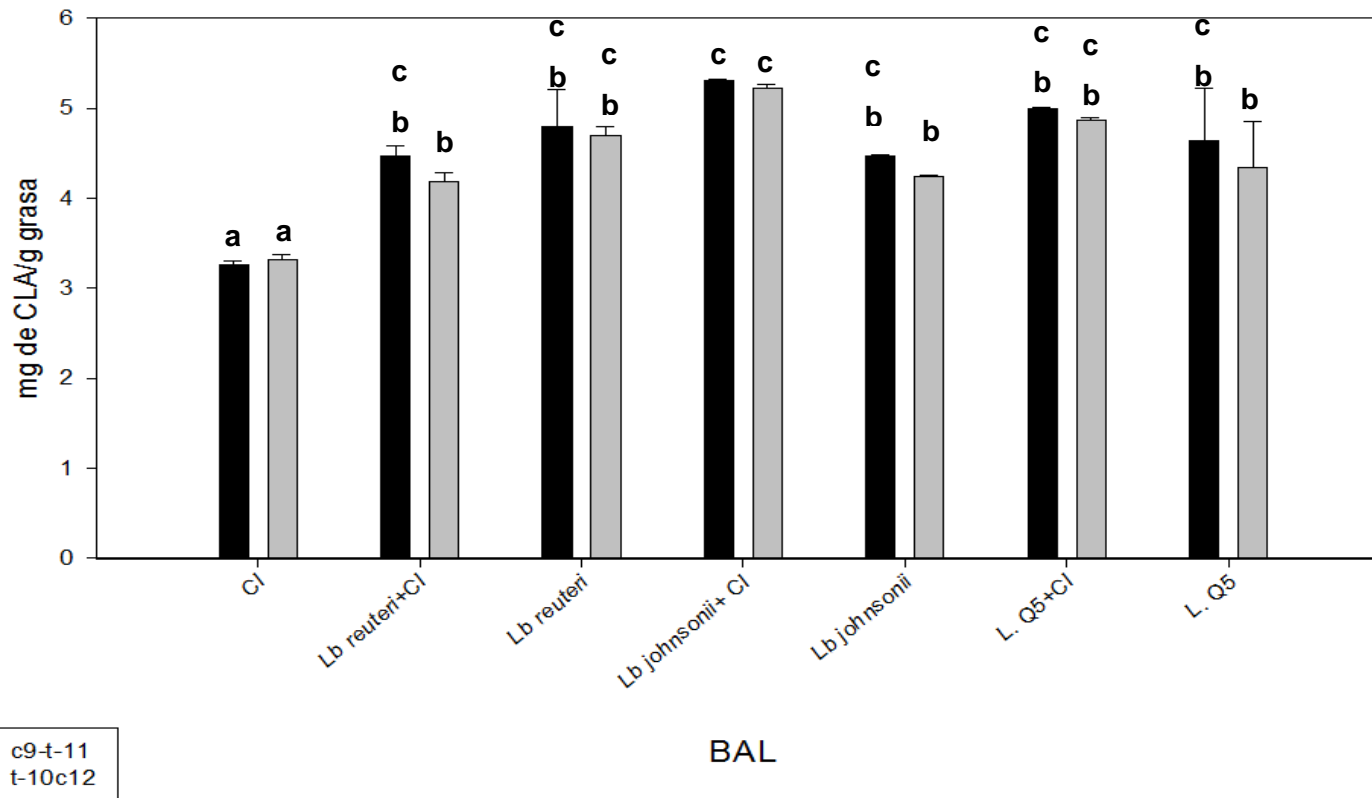


Figura 15. Producción de los isómeros *cis*-9:*trans*-11 y *trans*-10:*cis*-12 de BAL con cultivo iniciador en leche adicionada con aceite de girasol (.1 %) y 8 h de incubación

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo mostraron que la producción de los isómeros de CLA es específica para cada cepa. Las BAL utilizadas en este estudio llevaron a cabo la producción de los dos isómeros *cis-9:trans-11* y *trans-10:cis-12* del CLA a excepción *L. lactis* R7, *Propionobacterium propionicum* y *Lb. casei* 1 que sólo produjeron el isómero 2. Por otro lado, *L. acidophilus* 2 no produjo ninguno de los dos isómeros. Esto podría deberse a que la actividad enzimática encargada de la bioconversión es diferente para cada cepa de BAL.

Las cepas de *Lb. johnsonii* y *Lb. reuteri* mostraron una disminución en el contenido de CLA al incrementar la concentración del aceite de girasol en leche, lo cual indica que concentraciones de 0.1% son suficientes para incrementar significativamente el contenido de CLA en leches fermentadas.

La producción de CLA por cepas específicas de *Lb. johnsonii*, *Lb reuteri* y *L. lactis* fue potenciada en la presencia de un cultivo iniciador. Por lo anterior, estas cepas podrían ser utilizadas en la elaboración de leches fermentadas que ofrezcan un mayor aporte de CLA.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamczak, M., Bornscheuer, U. T., Bednarski, W. 2008. Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. *European Journal Lipid Science Technology*. 110, 491-504.
- Agueda, M., Zulet, M. A., Martínez, J. A. 2009. Efecto del ácido linoleico conjugado (CLA) sobre el perfil lipídico en humanos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59, 245-251.
- Akalin, A.S., Tokusoglu, Ö., Gönc, S., Aycan, S. 2007. Occurrence of conjugates linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal*. 17, 1089-1095.
- Ballesteros, C., J. M. Poveda, M. A. González-Viñas, L. Cabezas. 2006. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control* 17: 249-255.
- Beare-Rogers, J., Dieffenbacher, A., Holm J. V. 2001. Lexicon of lipid nutrition. *Pure and Applied Chemistry* 73, 685–744
- Bisig, W., Eberhard, P., Collomb, M., Rehberger, B. 2007. Influence of processing on the fatty acid composition and the content of conjugated linoleic acid in organic and conventional dairy products. *Review. Lait*. 87, 1–19. INRA, EDP Sciences. DOI: 10.1051/lait: 2007001.
- Coakley, M., Ross, R. P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R., Stanton, C. 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* ssp. *Journal Applied Microbiology*. 94, 138-145.

- Cooper, M. H., Miller, J. R., Patricia L. 2008. Conjugated linoleic acid isomers have no effect on atherosclerosis and adverse effects on lipoprotein and liver lipid metabolism in apoE^{-/-} mice fed a high-cholesterol diet. *Atherosclerosis* 200 294–302.
- FAO. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2006. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. ISBN 92-5-305513-8
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie academic and professional. Cork, Ireland. Primera edición. 1-67.
- Gnädig, S. 2002. Conjugated linoleic acid (CLA): Effect of processing on CLA in cheese and the impact of CLA on the arachidonic acid metabolism. Dissertation- zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg. Thesis Universidad de Hamburgo, Instituto de Bioquímica y Departamento de Química de los alimentos.
- González-Martínez, D. E., Gómez-Treviño, M., Jiménez-Salas, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Revista de Salud Pública y Nutrición*. Volumen 4. Número 2.
- Gutiérrez, A. L. F., Martínez, J. C., Barón, N. M. R. 2010. Contenido de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) y Composición de Ácidos Grasos en Algunos Yogures Comerciales de Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. 63 (2):5685-5692.
- Gutiérrez, M. N. Capacidad de *Lactococcus lactis* de biosintetizar α -cetoglutarato asociado con su potencial de producir aroma. 2008. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora.
- Haugen, M., Vikse, R., Jan, A. 2003. CLA (Conjugated linoleic acid) and adverse health effects; a review of the relevant literature. *The Norwegian*

Institute for Public Health, Department of the Toxicology of Foodstuffs, Division Section for Environmental Medicine, Oslo.

Heredia, C. P. Y. 2011. Caracterización del proceso de producción del queso cocido artesanal y de las principales Bacterias Ácido Lácticas generadoras de aroma. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo CIAD. A.C. Hermosillo, México.

Hernández-Mendoza, A., López-Hernández, A., Hill, C. G. Jr., García, H. S. 2009. Bioconversion of linoleico acid to conjugated linoleico acid by *Lactobacillus reuteri* under different growth conditions. Journal of Chemical Technology and biotechnology 84: 180-185.

Huesca-Toral, A., López, H. A., Angulo, G. J. O., Hill, C. G., García, H. S. 2005. Síntesis de triacilglicéridos ricos en ácido linoleico conjugado (CLA) mediante esterificación enzimática en un medio libre de solvente. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 4; 75-87.

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. 5, 1731-1737.

Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K., Shimizu, S. 2002. Conjugated Linoleic Acid Production from Linoleic Acid by LActic Acid Bacteria. Journal of American Oil Chemists´Society.79, 159-163.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 41, 103-125.

- Lin, T. Y., Lin, C. W., Lee, C. H. 1999. Conjugated Linoleic Acid Concentration as Affected by Lactic Cultures and Added linoleic acid. *Food Chemistry*. 67, 1-5
- Lin, T., Y. 2003. Influence of lactic cultures, linoleic acid and fructo-oligosaccharides on conjugated linoleic acid concentration in non-fat set yogurt. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 58, 11-14.
- Lindmark-Mansson, H. 2008 Fatty acids in milk bovine fat. *Food and Nutrition Research*. DOI: 10.3402/fnr.v52i0.1821.
- Lo Fiego, P. D.P., Macchioni, P. S., Pastorelli, G., Corino., C. 2005. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) supplementation on CLA isomers content and fatty acid composition of dry-cured Parma ham. *Meat Science* 70. 285–291
- Miller, G. D., Jarvis, J. K., McBean, L. D. 2007. *Handbook of dairy foods and nutrition*. Third edition. Boca Raton. National Dairy Council. 299-338.
- Mulder, H., Walstra, P. 1974. The milk fat globule. *Emulsion science as applied to milk products and comparable foods*. 13-32.
- National Cattlemen's Beef Association. Beef Facts, Human Nutrition Research. 2007. Conjugated Linoleic Acid and Dietary Beef.
- Palacios, M. C., Haros, M., Rosell, M. C., Sanz, Y. 2004. Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 229-237.
- Pariza, M. W., Hargraves, W. A. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Carcinogenesis*. 6, 591-593.

- Pariza, M. W., Park, Y., Cook, M. E. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lip Res* 40: 283-298.
- Pariza, M. W., Yeong L. H. 1990. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: a new class of anticarcinogens. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* 7: 169-171.
- Park, P. W., Goins, R. E. 1994. *In Situ* Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods. Vol. 59, No. 6.
- Paz, L., A. L. 2010. Evaluación de la Capacidad Inhibitoria de Cepas de *Lactococcus lactis* Aisladas de Diferentes Nichos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, México.
- Puniya, A. K., Chaitanya, S., Tyagi, A. K., Kishan, S. S. 2008. Conjugated linoleic acid producing potential of lactobacilli isolated from the rumen of cattle. *Journal of Industry Microbiology Biotechnology.* 35: 1223-1228.
- Puniya, A. K., Reddy, C. S., Kumar, S., Sing, K. 2009. Influence of sunflower oil on conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Annals of Microbiology.* 59 (3) 505-507.
- Reyes, D. R. 2010. Determinación de compuestos volátiles responsables del aroma a queso fresco producido por cepas de *Lactococcus lactis*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora.
- Rivera, P. E. 2010. Evaluación de la actividad autolítica producida por cepas de *Lactococcus lactis* aislada de diversos nichos ecológicos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Rocha-Urbe, A., Hernández, E. 2004. Síntesis de ácido linoleico conjugado por isomerización alcalina usando propilenglicol como solvente. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 3, 193-200.

- Rodríguez-Alcalá, L. M., Braga, T., Malcata, F. X., 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. 125: 1373-1378.
- Rodríguez, F. J. C. 2008. Evaluación de la actividad antipertensiva *in vitro* en leche fermentada con *Lactococcus lactis* de diversos orígenes. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora.
- Salamon, R.V., Lóki, K., Vargas-Visi, É., Mándoki., Zs., Csapó, Zs. 2009. Increase of conjugated linoleic acid content of dairy products by adding sunflower oil. *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria*. 2, 287-293.
- Santiago, L. 2010. Estudio del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de queso cocido artesanal del estado de sonora. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.
- Schmid, A., Collomb M., Sieber R., Bee G. 2005. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Science*. 73, 29–41.
- Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P., Eyer, H. 2004. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products-a review. *International Dairy Journal*. 14, 1-15.
- Spreer, E., Mixa, A. 1998. *Milk and dairy product technology*, CRC Press. p. 9-48. ISBN 9780824700942.
- Thiel-Cooper R. L., Parrish, F. C., Sparks, J. C., Wiegand B. R., Ewan R. C. 2001. Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *Journal of Animal Science*. 79;1821-1828.

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Boekel, V. M. A. J. S. A. 1999. Dairy Technology. Principles of Milk Properties and Processes. Department of Food Science Wageningen Agricultural University Wageningen, the Netherlands. 3-115.

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 American Oil Chemists' Society. 81, 589-595.