

BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO LINOLEICO (AL) EN ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) POR BACTERIAS LÁCTICAS NATIVAS DE QUESO ADOBERA ARTESANAL DEL ESTADO DE JALISCO

S. Jiménez-Espinoza^a, M. Estarrón-Espinosa^a, M.R. Kirchmayr^b, E.C. Lugo-Cervantes^a, S.J. Villanueva-Rodríguez^a, M.D. García-Parra^{a*}

^a Posgrado en Procesos Agroindustriales (PICYT), Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), Unidad de Tecnología Alimentaria, ^b Biotecnología Industrial. Campus Zapopan Av. Normalistas #800, Colinas de la Normal. CP 44270. *dgarcia@ciatej.mx

RESUMEN:

El ácido Linoleico conjugado (CLA), describe los isómeros posicionales del ácido Linoleico (LA), ha recibido gran interés en los últimos años debido a sus efectos benéficos, que incluyen anti-cancerígenos, anti-diabético, anti-inflamatorios, anti-obesidad y anti-aterogénico, que han sido ampliamente confirmado tanto in vivo como in vitro; en algunos alimentos se encuentra presente el CLA como son la carne y los lácteos, en estudios recientes se encontró presente el LA y CLA en queso Adobera artesanal del estado de Jalisco, además que se ha reportado la capacidad de algunas bacterias lácticas de biotransformar el AL a CLA por lo que; el objetivo de este estudio fue aislar cepas nativas de queso artesanal adobera del estado de Jalisco, con capacidad de biotransformar LA en CLA. Como resultados se aislaron 12 cepas nativas, las cuales 8 fueron identificadas como *Lactobacillus fermentum* y 4 como *Lactobacillus plantarum*, se demostró la capacidad de todas las cepas para producir CLA a partir de una fuente de LA; se identificaron dos isómeros de CLA: CLA cis -9, trans-11) y CLA trans-10, cis-12, ambos reportados como los dos isómeros con mayor actividad biológica.

ABSTRACT:

Conjugated linoleic acid (CLA), describes the positional isomers of linoleic acid (LA), it has received great interest in recent years because of its beneficial effects, including anti-cancer, anti-diabetic, anti-inflammatory, anti-obesity and anti-atherogenic, which it has been widely confirmed both in vivo and in vitro; in some foods is present the CLA in as meat and dairy, recent studies show the presence LA and CLA in Adobera cheese, elaborate in the state of Jalisco, is reported in addition to the ability of some lactic bacteria for biotransformed of LA in CLA ; The aim of this study was to isolate native strains of artisan adobera cheese the Jalisco state, capable the biotransformed the LA in CLA. As a result 12 native strains were isolated, which 8 were identified as *Lactobacillus fermentum* and 4 as *Lactobacillus plantarum*, was shown the ability of all strains to produce CLA from a source the LA; they identified two isomers of CLA: CLA cis-9, trans -11 and CLA trans-10, cis-12, Both isomers reported with greater biological activity.

Palabras clave: Ácido linoleico conjugado, Bacterias lácticas nativas, Biotransformación.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

El ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés) describe los isómeros posicionales y geométricos del ácido Linoleico (LA por sus siglas en inglés) (C18: 2,

c9 c12), que contienen un sistema de dos dobles enlaces, donde cada uno de los dobles enlaces puede estar en configuración cis o trans, y en diferentes posiciones a lo largo de la cadena de 18 carbonos, dando lugar a 28 posibles isómeros (Chang *et al.*, 1992; Reaney *et al.*, 1999; Rocha y Hernández, 2004; Ogawa *et al.*, 2005; Churruca *et al.* 2009; Andrade *et al.*, 2012; Sosa *et al.*, 2014; Leon *et al.*, 2014; Bo Yang *et al.*, 2015). El CLA ha recibido gran interés en los últimos años debido a sus efectos benéficos, que incluyen anti-cancerígeno, anti-diabético, anti-inflamatorio, anti-obesidad y anti-aterogénico, los cuales han sido ampliamente confirmados tanto *in vivo* como *in vitro* (Bo Yang *et al.*, 2015).

Uno de los isómeros más abundantes es el CLA cis-9, trans-11 (también denominado ácido ruménico) que puede representar hasta el 80% del total del CLA que se ha encontrado en algunos alimentos. Otro isómero es CLA trans-10, cis-12 el cual se encuentra en cantidades mucho más pequeñas que el mencionado anteriormente pero su concentración es significativa en relación al resto de los isómeros; de acuerdo a estudios recientes, estos dos isómeros son los más bioactivos (Park y Pariza., 2007; Badinni *et al.*, 2009; Churruca *et al.* 2009; Andrade *et al.*, 2012; Sosa *et al.*, 2014; Leon *et al.*, 2014).

Las principales fuentes de alimentos que contienen de CLA en la dieta humana son los productos lácteos y la carne. En los últimos años, una serie de bacterias aisladas de alimentos como leches fermentadas, quesos y yogurts entre otros, han sido identificadas como bacterias con capacidad de transformar el LA en CLA; dentro de éstas se encuentran las bacterias lácticas *Lactobacillus* y *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Pediococcus*, entre otras (Coakley *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2005; Gorissen *et al.*, 2010; Hennessy *et al.*, 2012; Hosseini *et al.*, 2014). Las bacterias ácido-lácticas (BAL), son muy utilizadas en la industria alimentaria por su habilidad por acidificar y también por su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo del aroma de alimentos fermentados (Savadogo *et al.*, 2006; Hugensholtz., 2008; Parra., 2010).

El queso Adobera es un queso artesanal, al parecer tiene décadas de existencia. Es un queso típico mexicano, que es elaborado y altamente apreciado, no solamente en el estado de Jalisco (de donde probablemente es oriundo), sino en otros estados del país como Guanajuato, Hidalgo y Zacatecas. El queso Adobera es elaborado con leche cruda de vaca, fresco o ligeramente añejado, de pasta blanda, acidificado por la microflora natural de la leche y prensado ligeramente; se comporta como los quesos de pasta hilada, fundiéndose fácilmente al aplicarle calor (Villegas de Gante 1993).

En estudios recientes sobre la fracción lipídica de este producto artesanal mexicano, se encontró la presencia de LA y CLA (C18: 2, cis-9, trans-11), (Jimenez-Espinoza *et al.*, 2015). Estos resultados motivaron el interés por determinar si la microbiota de este queso es capaz de generar CLA a partir LA. Así, el objetivo de este trabajo fue el aislamiento e identificación de bacterias lácticas con capacidad de biotransformar el ácido linoleico (LA) en ácido linoleico conjugado (CLA), a partir de una fuente rica en LA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los quesos adobera artesanales para fundir fueron adquiridos en comercios de la zona metropolitana de Guadalajara Jalisco. Aceite refinado de cártamo Alto Linoleico, con un contenido de LA de 67.8 - 83.2% fue obtenido de forma comercial (Sesajal).

Aislamiento de bacterias lácticas de queso Adobera

De los quesos Adobera se tomaron muestras para sembrarse en medio de cultivo específico para bacterias lácticas (MRS), las muestras inoculadas se incubaron a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, posteriormente se realizaron resiembras sucesivas hasta obtener colonias típicas de este tipo de bacterias.

Identificación de bacterias lácticas

La identificación de especies de BAL se llevó a cabo mediante en un equipo Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker-Daltonics), utilizando el software MALDI-BIOTYPER RTC aplicando el método MBT_FC. Los espectros se generaron con 240 disparos con los parámetros preestablecidos en el método y se compararon con la librería BDAL. En detalle, se transfirieron colonias frescas de BAL de un cultivo puro en agar MRS siguiendo el método de transferencia directa (Bruker-Daltonics) a una placa MSP 96 target polished steel BC y se cubrió con 1 μL de solución de matriz HCCA. El criterio para una identificación exitosa mediante esta técnica se estableció en un score mayor a 1.7.

Identificación de bacterias lácticas con capacidad de biotransformación de AL en CLA

Las bacterias lácticas nativas aisladas del queso Adobera, fueron activadas a 37°C en caldo MRS; estos cultivos activados fueron transferidos al 5% en 10 mL de caldo MRS enriquecido con 1% de Tween 80 (v/v) y 20mg/mL de LA e incubado por 24h a 37°C .

Extracción de lípidos

Fue realizada por extracción Líquido-Líquido; 10 mL de medio de cultivo se centrifugaron a 7000rpm durante 5 min a 4°C , posteriormente a 3 mL del sobrenadante se adicionaron 6mL de isopropanol y se agitó por 1 minuto en vortex. Después se agregaron 5mL de hexano, se agitó por 1 min en vortex y se centrifugó a 2000rpm durante 5 minutos a 4°C ; se extrajo el sobrenadante y finalmente se retiró el solvente en Speed Vacuum, MiniVac Evaporators, LABOGENE para ser metilado.

Determinación de CLA por cromatografía de gases

La determinación de CLA se efectuó a partir de la conversión de metil ésteres de ácidos grasos (FAMES), mediante el uso de BF_3 y subsiguiente separación cromatográfica. Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890B acoplado a un detector de masas 5977, utilizando una columna HP-23 cis/trans (60m x 0.25mm ID x 0.25 μm ft), inyectando 0.5 ml en un flujo de 1.3 ml/min de He. La ionización se efectuó a 70eV por EI. La identificación del CLA fue obtenida a partir de la comparación de espectros de los picos de la muestra

con los de la biblioteca NIST14, así como por los espectros y tiempos de retención de un estándar puro conteniendo isómeros de CLA adquiridos en modo SIM. La cuantificación del CLA en las muestras fue realizada a partir de una calibración externa utilizando disoluciones de 0.1-50 ppm de CLA al 95% de pureza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 12 colonias nativas de quesos adobera, de las cuales se identificaron dos especies diferentes como se muestra en la “**Tabla I**”; como se puede observar, 8 aislados correspondieron a *Lactobacillus Fermentum* (*L. fermentum*) y 4 fueron identificados como *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*). En trabajos anteriores también se había reportado la presencia de este tipo de BAL en queso Adobera (Pelayo *et al.*, 2012).

Tabla I. Especies de BAL identificadas por Microflex LT MALDI-TOF-MS.	
Cepa	Especie de BAL
QA01	<i>Lactobacillus plantarum</i>
QA02	<i>Lactobacillus plantarum</i>
QA03	<i>Lactobacillus plantarum</i>
QA04	<i>Lactobacillus fermentum</i>
QA05	<i>Lactobacillus fermentum</i>
QA06	<i>Lactobacillus fermentum</i>
QA07	<i>Lactobacillus fermentum</i>
QA08	<i>Lactobacillus fermentum</i>
QA09	<i>Lactobacillus fermentum</i>
QA10	<i>Lactobacillus fermentum</i>
QA11	<i>Lactobacillus fermentum</i>
QA12	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Capacidad de biotransformar AL a CLA

Como se puede apreciar en la “Tabla II”, todas las cepas nativas aisladas del queso Adobera fueron capaces de biotransformar LA en CLA, ya que en todas las muestras con aceite de cártamo Alto Linoleico incubadas con las 12 diferentes cepas se identificaron los dos isómeros CLA cis-9, trans-11 y CLA trans-10, cis-12, ambos reportados con importante actividad biológica, “Figura 1”. Como puede observarse, no todas las cepas tuvieron la capacidad de biotransformar el LA a CLA ya que algunas tienden a realizar una mayor transformación de CLA y todavía la transformación entre isómeros es diferenciada, prevaleciendo en general una mayor proporción de CLA cis-9, trans-11, lo cual coincide con los resultados de investigaciones en otros productos lácteos, además de evidenciar que a pesar de ser la misma especie, las BAL no siempre presentan la misma actividad, (Ogawa *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2012; Hosseini *et al.*, 2014, Bo Yang *et al.*, 2015).

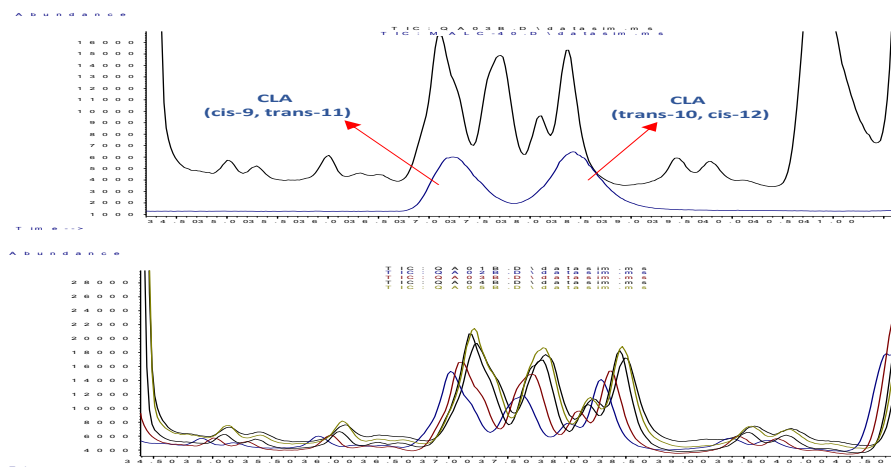


Figura 1. Cromatogramas (TIC) de algunas muestras mostrando la biotransformación de isómeros del CLA por bacteria lácticas aisladas de queso Adobera.

Tabla II. Capacidad de biotransformar LA a CLA de baterías lácticas nativas de queso Adobera.

Especie de BAL	CLA (Cis9-Trans11)	CLA (Trans10-Cis12)
<i>L. plantarum</i>	**	*
<i>L. plantarum</i>	**	*
<i>L. plantarum</i>	**	*
<i>L. fermentum</i>	***	*
<i>L. fermentum</i>	**	*
<i>L. fermentum</i>	***	**
<i>L. fermentum</i>	**	**
<i>L. fermentum</i>	**	**
<i>L. fermentum</i>	**	**
<i>L. fermentum</i>	***	**
<i>L. fermentum</i>	**	**
<i>L. plantarum</i>	**	**

CLA: < 10ppm *, de 10 a 20ppm **, > 20ppm ***.

CONCLUSIONES

Se pudieron aislar e identificar las 12 especies nativas de bacterias ácido lácticas aisladas en el queso artesanal Adobera de Jalisco, con capacidad de biotransformar ácido linoleico a ácido Linoleico conjugado; el 67% fueron identificadas como *Lactobacillus Fermentum* y el 33% fueron *Lactobacillus plantarum*. De acuerdo a los resultados cromatográficos todas las cepas nativas presentaron capacidad de biotransformar ácido linoleico en los dos principales isómeros del ácido linoleico conjugado: CLA cis-9, trans-11 y CLA trans-10, cis-12, los cuales son considerados con mayor actividad biológica.

BIBLIOGRAFÍA

Andrade J.C., Ascencao K., Gullon P., Henriques S. M. S., Pinto J. M. S., Rocha-Santos T. A. P., Freitas A. C., Gomes A. M. 2012. Production of conjugated
Jiménez-Espinoza et al. / Vol. 2 (2017) 148-154

- linoleic acid by food-grade bacteria: A review. *Int. J. Dairy Technol.* 65: Pág.467-481.
- Baddini Feitoza, A. Fernandes Pereira, N. Ferreira da Costa and B. Gonçalves Ribeiro. 2009. Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile. *Nutr Hosp.* Vol. 24: Pág. 422-428.
- Bo Yang, Haiqin Chena, Catherine Stanton, R. Paul Ross, Hao Zhanga, Yong Q. Chen, Wei Chen. 2015. Review of the roles of conjugated linoleic acid in. health and disease. *Journal of Functional Foods*, Vol.15. Pág. 314–325
- Chang J. H. P., D. K. Lunt, and S. B. Smith. 1992. Fatty acid composition and fatty acid elongase and stearoyl-CoA desaturase activities in tissues of steers fed high oleate sunflower seed. *J. Nutr.*122: Pág. 2074-2080.
- Coakley, M., Ross, R.P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R., Stanton, C. 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *J. Appl. Microbiol.* 9 138-144.
- Churrua I., Fernandez-Quintela A, Portillo MP 2009 Conjugated linoleic acid isomers: differences in metabolism and biological effects. *Biofactors* 35: Pag. 105-111.
- Gorissen, L., De Vuyst, L., Raes, K., De Smet, S., Leroy, F. 2012. Conjugated linoleic and linolenic acid production kinetics by bifidobacteria differ among strains. *Int. J. Food Microbiol.* 155: 234-240.
- Hugenholtz, J. 2008. Review. The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *International Dairy Journal.* Vol.18: Pág. 466-475.
- Jiménez Espinoza S., Estarrón Espinosa M., García Parra M. D., Lugo Cervantes E. y Villanueva Rodríguez S. J. 2015. Determination of fatty acid profile and presence of conjugated linoleic acid, in two artisan fermented products of the state of Jalisco (adobera cheese and tejuino) by gas chromatography. V Congreso Internacional Biología, Química y Agronomía. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- León Sánchez J., Salgado Cruz M. de la P., Sánchez Mundo M. de la L. y Cortés Sánchez A. de J. 2014. Conjugated linoleic acid: from nature to biotechnological use. *Revista Cubana de Química*, Vol. 26. Num. 3: Pág. 235-258.
- Ogawa J., Kishino S., Ando A., Sugimoto S., Mihara K., Shimizu S. 2005. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 100: Pag. 355-364.
- Parra Huertas R. A. 2010. Review. Lactic acid bacteria. Functional role in the foods. *Facultad de ciencias agropecuarias.* Vol. 8. Núm. 1 .Pág. 93-105
- Park Y., Pariza M. W. 2007. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Res. Int.* Vol. 40: Pág. 311-323.
- Pelayo Arreola I. M., Méndez Robles M. D., Villanueva Rodríguez S. J., Villagran de la Mora B. Z. 2012. "Identificación de Ácidos Grasos Volátiles producidos por Bacterias Ácido Lácticas, asociadas al aroma en una marca de queso adobera elaborado de manera artesanal". Tesis. Universidad de Guadalajara, Centro universitario de los Altos.
- Rocha Uribe, A. y Hernández, E. 2004. Synthesis Of Linoleic Conjugated Acid By Alkali Isomerization Using Propylene Glycol As Solvent. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 3, Núm. 2, Pág. 193-200.

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

- Ronayne de Ferrer P. A. 2000. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la alimentación del lactante. Arch. Argent. Pediatr. Vol. 94: Pág. 23.
- Sabadogo A., Ouattara C., Bassole I. y Traore A. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria- a minireview. African Journal of biotechnology. Vol. 5. Pág. 678-683.
- Villegas de Gante, A. 1993. Los Quesos Mexicanos. Universidad Autónoma Chapingo. CIESTAAM. Págs. 251
- Willians W, Dosson CG, and Gunstone, F. Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid. J Am Oil Chem Soc 1997; 74:1231-1233