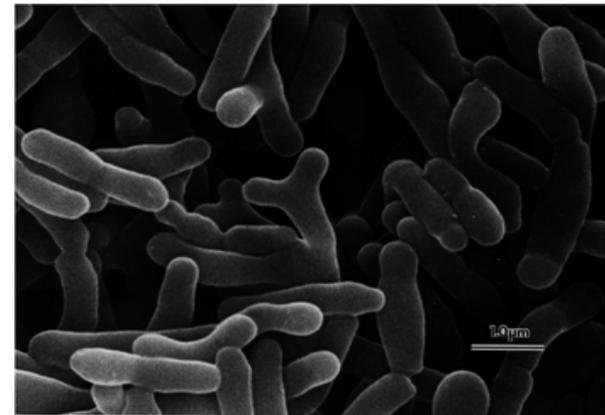


Desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías para crear lípidos con un alto perfil nutricional en matrices alimentarias

Mayo 2011



Introducción



- El ácido linoleico conjugado y el linolénico conjugado (CLA y CLN respectivamente), son isómeros con dobles enlaces conjugados de los ácidos grasos octadecadienoico y octadecatrienoico respectivamente, y son objetos de nuestra investigación por ser un nuevo tipo de lípidos potencialmente funcionales, biológicamente activos.

Introducción



- Existen diversos métodos de producción de estos isómeros, entre ellos, los producidos por **actividad microbiológica**.
- Los procedimientos químicos generan mezclas equimolares de los posibles isómeros.
- Los **métodos microbiológicos**, como numerosos procesos biocatalizados, tienen la ventaja de ser **isómero selectivos**.

Introducción



- Existen publicaciones que describen que ciertas bacterias ácido-lácticas son, también , productoras de CLA.
- Hay algunas indicaciones que sugieren que la producción de CLN recorre el mismo camino metabólico que la formación de CLA.

Objetivos



- Investigar la capacidad de ciertos microorganismos para producir ácidos grasos conjugados poli-insaturados .
- Estudiar la cinética de la producción de CLA y CLN por estos microorganismos.
- Desarrollar productos lácteos ricos en CLA y CLN.
- Evaluar in vivo el efecto estimulante sobre el sistema inmunitario

Definición

El CLA es una mezcla de isómeros del ácido linoleico (18 carbonos) con dos doble enlaces separados por un sólo simple enlace. Cada doble enlace puede estar en configuración *cis* o *trans*.

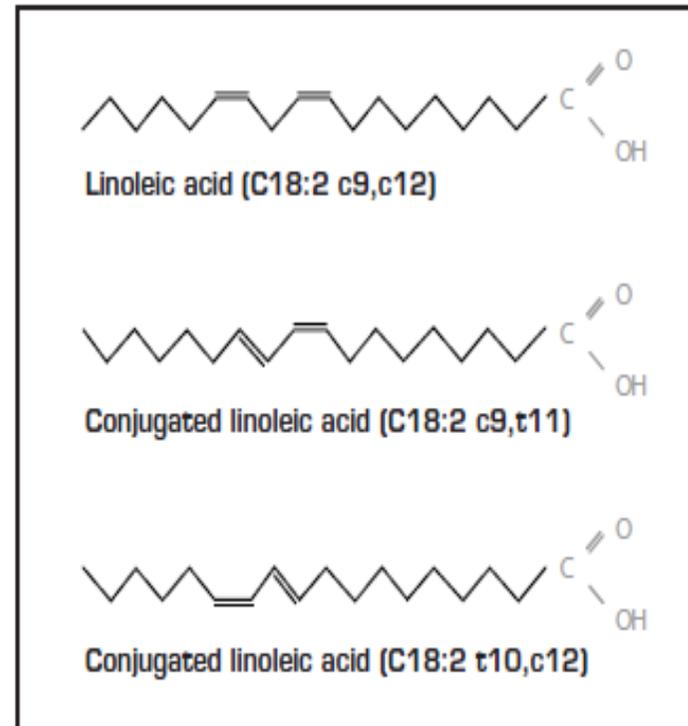


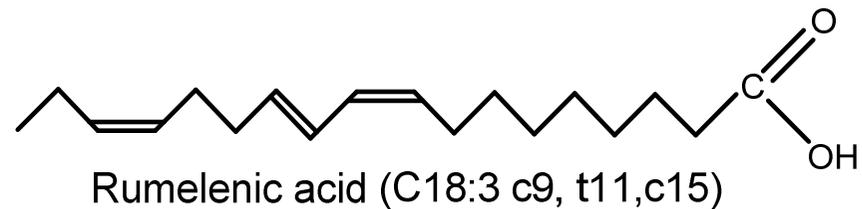
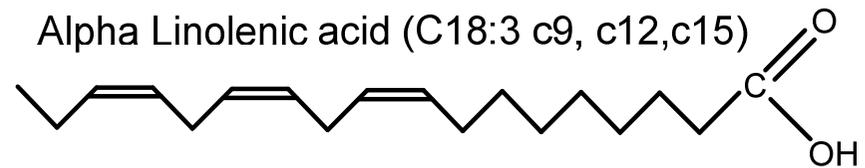
Figure 1

Chemical structures of linoleic acid and conjugated linoleic acids *c9,t11* CLA and *t10,c12* CLA

Definición



El CLN es una mezcla de isómeros de ácido linolénico (18 carbonos) con tres doble enlaces separados por un enlace simple. Cada doble enlace puede estar en configuración *cis* o *trans*.



Fuentes Dietarias de CLA

- La mayor fuente de CLA para los humanos es la carne vacuna y los productos lácteos.
- La principal forma presente en alimentos provenientes de rumiantes es *cis-9, trans-11* CLA, al que se le ha dado recientemente el nombre de ácido ruménico (RA).
- RA representa más del 80% del CLA presente en la grasa butírica de la leche y en más del 75% del CLA presente en la grasa de depósito bovino.

Fuentes Dietarias de CLN



- Presente en algunas fuentes vegetales como el aceite de caléndula y el aceite de granada.
- La principal forma presente en alimentos provenientes de rumiantes es el *cis-9, trans-11-cis 15* CLN, conocido como ácido rumelénico .

Potenciales efectos saludables



EL CLA Y LA DISMINUCION DE LA GRASA CORPORAL

- Se ha observado que el CLA reduce la grasa corporal en ratones, ratas y gallinas.
- Varios mecanismos en dos niveles de acción: adipocitos y en las células musculares.

CLA Y ATEROSCLEROSIS

- La suplementación con CLA ha demostrado ejercer varias respuestas en los perfiles lipídemicos en animales:
 - ❖ Reducción de la aterogenénesis en el depósito de lípidos.
 - ❖ Reducción de la formación de la placa aórtica.

Potenciales efectos saludables



CLA y DIABETES

- Se ha reportado que el CLA tiene efectos antidiabéticos en ratas, mejorando aún la sensibilidad a la inulina.
- En humanos, la suplementación con una mezcla de isómeros de CLA fue asociada con un mejoramiento de la disminución de la glucosa en sangre.

Potenciales efectos saludables



CLA Y EL SISTEMA INMUNITARIO

- El CLA podría impactar en el sistema inmunitario: parece tener un efecto protector en animales contra el catabolismo y la respuesta inflamatoria.

CLA Y HUESOS

- El CLA parece jugar un papel importante en la salud ósea: Los isómeros del CLA tendrían influencia sobre la formación de huesos y la reabsorción.

Potenciales efectos saludables del CLN



- La actividad antioxidante ha sido descrito así como la actividad anticarcinogeniética del ácido α -oleoesteárico (Tsuzuki & col., 2004; Yasui & col., 2005)
- Reducción de la grasa corporal en animales por el ácido punícico (Arao & col., 2004; Koba & col., 2007).

Seguridad del CLA



• Mayo 2010: la autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aseveró sobre la seguridad del Tonalin® (Cognis) y el Clarinol® (Lipid Nutrition) como nuevo ingrediente alimentario:

	CLARINOL®	TONALIN®
CLA contenido	80% CLA 1:1 mezcla de isómeros de t9,c11 and t10,c12	80% CLA mezcla 1:1 de isómeros del t9,c11 and t10,c12
Dosis de uso	3,75g por día (correspondiente a 3g CLA) hasta por 6 meses	4,5g por día (correspondiente a 3,5g CLA) hasta por 6 meses
Limitaciones	La seguridad por periodos mayores a 6 meses no ha sido establecida.	La seguridad por periodos mayores a 6 meses no ha sido establecida.
	La seguridad del consumo de CLA por sujetos diabéticos tipo 2 no ha sido establecida.	La seguridad del consumo de CLA por sujetos diabéticos tipo 2 no ha sido establecida.

Actividades iniciales



- Selección de cepas de microorganismos productores de ácidos grasos conjugados poliinsaturados (Azti-Tecnalia)
- Estudio de la actividad productora de CLA (ácido linoleico conjugado) y CLN (ácido linolénico conjugado) del *Bifidobacterium breve* (Azti-Tecnalia)
- Identificación del gen responsable de la conjugación de ácidos grasos poliinsaturados en el *Bifidobacterium breve* (Azti-Tecnalia)

METODOLOGIA

- Se utilizaron microorganismos aislados de kefir, de cultivos comerciales y del CECT sembrados en medios suplementados con ácido linoléico.
- Eliminación de las células y extracción de ácidos grasos.
- Detección del CLA por método UV y confirmación por CG/SM.

Selección de cepas de microorganismos productores de ácidos grasos conjugados poliinsaturados



RESULTADOS

- Tres cepas de *Lactococcus lactis* produjeron CLA
- Una cepa de *Bifidobacterium breve* produjo CLA
- Los Bifidobacteria produjeron 4 veces más CLA que Lactococci

Bacterias	Origen	Control Abs	Abs muestra	Producción de AGC	% conversion	
Lactococcus lactis ssp lactis	Starter 13	0,385±0,014	0,427±0,013	+	4,79	
Lactococcus lactis ssp lactis	CECT 185	0,411±0,016	0,445±0,003	+	4,17	
Lactococcus lactis ssp lactis	CECT 539	0,355±0,006	0,375±0,008	+	3,21	
Bifidobacterium breve	CECT 4839	0,371±0,014	0,579±0,010	+	16,19	

Estudio de la actividad productora de CLA (ácido linoleico conjugado) y CLN (ácido linolénico conjugado) del *Bifidobacterium breve*

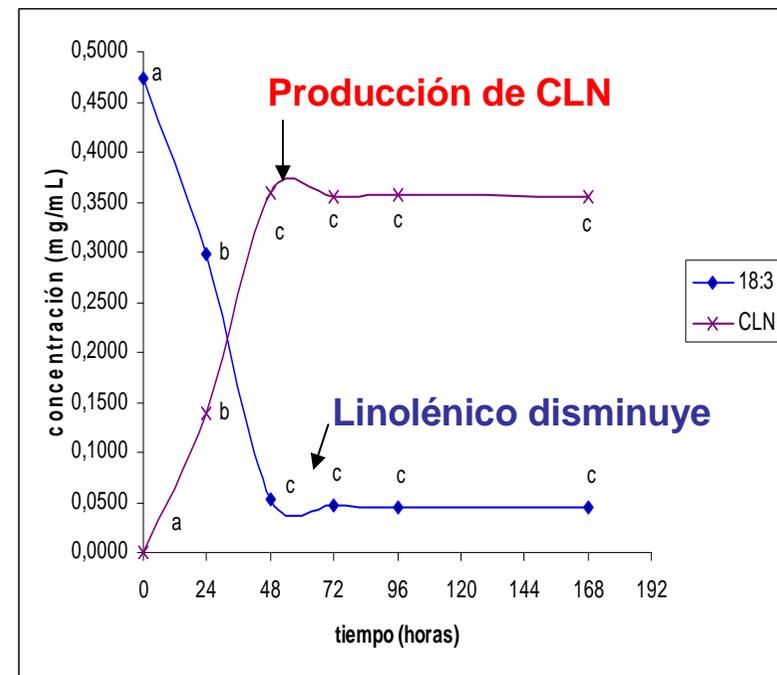
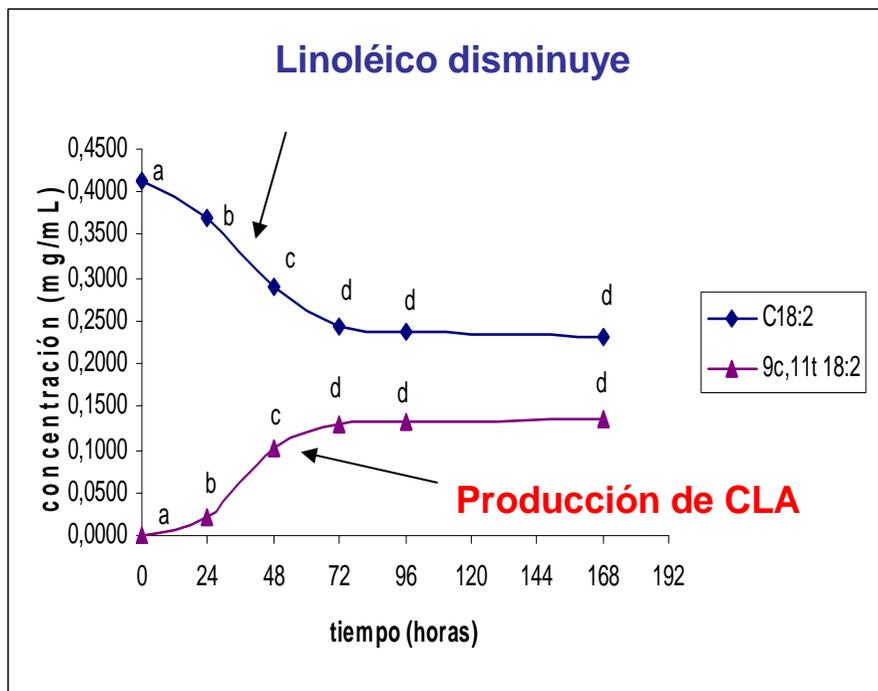


METODOLOGIA

- *Bifidobacterium breve* sembrado en el medio MRS-Cys suplementado con ácido linoléico o linolénico bajo anaerobiosis, a 30 °C durante 0, 24, 48, 72, 96 y 168 horas.
- Eliminación de las células y extracción de los ácidos grasos.
- Detección del CLA y CLN por método UV y confirmación a través de CG/SM.

RESULTADOS:

- Bifidobacterium breve produce tanto CLA como CLN.
- La producción de CLN es mayor (más linolénico conjugado que linoléico).



METODOLOGIA

- Utilizando la herramienta Clustal G (alineación múltiple secuencial) se efectuó un análisis “in silico” sobre 4 linoleato isomerasas bien conocidas, con el propósito de encontrar patrones comunes.
- Patrones que se encontraron en un marco de lectura abierto del sexto contig de *Bifidobacterium breve*.
- Conocidas tanto la secuencia aminoacídica como nucleotídica del gen putativo de la linoleato isomerasa de *B. breve* se realizaron amplificaciones con objeto de verificar si se obtenían los fragmentos esperados.
- Tras PCR y electroforesis se observaron fragmentos de amplificación que coincidían en talla con los observados “in silico”

RESULTADOS

Se ha observado “in silico” un marco de lectura abierto que pudiera codificar para un gen linoleato isomerasa putativo. Dicho fragmento de ADN se ha amplificado y verificado su tamaño, correspondiéndose con el esperado.

Actividades finales



- Producción de lácteos ricos en CLA y CLN por inoculación de *Bifidobacterium breve* .
- Se realizaron estudios de incubación de *Bifidobacterium breve* en leche descremada suplementada con ácido linoleico (LA) y ácido α -linolénico (LN), transformándose en sus correspondientes ácidos grasos conjugados: **ácido ruménico** (9*c*,11*t* C18:2) a partir de LA y **ácido rumelénico** (9*c*,11*t*,15*c* C18:3) a partir de LN.
- También se realizaron estudios de incubación de *Bifidobacterium breve* en yogur suplementado con ácido linoleico (LA) y ácido α -linolénico (LN), respectivamente, y se transformaron también en CLA y CLN.
- Las leches fermentadas elaboradas contuvieron una concentración de CLA de 14,78 mg en 100 g de leche y 23,37 mg de CLN. Sin embargo en yogur se obtuvieron productos con menor concentración tanto de CLA como de CLN, posiblemente debido a un fenómeno de competitividad por los nutrientes entre *B. breve* y los cultivos iniciadores del yogur (*S. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*).

Actividades finales



-EVALUACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS CONJUGADOS SOBRE EL METABOLISMO EN MODELOS ANIMALES:

-se realizó un experimento preliminar *in vivo* sobre pez cebra adulto para evaluar el efecto inmunoestimulante de suplementos ricos :

- en ácido jacárico (ácido linolénico conjugado)
- en aceite de lino (rico en linolénico)

Durante los 25 días que duró el experimento no se registraron decesos en ninguna de las 3 peceras utilizadas.

Tras la infección con el patógeno piscícola *Vibrio anguillarum*:

- los peces alimentados con ácido jacárico **no registraron muertos**
- la población que recibió un aporte de aceite de lino registró únicamente **un muerto** (3.3 % de la población)
- **La población control registró una mortalidad del 50%.**

Conclusiones



- Tres cepas de *Lactococcus lactis* producen el isómero natural del CLA 9c,11t .
- *Bifidobacterium breve* produce más CLA 9c, 11t CLA que las cepas de *Lactococcus* .
- *Bifidobacterium breve* produce CLN 9c, 11t, 15c CLN con mayor rendimiento que la conversión de CLA.
- Se ha observado “in silico” un marco de lectura abierto que pudiera codificar para un gen linoleato isomerasa putativo. Dicho fragmento de ADN se ha amplificado y verificado su tamaño, correspondiéndose con el esperado.
- Se elaboraron productos lácteos por inoculación de *Bifidobacterium breve* con un perfil lipídico modificado, ricos en CLA y CLN.
- Se observó un efecto de estimulación del sistema inmunitario en peces cebra alimentados con CLN

Gracias por su atención !!!

E mail : aerrazkin@kaiku.com