

## LÍPIDOS BIOACTIVOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS

Luis M. Rodríguez-Alcalá, María Visitación Calvo, María Antonia Villar-Tajadura, Pilar Castro-Gómez, Francisca Holgado, Manuela Juárez y Javier Fontecha\*.

*Departamento de Bioactividad y Análisis de alimentos. Grupo Lípidos. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) CSIC-UAM. C/ Nicolás Cabrera, 9. Campus de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), 28049 Madrid.\*([jfontecha@if.csic.es](mailto:jfontecha@if.csic.es))*

En la actualidad, las recomendaciones dietéticas reconocen que la leche y los productos lácteos son una excelente fuente de nutrientes esenciales (ej: calcio, potasio, magnesio, zinc, riboflavina, vitamina A, folato, vitamina D y proteínas de elevada calidad nutricional), así como un vehículo ideal de componentes bioactivos que pueden aportar beneficios para la salud humana (Collomb et al., 2006; Hur et al., 2007). No obstante, se insiste en la recomendación de un consumo preferente de productos lácteos desnatados o con reducido contenido en grasa. Sin embargo, durante los últimos años se han realizado investigaciones que han dado lugar a un número creciente de publicaciones, encaminadas a reconsiderar la significativa actividad biológica de los ácidos grasos presentes en la leche, en relación con la salud humana (German y Dillar, 2006; Akaln et al., 2006; IDF, 2007; Steijns, 2008; Lecerf, 2008; Parodi, 2009). En consecuencia, actualmente estamos asistiendo a un proceso de revalorización de la imagen de la grasa láctea, detectándose un creciente interés en todos aquellos aspectos que se refieren a los lípidos lácteos como fuente de ingredientes bioactivos y funcionales cuyo consumo aporta beneficios para el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades crónicas en humanos. En particular, cabe destacar la reconocida actividad del ácido linoleico conjugado (CLA) en la inhibición del cáncer, aterosclerosis y mejoramiento de las funciones inmunológicas (Parodi, 2005).

Con vistas a potenciar la actividad y por tanto los beneficios del consumo de estos compuestos lipídicos, en nuestro laboratorio estamos llevando a cabo estudios dirigidos a incrementar su contenido de forma natural en productos lácteos enriquecidos, o bien su aislamiento para posterior utilización como ingredientes funcionales. El conocimiento en profundidad de los mecanismos que regulan los contenidos de estos componentes con actividad biológica y el efecto potencialmente beneficioso de su consumo, es esencial para incrementar el valor añadido de los productos lácteos.

Estudios de meta-análisis recientes (Elwood et al., 2010) indican que el consumo de leche y productos lácteos tiene una incidencia positiva en la salud al disminuir el riesgo sobre las enfermedades cardiovasculares (CVD) y en lo que a la grasa láctea respecta, no existe ninguna evidencia científica clara que demuestre que su consumo moderado tenga incidencia negativa sobre las CVD (Steijns, 2008). Así, conviene indicar que a pesar del elevado contenido en ácidos

grasos saturados (AGS, 65%) de la grasa láctea, solo la fracción correspondiente a los ácidos laúrico (C12), mirístico (C14) y palmítico (C16), podría considerarse desfavorable, si se produce un consumo excesivo (Legrand, 2008). El ácido esteárico (C18) es considerado neutro desde la perspectiva de la salud humana, aunque sin duda es tan efectivo para reducir el colesterol plasmático como el ácido oleico (C18:1), también presente en grasa láctea en concentraciones altas (15-23%). La exclusiva presencia en grasa láctea de AGS de cadena corta, butírico (C4), caproico (C6) y de cadena media, caprílico (C8) y cáprico (C10), no ejerce efecto sobre los niveles del colesterol en sangre (Parodi, 2004). El ácido butírico, ha sido descrito como un agente antitumoral por inhibir el crecimiento y la diferenciación de células tumorales de próstata, mama y colon, así como por favorecer su apoptosis en animales de experimentación (Hassig et al., 1997; German, 1999). El ácido butírico parece además actuar de forma sinérgica con otros componentes de la dieta como resveratrol y retinol o fármacos específicos utilizados para el tratamiento de la hipercolesterolemia, por lo que no serían necesarias concentraciones plasmáticas muy elevadas para proporcionar un efecto beneficioso. Por otro lado, para los ácidos C6, C8 y C10 se han descrito actividades antibacterianas y antivíricas tanto en ensayos in vitro como en animales de experimentación (Thormar et al., 1994; Hilmarsson et al., 2006). Además, la presencia de estos ácidos grasos de cadena corta y media, favorece el punto de fusión más bajo a la grasa láctea, lo que la confiere diferentes propiedades químicas y físicas frente a otras grasas animales saturadas, afectando de manera positiva su digestibilidad y favoreciendo su biodisponibilidad.

Por último, señalar que la grasa láctea es la principal fuente de CLA de nuestra dieta. El CLA consiste en una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico, que, como se ha indicado, destacan por su elevado potencial como promotores de salud humana. El principal isómero de CLA es el ácido ruménico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11, RA) que se forma en el rumen a partir del ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12 C18:2) presente en la dieta de los animales. El precursor fisiológico del CLA es el ácido vacénico (*trans*-11 C18:1, TVA) ya que aproximadamente el 90% del isómero *cis*-9, *trans*-11 CLA de la grasa de leche se produce por vía endógena en la glándula mamaria, con la participación de la  $\Delta$ -9-desaturasa a partir del TVA (Kay et al., 2004; Bauman et al., 2006). Desde los primeros estudios que demostraban el efecto anticancerígeno del CLA (Ha et al., 1987), y en particular del isómero mayoritario *cis*-9, *trans*-11 C18:2, ha constituido el objetivo de multitud de estudios que determinan sus propiedades bioquímicas y fisiológicas (Parodi, 2009).

### **La grasa láctea como fuente de CLA**

Se ha demostrado que el contenido en CLA de la leche puede diferir no sólo según la especie de rumiante sino entre razas e individuos dentro de la misma raza. Entre estos factores fisiológicos o genéticos, la actividad  $\Delta$ -9 desaturasa ha sido el más investigado en los últimos años

(Palmquist, 2005). En este sentido, se sabe que son los lípidos aportados con la dieta los que juegan un papel clave como moduladores de la composición de ácidos grasos de la leche de rumiantes y por tanto, representan una herramienta práctica para alterar de forma natural el rendimiento y la composición de la grasa láctea (Sanz Sampelayo, et al. 2007; Chilliard et al., 2007). Además, dentro del desarrollo de estrategias para aumentar el contenido en CLA de la grasa láctea, resulta esencial el conocimiento de los procesos metabólicos implicados, como son la lipólisis, la biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que tienen lugar en el rumen y de la desaturación de vacénico y otros ácidos grasos en glándula mamaria. (Fuente y Juárez 2004; Luna et al., 2005; Jenkins y McGuire 2006). Así, el empleo de fuentes dietéticas ricas en AGPI permite obtener productos de origen animal cuya grasa es más insaturada aunque, la utilización de estos suplementos en algunas raciones puede alterar el proceso de fermentación ruminal y afectar negativamente al rendimiento productivo de los animales (Gonthier et al., 2005). En este contexto, la modificación de la dieta basal del ganado y sobretodo la suplementación lipídica de la misma, es decir la relación suplemento forraje, han sido objeto de exhaustivos estudios (Stanton et al 2003; Bauman et al., 2006, Shingfield et al., 2008; Toral et al., 2010).

Por otro lado han surgido numerosos trabajos de investigación que pretenden incrementar los niveles de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) de forma natural utilizando suplementos de origen marino (Castañeda-Gutierrez et al., 2007, Abu Ghazaleh et al., 2009). Sin embargo, su interés práctico resulta limitado dado el elevado coste de estos sustratos lipídicos y la posible limitación de las legislaciones alimentarias a la utilización de estos compuestos.

Diversos estudios concluyen que los mejores resultados se obtienen cuando se suplementa con fuentes lipídicas (aceites y semillas) de alto contenido en linoleico y  $\alpha$ -linolénico (lino, girasol y soja) y pastos verdes.

Otra estrategia empleada para mejorar las características nutricionales de la grasa láctea consiste en su sustitución por aceites vegetales o grasas enriquecidas en ácidos grasos omega-3 (Luna et al., 2004). Se logra así un descenso de los ácidos grasos saturados a expensas de un aumento de los AGMI y AGPI, muy favorable desde el punto de vista funcional. En la actualidad, ya se comercializan lácteos enriquecidos en omega-3, con elevados niveles de EPA y DHA. Existe un amplio abanico de productos que presentan alegaciones nutricionales relacionadas con los AGPI omega-3 (Shahidi et al., 2008) o la sustitución con aceites ricos en CLA (Rodríguez-Alcalá y Fontecha, 2007).

### **Efectos biológicos del CLA.**

La información disponible en la bibliografía científica sobre los efectos anticancerígenos, antiaterogénicos del CLA (principalmente el isómero *cis*-9, *trans*-11 C18:2), así como un gran

número de otros efectos potencialmente beneficiosos para la salud, es muy extensa. Estos efectos están ampliamente descritos en experimentación con animales y en estudios *in vitro* con cultivos celulares, sin embargo, las evidencias en investigación con humanos son contradictorias y en muchos casos no permiten establecer una asociación clara entre el consumo de CLA y su efecto biológico. Ello pudiera deberse a factores tales como las elevadas dosis empleadas con animales, diferencias metabólicas asociadas a la especie, el protocolo empleado o el empleo de isómeros puros o de mezclas sintéticas de isómeros (Benjamin et al., 2009, Park y Pariza, 2007).

Además del ácido ruménico, otros isómeros de CLA también se han asociado con diversos procesos metabólicos relacionados con la salud. Así el isómero *trans*-10, *cis*-12 C18:2, ha alcanzado una gran relevancia por promover la pérdida de peso corporal (Belury et al., 2007), aunque podría ser también causante de la disminución en los niveles de glucosa e incrementos de resistencia a insulina plasmática (Riserus 2002; Khanal y Dhiman, 2004). El *cis*-9, *cis*-11 C18:2 ha sido ensayado en cultivos celulares de cáncer de mama y parece comportarse como un agente bloqueador de estrógeno humano, mientras que el *trans*-9, *trans*-11 C18:2 parece ejercer un potente efecto inhibitor del crecimiento de células de cáncer de colon. Otras investigaciones utilizando muestras lácteas ricas en CLA, encontraron efectos positivos en la incidencia de cáncer de mama y colorectal en mujeres (Aro et al., 2000, Knekt et al., 1996, Larsson et al., 2005). En los trabajos llevados a cabo en niños obesos o con sobrepeso en donde se administraban batidos lácteos o cápsulas con concentraciones de CLA de 3 a 4,2 g/día de Ruménico y C18:2 *trans*-10, *cis*-12 en proporción 1:1, encontraron disminuciones en la acumulación de grasa corporal, y no registraron variaciones en los niveles de glucosa e insulina en sangre (Racine et al., 2010).

Actualmente existen dos teorías propuestas para explicar los efectos biológicos del CLA (Wall et al., 2008). La primera sostiene que los isómeros de CLA disminuyen las concentraciones del ácido araquidónico en los fosfolípidos de las membranas celulares, actuando a nivel de los señalizadores celulares como los eicosanoides. Esta podría ser la explicación del incremento en los niveles de IgA e IgM y marcadores de inflamación observados en mujeres con dosis de 1,1-3 g/día (Kwak et al., 2009) o de anticuerpos de hepatitis B en hombres al administrarse 1,7 g/día durante 12 semanas (Albers et al., 2003). La segunda hipótesis, sitúa al CLA como regulador de genes implicados en el metabolismo lipídico, apoptosis, funciones del sistema inmune y balance energético, además de poder suprimir la expresión de genes de factores de inflamación (Akahoshi et al., 2004).

Estudios llevados a cabo en humanos empleando aceites de alto contenido en CLA o mezclas de isómeros concluyen que el consumo de 6 g/día durante 1 año y de 3 g/día durante 2 años no presenta efectos adversos en la salud del consumidor, lo que ha llevado a la FDA a conferir la clasificación GRAS a los aceites ricos en CLA obtenidos por síntesis química siempre que la dosis administrada sea de 1,5 g/toma (FDA, 2007). A pesar de ello existe un intenso debate en torno a

la seguridad del consumo de CLA y diversas revisiones y trabajos de investigación ponen de manifiesto que aún a las dosis seguras propuestas, se puede producir estrés oxidativo, incrementos en las relaciones LDL/HDL y colesterol total/HDL, hepatotoxicidad y resistencia a insulina apuntando al isómero C18:2 t10, c12 como principal responsable (Tricon et al., 2006; Silveira et al., 2007; Ramos et al., 2009). Un estudio reciente, empleando dosis de 4,25 g/día de isómeros individuales y mezclas 1:1 de RA y C18:2 t10, c12 reportó que este último ácido graso puede producir alteraciones en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa y la producción de insulina y que según los autores contribuye a explicar otros trabajos previos donde se relaciona el CLA con la inducción de diabetes (Herrmann et al., 2009). Así pues, la información existente hasta la fecha muestra la necesidad de continuar avanzando en los estudios clínicos sobre el CLA que permitan aclarar las contradicciones existentes.

### **Bacterias productoras de CLA**

La presencia de CLA en productos procedentes de rumiantes se debe, como se ha indicado anteriormente, a que es un intermediario metabólico del proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos de la dieta (Hennessy et al., 2009). Este proceso se realiza por la acción de la isomerasa del ácido linoleico que poseen las bacterias del rumen *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Megasphaera elsdenii* (Jouany et al., 2007). Por tanto, una posible estrategia para incrementar el contenido de CLA en productos lácteos fermentados es el empleo de bacterias lácticas con capacidad para transformar AGPI y producir CLA. En los últimos años se han descrito diferentes bacterias lácticas y probióticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* que producen incrementos notables de CLA cuando se añade ácido linoleico como sustrato (Alonso et al., 2003; Ogawa et al., 2005; Sieber et al., 2004; Wang et al., 2007). Las razones de por qué las bacterias podrían transformar el ácido linoleico a CLA no están del todo claras, y se ha sugerido que esta conversión puede ser un mecanismo de detoxificación. Se ha determinado que el máximo de producción de CLA *cis*-9, *trans*-11 por las bacterias lácticas se genera en las primeras 24 horas de incubación, mientras que en una fase estacionaria tardía, la conversión se transforma en *trans*-9 *trans*-11 CLA (Coakley et al., 2003). Un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio a partir de 22 bacterias probióticas, cinco de ellas, pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, fueron capaces de producir CLA en leche desnatada utilizando ácido linoleico como sustrato (Rodríguez-Alcalá et al., 2010b). En otros estudios se ha observado que *Bifidobacterium breve* LMC 017 y LMC 520 convierten eficientemente el sustrato monolinoleína en CLA con la ayuda de proteínas “carriers”, que facilitan la interacción del sustrato con la bacteria. Así, se demuestra la posibilidad de utilizar esta cepa en la producción de yogur enriquecido en CLA (Chung et al., 2008; Choi et al., 2008). Igualmente se ha estudiado la producción de CLA con co-cultivos binarios de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L.*

*rhamnosus* y *B. lactis* con *Streptococcus thermophilus* y distintos prebióticos como maltodextrina, oligofruktosa y polidextrosa en leche fermentada. La mayor producción de CLA (38% más que el cultivo control) se encontró en una leche fermentada por *S. thermophilus*, *L. acidophilus* adicionada de maltodextrina (Oliveira et al., 2009). Por otro lado, la cantidad de CLA puede ser incrementada no sólo mediante su ingesta directa sino también mediante la incorporación a nuestra flora intestinal de bacterias lácticas con alta capacidad para producir CLA. Recientemente se ha observado un aumento del isómero *cis-9 trans-11* CLA en los hígados de ratones y cerdos después de un tratamiento dietético en el que se les suministraba oralmente la bacteria *B. breve* NCIMB 702258 combinada con ácido linoleico. Este trabajo sugiere que la microbiota influye en la composición grasa del hospedador y puede ser manipulada por la administración oral de microorganismos productores de CLA (Wall et al., 2009).

### **Lípidos lácteos bioactivos presentes en la membrana del glóbulo graso.**

En la leche, la membrana del glóbulo graso está compuesta principalmente de lípidos y proteínas de las células epiteliales de la glándula mamaria de la que proceden. Incluyen cantidades significativas de fosfolípidos (PLs) y colesterol. Aunque los PLs constituyen un porcentaje pequeño de los lípidos totales (0,5-1% en leche de vaca y 0,3% en leche humana) están implicados en el metabolismo celular debido a su carácter lipofílico e hidrofílico. Entre los PLs presentes en el glóbulo graso, destacan la fosfatidilcolina (PC) fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS). La mayoría de los esfingolípidos en la leche son glucoceramidas (GluCer), lactosilceramida (LacCer) y esfingomielina (SM) (Rombaut y Dewewettinck 2007). Últimamente estos compuestos han adquirido especial importancia ya que parecen desarrollar importantes funciones como agentes activos para reducir del riesgo de CVD, frente al cáncer de colon, frente a patógenos gastrointestinales y frente a enfermedades como Alzheimer, depresión, y estrés (Spitsberg, 2005). Todo ello ha permitido considerar la membrana del glóbulo graso como un potencial nutraceutico.

Entre los fosfolípidos (PLs) lácteos destacan las esfingomielinas, que representan un tercio de los PLs de leche bovina y un 38% de leche humana. Su actividad esta relacionada con la regulación de la absorción de colesterol por las membranas de células intestinales inhibiendo su absorción (Ohlsson et al., 2010), y se ha comprobado además que cuando la esfingomielina es incluida en la dieta incluso al 0,1 %, reduce significativamente la absorción de colesterol en ratones. Otros esfingolípidos, incluyendo a cerebrósidos, globósidos y gangliósidos así como a sus productos de digestión (ceramidas y esfingosinas) actúan en la regulación celular y en los indicadores plasmáticos ya que reducen el LDL y elevan el HDL-colesterol en suero, así como en el mantenimiento de la estructura de la membrana (generan "microdominios"), pues modulan la

actividad de algunos receptores (factor de crecimiento), y sirven como centros de unión para algunos microorganismos, toxinas microbianas y virus. Se ha comprobado que el consumo de esfingolípidos inhibe estados tempranos de cáncer de colon, en ratones y las ceramidas y otras esfingofórmulas regulan el crecimiento celular, su diferenciación y apoptosis teniendo un importante papel en la inhibición de ciertos procesos de oncogénesis debido a que actúan como segundo mensajero en la señalización celular. Todo esto avala a los esfingolípidos como componentes con una elevada actividad funcional en alimentos.

No obstante, la fracción de PLs no está suficientemente estudiada y en la industria alimentaria se utilizan como emulsionante, formando complejos con proteínas, en la mejora de matrices y en el caso de las ceramidas se usan principalmente en la industria cosmética. Los PLs también tienen un papel importante en la calidad de los productos lácteos durante su procesamiento (Rodríguez-Alcalá y Fontecha, 2010a), y parecen actuar como precursores del sabor debido al alto contenido en AGPI.

### **Oxidación lipídica en lácteos enriquecidos con AGPI.**

Existe actualmente una gran tendencia a suplementar alimentos, especialmente productos lácteos con AGPI, debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, que han sido demostradas en numerosos estudios clínicos y epidemiológicos (Ruxton et al., 2007; Moghadasian et al., 2008). La principal desventaja del enriquecimiento con AGPI es su elevada susceptibilidad a la oxidación, ya que los compuestos de oxidación originados proporcionan olores y sabores no deseados, con umbrales de detección muy bajos. Además, el efecto de los compuestos oxidados en el organismo podrían contrarrestar los efectos beneficiosos aportados por los AGPI de los que provienen. Los productos lácteos *per se* son sustratos estables frente a la oxidación por el elevado contenido de AGS que poseen, pero al adicionar estos AGPI, la estabilidad oxidativa cambia. La percepción de olores y sabores no deseados provocados por la oxidación se produce muy rápidamente y la detección de esta pérdida de propiedades sensoriales es uno de los motivos de rechazo del producto por parte del consumidor.

Los métodos más utilizados para evaluar la oxidación en productos lácteos fortificados con AGPI  $\omega$ -3 son el análisis sensorial, la determinación de compuestos volátiles y el índice de peróxidos. Este último es el método más utilizado para controlar la oxidación lipídica en los aceites ya que pueden ser analizados directamente, en cambio en los alimentos es necesario el paso previo de la extracción lipídica. La determinación de los compuestos volátiles está muy extendida, una de las más utilizadas consiste en una microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME) acoplada a cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS). Se han conseguido identificar los principales compuestos volátiles en leches enriquecidas con aceite de

pescado y muestran una buena concordancia con la determinación del índice de peróxidos y la evaluación sensorial (Jiménez-Álvarez et al., 2008). La cuantificación de los compuestos de oxidación no volátiles, los triglicéridos oxidados, constituye otra medida muy útil para evaluar la oxidación en este tipo de productos. La combinación de la cromatografía de adsorción y exclusión molecular (SPE-HPSEC) permite la determinación de los triglicéridos que hayan sufrido oxidación en alguno de sus restos acilo (Dobarganes et al., 2000). Estudios realizados en nuestro laboratorio con diferentes leches comerciales enriquecidas en AGPI  $\omega$ -3, siguiendo esta metodología, mostraron aumentos significativos en los niveles de triglicéridos oxidados cuando se alcanzó la fecha de caducidad (Martínez-García et al., 2010). Aunque la leche es uno de los sustratos más empleados, otros productos como yogures, leches fermentadas, quesos, natas y mantequillas han sido también enriquecidos con AGPI. El yogur fue uno de los sustratos que menor alteración sensorial sufrió después de la adición de aceite de pescado. Otros autores han mostrado que no se producen cambios en la composición de ácidos grasos o en el perfil de volátiles en leches fermentadas y yogures enriquecidos en AGPI  $\omega$ -3 (Luna et al., 2004). Por ello, es conveniente tener en cuenta en estos productos las diferentes condiciones que se aplican en la industria durante el procesamiento (como la temperatura y tiempo de homogeneización y esterilización) además de la temperatura y tiempo de conservación podrían provocar una oxidación más importante que la observada por métodos tradicionales.

## BIBLIOGRAFIA

- AbuGhazaleh, A. A., Potu R. B. and Ibrahim S. (2009). *Short communication*: The effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosahexaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. *Journal of Dairy Science*, 92:6156-6159.
- Akahoshi, A. , K. Koba , F. Ichinose , M. Kaneko , A. Shimoda , K. Nonaka , M. Yamasaki , T. Iwata , Y. Yamauchi , K. Tsutsumi ,M. Sugano. (2004). Dietary protein modulates the effect of CLA on lipid metabolism in rats. *Lipids* 39 (1):25-30.
- Akmal, S., Göng, S. y Ünal G. (2006). Functional Properties of Bioactive Components of Milk Fat in Metabolism. *Pakistan Journal of Nutrition*. 5: 194-197.
- Albers, R. , R. P. J. van der Wielen , E. J. Brink , H. F. J. Hendriks , V. N. Dorovska-Taran ,I. C. M. Mohede. (2003). Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. *Eur J Clin Nutr* 57 (4):595-603.
- Alonso, L., Cuesta, E. P., & Gilliland, S. E. (2003). Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *J Dairy Sci*, 86(6), 1941-1946.
- Aro, A., S. Mannista, I. Salminen, M. L. Ovaskainen, V. Kataja, M. Uusitupa. (2000). Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutrition and Cancer* 38 (2):151-157.
- Bauman, D.E., Mather, I. H., Wall, R. J., Lock A. L., (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science* 89, 1235-1243.
- Belury, M. A., C. J. Kavanaugh, K.-L. Liu. (2007). Conjugated linoleic acid modulates phorbol ester-induced PPAR- $\delta$  and K-FABP mRNA expression in mouse skin. *Nutrition Research* 27 (1):48-55.
- Benjamin, S. F. Spener. (2009). Conjugated linoleic acids as functional food: An insight into their health benefits. *Nutrition and Metabolism*. 36, 1743-7075
- Castaneda-Gutierrez, E., M.J. de Veth, A.L. Lock, D.A. Dwyer, K.D. Murphy, and D.E. Bauman. 2007. Effect of supplementation with calcium salts of fish oil on n-3 fatty acids in milk fat. *Journal of Dairy Science*, 90, 4149-4156.



- Chilliard, Y., Frédéric Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, M. Doreau. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109, 828-855.
- Choi, N. J., Park, H. G., Kim, Y. J., Kim, I. H., Kang, H. S., Yoon, C. S., Yoon, H. G., Park, S. I., Lee, J. W., & Chung, S. H. (2008). Utilization of monolinolein as a substrate for conjugated linoleic acid production by *Bifidobacterium breve* LMC 520 of human neonatal origin. *J Agric Food Chem*, 56(22), 10908-10912.
- Chung, S. H., Kim, I. H., Park, H. G., Kang, H. S., Yoon, C. S., Jeong, H. Y., Choi, N. J., Kwon, E. G., & Kim, Y. J. (2008). Synthesis of conjugated linoleic acid by human-derived *Bifidobacterium breve* LMC 017: utilization as a functional starter culture for milk fermentation. *J Agric Food Chem*, 56(9), 3311-3316.
- 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*, 94(1), 138-145.
- Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechsler, D., Ryhänen E.L. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International Dairy Journal* 16, 1347–1361.
- Dobarganes, C., Márquez-Ruiz, G. and Velasco, J. Interactions between fat and food during deep-frying. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2000); 102 (8-9): 521-528.
- Elwood P.C., Pickering JE, Givens DI, Gallacher JE. (2010). The Consumption of Milk and Dairy Foods and the Incidence of Vascular Disease and Diabetes: An Overview of the Evidence. *Lipids* 45:925-939
- FDA. (2007). U.S. Code of Federal Regulations (CFR). Title 21—Food and Drugs. U.S. Government Printing Office (GPO); Washington, DC.
- Fuente de la, M.A., Juárez, M. (2004). El ácido linoleico conjugado en la leche y los productos lácteos. *Alimentacion, nutricion y salud*. 11:101-113
- García-Martínez, MC., Rodríguez-Alcalá, L.M., Marmesat, S., Alonso, L., Fontecha, J and Márquez-Ruiz, G. Lipid stability in powdered infant formula stored at ambient temperatures. *Int J Food Sci Tech.*(2010); 45 (11) 2337-2344.
- German J.B., Dillard, C.J. (2006). Composition, Structure and Absorption of Milk Lipids: A Source of Energy, Fat-Soluble Nutrients and Bioactive Molecules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46(1): 57-92.
- German, J.B.(1999).Butyric acid: a role in cancer prevention. *Nutrition Bulletin*. 24:293-9
- Gonthier, C., Mustafa, A.F., Ouellet, D.R., Chouinard P.Y, Berthiaume R. and Petit H.V. (2005). Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: effects on blood parameters and milk fatty acid composition, *Journal of Dairy Science* . 88: 748–756.
- Ha, Y. L., Grimm, N. K., Pariza, M. W. (1987) Anticarcinogens from fried ground beef: heat altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*. 8: 1881-1887.
- Hassig, C.A., Tong, J.K., Schreiber, S.L. (1997). Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. *Chemistry & Biology*. 4:783–789.
- Hennessy, A. A., Ross, R. P., Devery, R., & Stanton, C. (2009). Optimization of a reconstituted skim milk based medium for enhanced CLA production by bifidobacteria. *J Appl Microbiol*, 106(4), 1315-1327.
- Herrmann, J., D. Rubin, R. Hassler, U.Helwig, M.Pfeuffer, A. Auinger, C.Laue, P. Winkler, S. Schreiber, D.Bell, J.Schrezenmeir (2009). Isomer-specific effects of CLA on gene expression in human adipose tissue depending on PPAR2 P12A polymorphism: A double blind, randomized, controlled cross-over study. *Lipids in Health and Disease* 8:35-47.
- Hilmarsson, H., Larusson, L.V. y Thormar, H. (2006) Virucidal effect of lipids on visna virus, a lentivirus related to HIV. *Archives of virology*. 151: 1217-1224.
- Hur, S. J., Park G. B., Joo S. T., (2007). Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. *Livestock Science* 110, 221-229.
- IDF-International Dairy Federation (2007) The health benefits of milk and dairy products. Bulletin International Dairy Federation, 417. Brussels. Belgium.
- Jenkins T.C. and McGuire, M.A. (2006) Major advances in nutrition: impact on milk composition, *Journal of Dairy Science*. 89 1302–1310.
- Jiménez-Álvarez D, Giuffrida F, Golay PA et al. Profiles of volatile compounds in milk containing fish oil analyzed by HSSPME-GC/MS. *Eur J Lipid Sci Technol* (2008); 110:277-283.
- Jouany, J. P., Lassalas, B., Doreau, M., & Glasser, F. (2007). Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured in vitro. *Lipids*, 42(4), 351-360.
- Kay, J.K., Mackle, T.R., Auldist, M.J., Thomson, N.A., Bauman, D.E. (2004) Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *Journal of Dairy Science*. 87:369-78.
- Knekt, P., R. Jarvinen, R. Seppnen , E. Pukkala, A. Aroma. (1996). Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *British Journal of Cancer* 73 (5):687-691.
- Khanal, R.C., Dhiman, T.R. (2004). Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3:72-81.

- Kwak, H.-K. , O. H. Kim , H. Jung ,J. H. Kim. (2009). Effects of conjugated linoleic acid supplementation on inflammatory mediators and immunoglobulins in overweight Korean females. *FASEB J.* 23:563-521.
- Larsson, S. C., L. Bergkvist, A. Wolk. (2005). High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 82 (4):894-900.
- Lecerf, J.M. (2008). Acides gras et maladies cardiovasculaires. *Sciences des Aliments.* 28:53-67.
- Legrand, P. (2008). Intérêt nutritionnel des principaux acides gras des lipides laitiers. *Sciences des Aliments.* 28:34-43.
- Luna P, Fontecha J, Juarez M, Angel de la Fuente M. (2005). Changes in the milk and cheese fat composition of ewes fed commercial supplements containing linseed with special reference to the CLA content and isomer composition. *Lipids* 40 (5),445-54.
- Luna P, Martín-Diana AB, Alonso L ,Fontecha J, De La Fuente M.A., Requena T, Juárez M. Effects of milk fat replacement by PUFA enriched fats on n-3 fatty acids, conjugated dienes and volatile compounds of fermented milks. *Eur J Lipid Sci Technol* (2004); 106:417-423.
- Moghadasian MH. Advances in dietary enrichment with n-3 fatty acids. *Crit Rev Food Sci and Nutr* (2008); 48:402-410.
- 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(4), 355-364.
- Ohlsson, L. Dairy products and plasma cholesterol levels (2010) *Food & Nutrition Research.* 54: 5124-2133.
- Oliveira, R. P., Florence, A. C., Silva, R. C., Perego, P., Converti, A., Gioielli, L. A., & Oliveira, M. N. (2009). Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *Int J Food Microbiol*, 128(3), 467-472.
- Palmquist, D. L., A. L. Lock, K. J. Shingfield, and D. E. Bauman. (2005). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Advances in Food and Nutrition Research*, 50:179–217.
- Park Y., Pariza M.W. (2007) Mechanisms of Body Fat Modulation by Conjugated Linoleic Acid (CLA), *Food Research International* 40: 311-323.
- Parodi, P.W. (2004). Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology.* 59: 3-59.
- Parodi, P.W. (2009). Milk lipids: their role as potential anti-cancer agents, *Sciences des Aliments.* 28:44-52.
- Racine, N. M. , A. C. Watras , A. L. Carrel , D. B. Allen , J. J. McVean , R. R. Clark , A. R. O'Brien , M. O'Shea , C. E. Scott ,D. A. Schoeller. (2010). Effect of conjugated linoleic acid on body fat accretion in overweight or obese children. *Am. J. Clin. Nutr.* 91 (5):1157-1164.
- Ramos, R. , J. Mascarenhas , P. Duarte , C. Vicente ,C. Casteleiro. (2009). Conjugated linoleic acid-induced toxic hepatitis: First case report. *Digestive Diseases and Sciences* 54 (5):1141-1143.
- Riserus, U., Brismar, K., Arner, P., Vessby, B. (2002). Treatment with dietary trans- 10 cis- 12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 25:1516-1521.
- Rodriguez- Alcalá L.M. y Fontecha J. (2007). Hot Topic: Fatty acids and CLA isomers composition of CLA-supplemented dairy-products. Evaluation during processing and storage. *J. Dairy Science* 90, 2083-2090.
- Rodríguez-Alcalá L.M. and Fontecha, J. (2010a). Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction. *Journal of Chromatography A.* 1217, 3063–3066.
- Rodríguez-Alcalá, L. M., Braga, T., Malcata, F. X., Gomes, A., & Fontecha, J. (2010b). Quantitative and qualitative determination of CLA produced by Bifidobacterium and Lactic Acid Bacteria by combining spectrophotometric and Ag+-HPLC techniques. *Food Chem.* (in press).
- Rombaut, R., Dewettinck, K, Camp, J.V (2007). Phospho- and Sphingolipid content of selected dairy products as determined by HPLC coupled to an evaporative light scattering detector (HPLC.ELSD). *Journal of Food Composition and Analysis.* 20 (2007) 308-312.
- Rombaut, R, Camp, J.V, Dewettinck, K (2005). Analysis of Phospho- and Sphingolipids in Dairy Products by New HPLC Methods. *Journal Dairy Science.* 88:482-488
- Ruxton CHS, Reed SC, Simpson JA, Millington KJ. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence. *J Human Nutr Diet* (2007); 20: 275-85.
- Sanz Sampelayo M.R., Chilliard Y., Schmidely P., Boza J. (2007) Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research.* 68:42-63.
- Shahidi, F. (2008). Omega-3 oils: sources, applications, and health effects. In: C. Barrow and F. Shahidi, Editors, *Marine nutraceuticals and functional foods*, CRC Press, Boca Raton, FL pp. 23–61.
- Shingfield, K. J., S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, A. Vanhatalo, P. Huhtanen, and J. M. Griinari. 2008. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *Br. J. Nutr.* 99:971–983
- Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P., & Eyer, H. (2004). Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - a review. *Int Dairy J*, 14, 1-15.

- Silveira, M. B., R. Carraro, S. Monereo, J. Tacbar. (2007). Conjugated linoleic acid (CLA) and obesity. *Public Health Nutrition* 10 (10 A):1181-1186.
- Spitsberg, V.L. (2005). Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *J. Dairy Sci.*, 88, 2289-2294.
- Stanton C., Murphy J., McGrath E. and Devery R. Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. (2003) In: J.L. Sebedio, W.W. Christie and R. Adlof, Editors, *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* vol 2 (, pp. 123–145.
- Steijns, J.M. (2008). Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix?. *International Dairy Journal*. 18: 425–435.
- Thormar, H., Isaacs, E.E., Kim, K.S., Brown, H.R. (1994). Interaction of visna virus and other enveloped viruses by free fatty acids and monoglycerides. *Annals of New York Academy of Science*. 724:465-71.
- Toral, P.G., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Juárez M. and de la Fuente M.A. (2010) Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae . *Journal of Dairy Science* 93, 1655-1667.
- Tricon, S. , G. C. Burdge , E. L. Jones , J. J. Russell , S. El-Khazen , E. Moretti , W. L. Hall , A. B. Gerry , D. S. Leake , R. F. Grimble , C. M. Williams , P. C. Calder ,P. Yaqoob. (2006). Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (4):744-753.
- Wall, R., R. P. Ross , G. F. Fitzgerald ,C. Stanton. (2008). Microbial conjugated linoleic acid production - a novel probiotic trait? *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods* 4 (8):87-97.
- Wall, R., Ross, R. P., Shanahan, F., O'Mahony, L., O'Mahony, C., Coakley, M., Hart, O., Lawlor, P., Quigley, E. M., Kiely, B., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2009). Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am J Clin Nutr*, 89(5), 1393-1401.
- Wang, L.-M., Lv, J.-P., Chu, Z.-Q., Cui, Y.-Y., & Ren, X.-H. (2007). Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Chem*, 103, 313-318.

