



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Ingeniería en Alimentos

Determinación del efecto prebiótico de la harina de semilla de linaza (*Linum usitatissimum* L.), evaluado a través de dos microorganismos probióticos, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* en aerobiosis.

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ciencia de los Alimentos

Macarena Andrea Baeza Vallejo
Valdivia - Chile
2008

PROFESOR PATROCINANTE:

.....

Fernando Figuerola Rivas

Ingeniero Agrónomo. Master of Science en
Food Science.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los
Alimentos

PROFESORES INFORMANTES:

.....

Ociel Muñoz Fariña

Bioquímico, Dr. en Ciencias Químicas
Instituto de Ciencia y Tecnología de los
Alimentos

.....

Haroldo Magariños Hawkins

Técnico en Lecherías, Magíster en Ciencia y
Tecnología de la Leche

Instituto de Ciencia y Tecnología de los
Alimentos.

A Carlos y Carlitos...

*Por su amor, paciencia y apoyo incondicional,
Gracias.*

AGRADECIMIENTOS

A mis “benefactores secretos” quienes con su inmensa generosidad me han enseñado el gran valor de la amistad.

A mi profesor patrocinante Fernando Figuerola por su apoyo y gran paciencia a lo largo de este trabajo.

A la profesora Sade Selaive por su asistencia y colaboración en la parte microbiológica.

A la profesora Andrea Báez por su desinteresada ayuda en la parte estadística.

A los profesores Fernando Asenjo, Marcia Rojas y Mariela Horzella por su permanente colaboración y muy buena disposición durante el trabajo de laboratorio.

A Paola, Paulina, Erica, Sra. Luisa, Gisela del Laboratorio de Servicio por su gran colaboración y buena disposición en la esterilización y lavado de material.

A Otto y Don Tito por su buena disposición y paciencia, quienes muchas veces esperaron que termine mis ensayos para poder cerrar el ICYTAL.

A Gastón Salazar por su buena disposición cuando usé el Laboratorio de la planta piloto.

A Tere, Sra. Iris, Marta y María Luisa por su ayuda y buena disposición en todo lo que durante el transcurso de esta tesis, y a lo largo de la carrera, alguna vez les pedí, procesos administrativos, compras etc.

A Vero, mi nana, ya que sin su ayuda habría sido más difícil la realización de esta tesis.

A mi familia y amigos por haber estado incondicionalmente, y haber sido parte, de una u otra forma, de este proceso.

Finalmente agradezco a Dios por haber puesto a todas estas personas y muchas otras en mi camino.

Gracias.

ÍNDICE MATERIAS

Capítulo		Páginas
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Metodología del cultivo de microorganismos	3
2.1.1	Medios de cultivo	3
2.1.2	Procedimientos	4
2.2	Cinética de crecimiento y muerte de microorganismos	4
2.2.1	Cinética de crecimiento	4
2.2.2	Cinética de muerte	6
2.3	Alimentos funcionales	7
2.4	Prebióticos	7
2.4.1	Características	8
2.5	Probióticos	9
2.5.2	Clasificación / Identificación	12
2.6	Simbiosis	13
2.7	Linaza	14
2.7.1	Historia / procedencia	14
2.7.2	Características	15
2.7.3	Propiedades nutricionales	18
2.7.4	Propiedades funcionales	23
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1	Materiales	24
3.1.1	Materiales y equipos	24
3.1.2	Materia Prima	25
3.1.3	Microorganismos	25
3.2	Métodos	25

3.2.1	Cultivo de microorganismos	25
3.2.1.1	Cultivo madre	25
3.2.1.2	Siembra de cultivos	25
3.2.1.2.1	<i>Lactobacillus casei</i>	25
3.2.1.2.2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	26
3.2.1.3	Diluciones y siembra	26
3.2.2	Análisis químico de la harina de linaza	27
3.2.2.1	Determinación de humedad	27
3.2.2.2	Determinación de proteínas	28
3.2.2.3	Determinación materia grasa	28
3.2.2.4	Determinación de fibra cruda	28
3.2.2.5	Determinación de cenizas	28
3.2.3	Diseño experimental	28
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
4.1	Harina de linaza	29
4.2	Crecimiento de microorganismos	30
4.2.1	<i>Lactobacillus casei</i>	30
4.2.2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	33
4.2.3	<i>L. casei</i> en relación a <i>L. acidophilus</i>	36
4.3	Viabilidad ($>10^6$)	37
4.3.1	<i>Lactobacillus casei</i>	37
4.3.2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	37
5	CONCLUSIONES	39
6	RESUMEN / SUMMARY	40
7	BIBLIOGRAFÍA	42
	ANEXOS	47

ÍNDICE CUADROS

Cuadro		Páginas
1	Tabla comparativa de la linaza café y amarilla para humedad, proteína y ácidos grasos	17
2	Composición aminoacídica de la linaza	18
3	Contenido vitamínico de la linaza	22
4	Contenido mineral de la linaza	23
5	Especificaciones realización cultivo madre	25
6	Especificaciones siembra <i>Lactobacillus casei</i>	26
7	Especificaciones siembra <i>Lactobacillus acidophilus</i>	26
8	Especificaciones realización de las distintas diluciones	26
9	Ejemplo de siembra, para recuento de microorganismos	27
10	Valores promedio y desviación estándar para los componentes analizados para harina de linaza	30
11	Valores promedio, de tres repeticiones, para el crecimiento de <i>L. casei</i> en los dos medios estudiados a través del tiempo	31
12	Valores promedio, para tres repeticiones, para el crecimiento de <i>L. acidophilus</i> en los dos medios estudiados a través del tiempo	33

ÍNDICE FIGURAS

Figuras		Páginas
1	Curva de crecimiento microbiano	5
2	Morfología <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>casei</i>	13
3	a: morfología del lino b: cultivo de linaza	15
4	1: estructura de semilla de linaza 2: semilla de linaza café y amarilla	16
5	Clasificación de fitoestrógenos	20
6	Línea de flujo del experimento	27
7	a: tamices A.S.T.M E-11 b: harina de linaza una vez finalizada la molienda	29
8	Curva promedio para crecimiento de <i>L. casei</i> en medio con harina de linaza y blanco	31
9	Curvas de tendencia para el crecimiento de <i>L. casei</i> en los medios en estudio	32
10	Curva promedio para crecimiento de <i>L. acidophilus</i> en medio con harina de linaza y blanco	34
11	Curvas de tendencia para el crecimiento de <i>L. acidophilus</i> en los medios en estudio	35
12	<i>L. acidophilus</i> (a) y <i>L. casei</i> (b) observados en el microscopio (100x)	37
13	Viabilidad de <i>L. casei</i> en el tiempo	37
14	Viabilidad de <i>L. acidophilus</i> en el tiempo	38

ÍNDICE ANEXOS

Anexo		Páginas
1	Curvas de crecimiento para <i>L. casei</i> en harina de linaza (tres repeticiones) y curvas de crecimiento para <i>L. casei</i> en agua destilada (blanco) (tres repeticiones)	48
2	Análisis de regresión para el crecimiento de <i>L. casei</i> en harina de linaza y Análisis de regresión para el crecimiento de <i>L. casei</i> en agua destilada (blanco)	49
3	Curvas de crecimiento para <i>L. acidophilus</i> en harina de linaza (tres repeticiones) y curvas de crecimiento para <i>L. casei</i> en agua destilada (blanco) (tres repeticiones)	50
4	Análisis de regresión para el crecimiento de <i>L. acidophilus</i> en harina de linaza y Análisis de regresión para el crecimiento de <i>L. acidophilus</i> en agua destilada (blanco)	51
5	Análisis de covarianza del experimento	52

1. INTRODUCCIÓN

Antes se creía que el alimentarse era esencial sólo para entregar los nutrientes y energía necesarios para mantener los procesos vitales del organismo humano, sin embargo, hoy impera el concepto de una alimentación saludable y equilibrada.

Debido al conocimiento de los factores que intervienen en el desarrollo de enfermedades metabólicas tales como diabetes, hipertensión, resistencia a la insulina, obesidad, cáncer entre otras, se ha incrementado la demanda por productos alimenticios más nutritivos que además sean beneficiosos para la salud, los llamados productos funcionales o nutracéuticos, los cuales se podrían definir como aquellos productos alimenticios que además de su valor nutritivo intrínseco, incluyen principios activos propios o adicionados, que ayudan a mantener el estado general de salud del organismo, y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en las personas.

Es así como se plantea la necesidad de estudiar uno de los alimentos naturales cada día más valorizado por sus propiedades nutricionales, la linaza, la cual es considerada un alimento funcional debido a que entre sus componentes se destacan un alto contenido de fibra, de ácidos grasos poliinsaturados principalmente omega 3 y un bajo porcentaje de ácidos grasos saturados.

Además de esto, se postula que la linaza es un alimento prebiótico, el cual es utilizado por microorganismos probióticos, los cuales, como producto de su actividad metabólica sintetizan carbohidratos de cadena corta que son beneficiosos para el organismo.

Hipótesis

La linaza tiene un efecto prebiótico sobre microorganismos probióticos del tipo *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*.

Objetivo general

Evaluar el efecto prebiótico de la linaza molida, a través del crecimiento de dos especies de microorganismos probióticos en aerobiosis.

Objetivos específicos

- Establecer la curva de crecimiento y de muerte de *L. casei* y *L. acidophilus* en un medio con una suspensión de harina de linaza en agua y en agua pura, este último como blanco de comparación.
- Establecer la viabilidad de *L. casei* y *L. acidophilus* en el tiempo del ensayo.
- Determinar el efecto prebiótico de la linaza, sobre *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Metodología del cultivo de microorganismos.

El requerimiento de los distintos microorganismos en cuanto a la composición del medio de cultivo y a las demás condiciones ambientales son muy variables. Es por esto que el medio debe cumplir como mínimo la siguiente condición: han de estar presentes todos los elementos implicados en la constitución del material celular en forma de compuestos utilizables (SCHLEGEL, 2007).

2.1.1 Medios de cultivos. Según PISABARRO (2003) los medios de cultivo requieren proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo de los diferentes microorganismos.

Se pueden clasificar en sintéticos (o definidos) y complejos (o no definidos). Los medios sintéticos tienen una composición química definida, a través de la cual se pretende determinar para cada microorganismo un medio mínimo, que contenga únicamente los nutrientes necesarios para su crecimiento. Por su parte, los medios complejos son aquellos que por falta de información de los requerimientos nutricionales de algún determinado microorganismo es necesario agregarle mezclas de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.) algunas veces poco definidos (SCHLEGEL, 2007).

Por otra parte, pueden ser líquidos o bien sólidos si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos (normalmente agar) (PISABARRO, 2003).

tamaño doble del inicial y su división por bipartición de la bacteria para dar lugar a dos células hijas (PISABARRO, 2003).

mientras limitan el de otros; diferenciales: cuando alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismo; selectivo-diferenciales: cuando combinan las dos características anteriores y medios de enriquecimiento: que permiten aislar un tipo determinado de microorganismo a partir de una mezcla de una población mixta de gran tamaño (PISABARRO, 2003).

2.1.2 Procedimiento. DESAI, *et al* (2004) estudiaron la sobrevivencia y actividad de *Lactobacillus* probióticos en leche descremada que contenía prebióticos, los autores sostienen que los microorganismos probióticos (*Lactobacillus*) tienen un crecimiento mayor en un medio MRS-lactosa que en uno MRS- glucosa.

Por lo tanto utilizaron un medio con MRS-lactosa y le adicionaron 5% de prebiótico, el medio fue pasteurizado a 70° C por 15 minutos y luego inoculado con el determinado microorganismo probiótico en estudio. La incubación fue a 37° C durante 48 horas.

2.2 Cinética del crecimiento y muerte de microorganismos.

Tanto el crecimiento como la muerte de los microorganismos condicionan este estudio por lo que a continuación se presentan los conceptos de crecimiento y muerte de microorganismos.

2.2.1 Cinética de Crecimiento. Se entiende por crecimiento microbiano el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. (PISABARRO, 2003), o sea al incremento en el número de células y de la masa celular (SCHLEGEL, 2007). Por tanto, no se refiere al crecimiento de un único microorganismo (*ciclo celular*) sino al demográfico de una población.

Se denomina ciclo celular al proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del material de la bacteria, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por bipartición de la bacteria para dar lugar a dos células hijas (PISABARRO, 2003).

El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos sus individuos. Este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular (PISABARRO, 2003).

En relación a la cinética del crecimiento se considera a la población bacteriana como un sistema autocatalítico multiplicativo, siguiendo una cinética de primer orden. En la FIGURA 1 se presentan las fases normales del crecimiento microbiano.

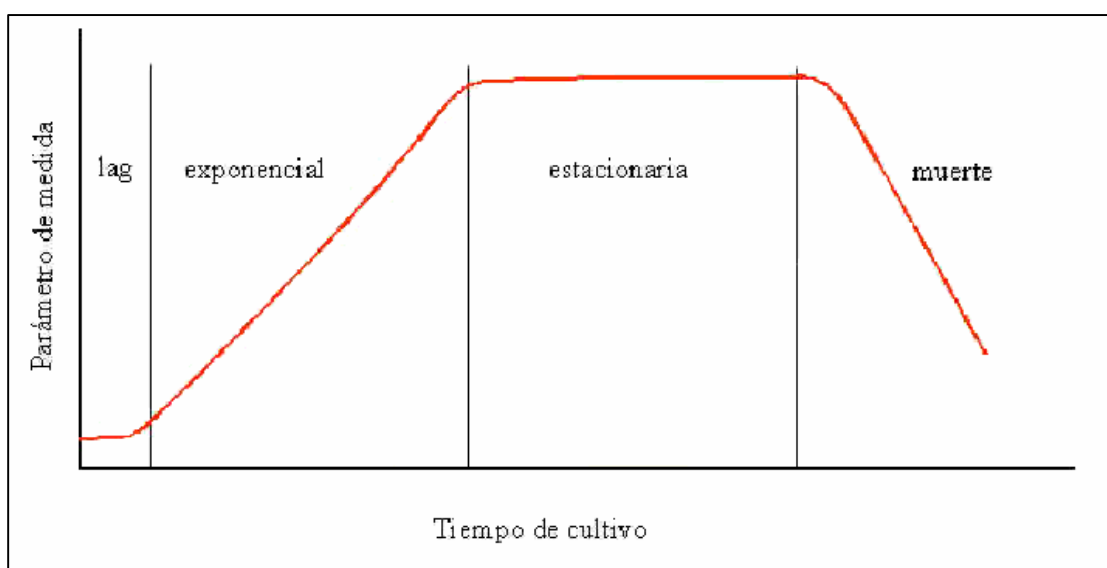


FIGURA 1 Curva de crecimiento microbiano

Fuente: PISABARRO (2003)

- **Fase lag o de adaptación:** en la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial. (PISABARRO, 2003; SCHLEGEI, 2007). La duración de esta fase depende del cultivo previo, de la edad del inóculo, y de lo adecuado del medio de cultivo (SCHLEGEI, 2007).
- **Fase exponencial o logarítmica:** donde la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima (PISABARRO, 2003; SCHLEGEL, 2007).

- **Fase estacionaria:** en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea limitante para el crecimiento microbiano, por la baja en la presión de O_2 o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento. En esta fase pueden utilizarse aún materiales de reserva, descomponerse parte de los ribosomas y sintetizar enzimas. Mientras las células puedan obtener la energía necesaria por respiración de materiales de reserva o proteínas, las bacterias permanecerán largo tiempo vivas (PISABARRO, 2003; SCHLEGEL, 2007).
- **Fase de muerte:** se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo. En el caso de *Lactobacillus* es relativamente clara la condición de producir y acumular ácidos, lo cual hace que las células viables desciendan exponencialmente (PISABARRO, 2003; SCHLEGEL, 2007).

2.2.2 Cinética de Muerte. Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse. El fundamento de esta definición es que si un microorganismo ha perdido la capacidad de dividirse no podrá formar una colonia sobre un medio de cultivo y no será posible detectar su presencia por los métodos microbiológicos tradicionales. Es decir, cuando no se produce aumento en el número de microorganismos no hay crecimiento. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas (PISABARRO, 2003).

Por otra parte, hay que considerar que la capacidad de multiplicación (crecimiento) de un microorganismo puede verse transitoriamente afectada por lesiones o por las condiciones físicas o químicas del entorno. En estos casos, se puede considerar como muertos microorganismos que pueden reanudar su crecimiento si las condiciones son de nuevo favorables (PISABARRO, 2003).

2.3 Alimentos Funcionales.

Los expertos definen como alimentos funcionales a los alimentos o componentes alimenticios que proveen beneficios a la salud más allá de la nutrición básica. Los alimentos funcionales proveen nutrientes esenciales más allá de los necesarios para mantenerse, crecer y desarrollarse, además proveen otros componentes biológicamente activos que tienen un impacto beneficioso para la salud o presentan efectos fisiológicamente deseables. (CLYDESDALE, 2004)

BERNER Y O`DONNELL (1998), sugieren una clasificación de acuerdo a la función que realizan los alimentos para convertirlos en funcionales (ya sea añadiendo algún ingrediente extra y/o realizando algún proceso tecnológico específico) de la manera siguiente:

- Adición de fitoquímicos
- Adición de probióticos
- Adición de prebióticos
- Adición de péptidos o proteínas bioactivas
- Adición de fibra dietaria
- Adición de ácidos grasos Omega 3
- Remoción de alergenos

Ciertos alimentos presentan una gran diversidad de funciones especiales. Algunas de estas funciones pueden dar origen a la reducción del riesgo o a la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades, la mejoría de algunas funciones corporales, y a su utilización como suplemento para dietas especiales (SILVA Y VERDALET, 2003).

2.4 Prebióticos.

Son ingredientes alimenticios fermentables, no digeribles que actúan beneficiosamente sobre los microorganismos de la flora intestinal, provocando una estimulación selectiva del crecimiento y la actividad de una a varias bacterias en el colon (ROBERFROID, 1999; ZIEMMER Y GIBSON, 1998; ROBERTFROID, 2000).

Del mismo modo, ROSADO Y ONDARZA (2003), al igual que GIBSON Y ROBERTFROID (1995) se refieren a prebiótico como un ingrediente alimenticio no digerible que afecta benéficamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y la actividad de una o varias bacterias presentes en el colon, mejorando así la salud del huésped.

Características. Según ROSADO Y ONDARZA (2003) para que un ingrediente alimenticio pueda ser clasificado como prebiótico debe cumplir los siguientes requisitos: no debe ser hidrolizado u absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal; debe ser un sustrato selectivo tanto para una o varias bacterias comensales benéficas al colon, que son estimuladas en su crecimiento y metabólicamente activas; deben ser capaces de alterar la flora en favor de una composición más saludable.

Los principales sustratos para el crecimiento bacteriano son carbohidratos dietéticos que han escapado a una digestión en el tracto superior gastrointestinal. Entre 10 a 60 g/día de éstos carbohidratos alcanzan a llegar al colon. Cerca de 8-40 g/día de almidón resistente contribuyen en gran parte como sustrato fermentable disponible, seguido por cerca de 8-18 g/día de polisacáridos diferentes al almidón, 2-10 g/día de carbohidratos no absorbidos, 2-8 g/día de oligosacáridos y entre 2-3 g/día de carbohidratos endógenos (VAN LOO *et al*, 1995).

La lactosa, es una fuente prebiótica bien conocida; sin embargo existen otras fuentes de prebióticos diferentes a los derivados de la leche (SILVA Y VERDALET, 2003).

Entre los posibles candidatos se encuentran, los carbohidratos no digeribles (oligo y polisacáridos), algunos péptidos y proteínas, ciertos lípidos (tanto ésteres como éteres). Debido a su estructura química, dichos compuestos no logran ser adsorbidos por la parte superior del tracto gastrointestinal, ni hidrolizados por enzimas humanas. Tales ingredientes pueden ser llamados “alimentos colónicos”, entre los cuales los carbohidratos no digeribles se encuentran de manera natural. Entre estos últimos se destacan: el almidón resistente, los polisacáridos vegetales, hemicelulosas, pectinas,

gomas, así como los oligosacaridos no digeribles (DELZENNE Y ROBERFROID, 1994).

Realmente no importa la fuente de la cual provengan los prebióticos, estos siempre producen efectos beneficiosos sobre los probióticos. (SILVA Y VERDALET, 2003).

Aunque pueden ser clasificados como alimentos colónicos, no todos pueden ser considerados prebióticos. Sólo aquellos que tengan la capacidad de ser selectivos (ROSADO Y ONDARZA, 2003). En general, los alimentos colónicos estimulan en el colon el crecimiento y/o actividad metabólica de diferentes especies bacterianas, tanto dañinas como benéficas (MACZULAK *et al*, 1993; WANG Y GIBSON, 1993), por lo tanto es necesario una actividad selectiva sobre microorganismos probióticos, para considerar a una sustancia como prebiótica. (ROSADO Y ONDARZA 2003)

El metabolismo de los carbohidratos depende de una cooperación entre diferentes enzimas, así como de una variada presencia de especies de bacterias, además de un sin número de factores fisicoquímicos que pueden influir en el patrón y grado de fermentación de substratos particulares (ROSADO Y ONDARZA, 2003), entre dichos factores están: la competencia por nutrientes, el ambiente fisicoquímico del intestino grueso, algunas condiciones del huésped, interacciones metabólicas entre bacterias y preferencias dietéticas individuales (ROWLAND Y TANAKA, 1993).

Por lo tanto la incorporación de prebióticos específicos como carbohidratos dietéticos, logra estimular el crecimiento de ciertos microorganismos benéficos en el huésped (ROWLAND Y TANAKA, 1993).

2.5 Probióticos.

FAO (2006) propuso la siguiente definición para probiótico: un monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped, mejorando las propiedades de la flora autóctona. Del mismo modo ZIEMMER Y GIBSON (1998) y ROBERFROID (1999) se refieren a probiótico como un microorganismo vivo que proporciona efectos benéficos sobre la

flora intestinal provocando un mejor balance microbiológico. Por su parte GUARNER Y SHAAFSMA (1998) los define como microorganismos vivos los que mediante ingestión en ciertas cantidades, ejercen beneficios a la salud por encima de una nutrición general inherente.

Por su parte TARANTO *et al* (2005) define alimentos probióticos, como aquellos productos alimenticios que al contener microorganismos probióticos ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y además pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. Son catalogados dentro de los alimentos funcionales, concepto que tiene relación entre alimentación y salud y la posibilidad de contar con reguladores biológicos (donde las bacterias lácticas juegan un papel protagónico) que disminuyan el riesgo de contraer enfermedades. Se definen también como "alimentos susceptibles de producir un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, de mejorar el estado de salud y de bienestar y de reducir el riesgo de una enfermedad"

ROSADO Y ORDANZA (2003), destacan los criterios que debe reunir un probiótico para ser considerado como útil: deberá ser producido en forma viable y en gran escala, durante su uso y almacenamiento, deberá permanecer viable y estable, deberá sobrevivir en el ecosistema intestinal y el huésped deberá verse beneficiado por albergar al probiótico.

2.5.1 Características. Según MORIÑIGO (2001) Los criterios que debe cumplir un probiótico incluyen que la cepa sea: de origen humano, segura para su uso y estable en ambiente ácido y en presencia de sales biliares. Estos criterios los cumplen fundamentalmente los lactobacilos y las bifidobacterias. Además deben establecerse en el colon y volverse activos, y deben adherirse al epitelio intestinal para sobreponerse a las condiciones de stress (ROSADO Y ONDARZA 2003). Se cree que la adhesión al epitelio es un mecanismo clave para que los probióticos puedan interactuar con el tejido linfático asociado al intestino (MORIÑIGO, 2001).

Dentro de los factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad y sobrevivencia de las células se encuentra el pH, las interacciones antagónicas entre especies, la composición química del medio de cultivo y la temperatura, entre otras (VINDEROLA *et al*, 2000; KRISTO *et al*, 2003).

Por su parte SHAH (2001) sostiene que para el desarrollo de microorganismos probióticos se deben considerar entre otros factores los siguientes:

- **La viabilidad de organismos probióticos:** las bacterias probióticas deben ser viables y disponibles en altas concentraciones, típicamente 10^6 ufc/g de producto. Muchos estudios relacionados con este tema se han llevado a cabo con concentraciones más bajas de microorganismos, sin embargo, es dudoso que concentraciones más bajas de 10^6 puedan presentar beneficios probióticos. Muchos factores se han presentado como responsables de la pérdida de viabilidad de los organismos probióticos, tales como: acidez de los productos, acidez producida durante el almacenamiento en frío, nivel de oxígeno en los productos, permeabilidad al oxígeno a través del empaque y sensibilidad a sustancias antimicrobianas producidas por otras bacterias, entre otras.
- **Acidez y tolerancia a la bilis:** uno de los más importantes criterios para seleccionar los organismos probióticos es su habilidad para sobrevivir en productos ácidos y en el estómago, donde el pH puede llegar a ser menor a 1.5. Análogamente, los organismos que pueden sobrevivir las concentraciones de bilis usualmente son encontrados en el intestino.
- **Antagonismo entre bacterias:** *L. acidophilus* y *L. casei* producen ácido láctico como el último producto de la fermentación. Con adición de ácido láctico y ácido acético, los microorganismos probióticos producen otros ácidos, como ácido cítrico y ácido hipúrico. Las bacterias ácido lácticas también producen peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocina como sustancias antimicrobianas.
- **Propiedades adherentes:** la adherencia es uno de los criterios de selección de bacterias probióticas más importantes; los deseados efectos de los microorganismos

probióticos son producidos sólo si son capaces de adherirse, colonizar y multiplicarse en el intestino. La habilidad de las bacterias probióticas para adherirse en el intestino les dará la posibilidad de ganar la competencia contra “las bacterias poco amistosas” para reemplazarlas en el intestino. La adherencia en las paredes celulares del intestino es un importante prerrequisito para la colonización en el tracto intestinal.

Por su parte TARANTO *et al* (2005) sostiene que los requisitos principales para los alimentos probióticos es que los microorganismos permanezcan viables y activos en el alimento y durante el pasaje gastrointestinal para garantizar así su potencial efecto benéfico en el huésped.

2.5.2 Clasificación / identificación. Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y, *Bifidobacterium*. (FAO 2006) Aunque también son considerados probióticos algunos *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* entre otros (TARANTO *et al*, 2005).

Lactobacillus se han utilizado desde hace tiempo como probióticos sin que se hayan determinado riesgos para los seres humanos, y ésta sigue siendo la mejor prueba de su inocuidad. (FAO, 2006)

A continuación se presentan las características principales de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*.

La temperatura óptima de crecimiento para *Lactobacillus acidophilus* es entre 35 y 38 ° C, mientras que para *Lactobacillus casei* entre 30 y 35 ° C. Ambos microorganismos crecen de manera óptima en agar MRS. (LEE *et al*, 1999)

Los efectos reportados para *Lactobacillus acidophilus* son: estimulación del sistema inmunológico, balance de la flora intestinal, reducción de enzimas fecales, antitumoral, prevención de la diarrea del viajero (cuando se mezcla con *B. Bifidum*), prevención de otro tipos de diarrea, reducción del colesterol serológico, coadyuvante de vacunas, prevención de la iniciación del cáncer, prevención del cáncer de colon, prevención del

daño al hígado inducido por el alcohol, control de la inflamación intestinal y las reacciones de hipersensibilidad en infantes con alergias a alimentos. Del mismo modo, los efectos reportados para *Lactobacillus casei* son: estimulación del sistema inmunológico, balance de la flora intestinal, reducción de enzimas fecales, antitumoral, prevención de la diarrea del rotavirus, prevención y tratamiento para otras diarreas, fortalecimiento de las defensas naturales, prevención de caries dental, prevención de enfermedad de Crohn. (SILVA Y VERDALET, 2003)

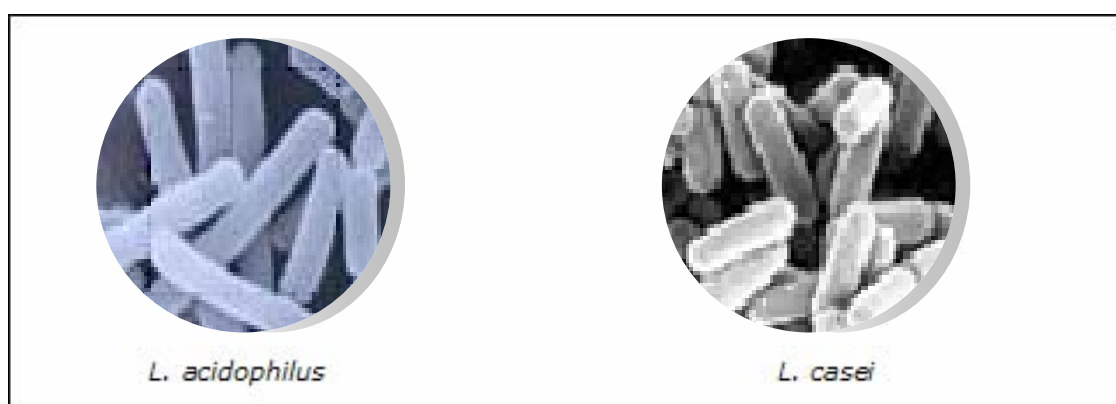


FIGURA 2: Morfología *Lactobacillus acidophilus* y *casei*

2.6 Simbiosis.

La simbiosis se define como la mezcla de probióticos y prebióticos (ROBERFROID, 1999. SHREZENMEIR Y DE VRESE 2001) que afecta beneficiosamente al huésped mejorando la supervivencia y la implantación de suplementos dietéticos a base de microorganismos vivos en el aparato digestivo del huésped (FAO, 2006).

SHAH (2001) plantea que combinando prebióticos con probióticos que modifican la flora intestinal tienen el potencial de proveer un máximo de beneficios a la salud.

2.7 Linaza.

Nombre botánico de la linaza, *Linum usitatissimum L.* de la familia Linaceae.

2.7.1 Historia / Procedencia. Los humanos han consumido linaza por miles de años. Es probable que el cultivo de la linaza haya comenzado en los valles fértiles de Mesopotamia antigua hace aproximadamente 8.000 a 10.000 años. La linaza era valorada en los tiempos antiguos y pre-modernos como alimento y medicina (MORRIS. 2003).

Para OOMAH (2001) la linaza no es un cultivo nuevo, es nativo del oeste de Asia y del mediterráneo, como fuente de fibra la linaza se a cultivado desde antes del 5000 AC. Fue usada por lo egipcios para hacer su vestimenta y para envolver sus momias. Luego sus propiedades medicinales las dio a conocer Hipócrates quien la recomendaba para las inflamaciones de las mucosas.

Entre los años 80 y 90, la producción de lino en Argentina (un importante productor) disminuyó alrededor de un 70%, desde 800 mil hectáreas aproximadamente en los años 80 a 265 mil hectáreas en los 90, esto se debió principalmente a la sustitución del aceite de lino, para la fabricación de pinturas, por derivados sintéticos del petróleo y la disolución de la URSS, a principios de los 90, principal comprador del aceite de linaza argentino. También influyó la entrada de trigo mexicano de alto rendimiento, el cual compitió en superficie con el lino. Sin embargo en los períodos 2002/2003 y 2003/2004 hubo un cierto crecimiento lo que se debió bajos costos de siembra, a las expectativas de un buen precio final y por la disminución del trigo en los períodos 2000/2001 y 2001/2002 (PICCA y DEVOTO, 2003).

En un artículo publicado el 26 de diciembre de 2006, en el diario digital ADN MUNDO, señalan que para el período 2006/2007 aumentaría la oferta de semilla de lino pese a la caída productiva de la misma. Dicha caída se debe a una menor superficie de siembra y por peores rendimientos en los principales países productores, especialmente en Canadá y Estados Unidos, India y la Unión Europea. Mientras que países como China y Argentina mantendrán sus niveles de producción. Debido a lo

anterior la producción mundial caería alrededor de un 10% con respecto al período 2005/2006. Sin embargo, la comercialización de linaza aumentará en aproximadamente un 7%, donde los principales protagonistas son Canadá y Estados Unidos con un 93% del comercio mundial. Siendo el mayor importador de semilla la unión Europea y el mismo Estados Unidos. Lo anterior es posible gracias a que en este período se cuenta con mayores stocks iniciales.

En Chile por su parte la producción de lino ha disminuido notablemente. En conversaciones con los principales productores de telas de lino, señalan que la totalidad del lino destinado a textil en este momento es importado. En relación al lino para semilla es cultivado principalmente en la región de la Araucanía, Chile.

2.7.2 Características. La linaza o semilla de lino es un cultivo anual de flores azules (FIGURA 3) muy versátil. Compuesto por plantas herbáceas, textiles y oleaginosas. Los tallos son utilizados en la industria textil y las semillas son utilizadas para alimentación humana y animal. Son cosechadas y posteriormente tamizadas a través de una malla fina, lo que resulta en un conjunto uniforme de semillas enteras y limpias (consideradas 99,9% puras). (MORRIS, 2003)

El fruto de la linaza es una cápsula esférica, la cual en su interior tiene dos semillas en cada uno de sus cinco carpelos. (COSKUNER, 2005)

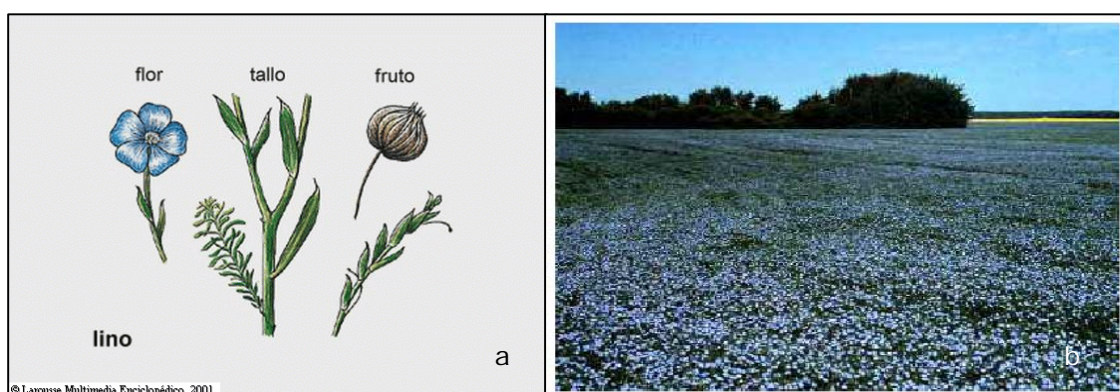


FIGURA 3 Morfología del lino (a) Cultivo linaza (a)

La semilla de linaza es plana y ovalada con un borde puntiagudo. Es un poco más grande que la semilla de sésamo y mide cerca de 2,5 x 5,0 x 1,5 mm. Tiene una textura tostada y chiclosa y un sabor agradable a nuez. (MORRIS. 2003), BEST (2004) le atribuye también un sabor a cereal tostado.

La semilla está compuesta por un embrión o germen (4%), un delgado endospermo (36% entre endospermo y capa externa), y dos cotiledones (55%) revestidos de una capa externa llamada espermodermo (FIGURA 4). Su superficie usualmente es suave y brillante (DAUN *et al* 2003) y esta puede variar de color (desde café rojizo hasta amarillo brillante) según la variedad, el cual se determina a través de la cantidad de pigmento en la cubierta exterior de la semilla (MORRIS. 2003).

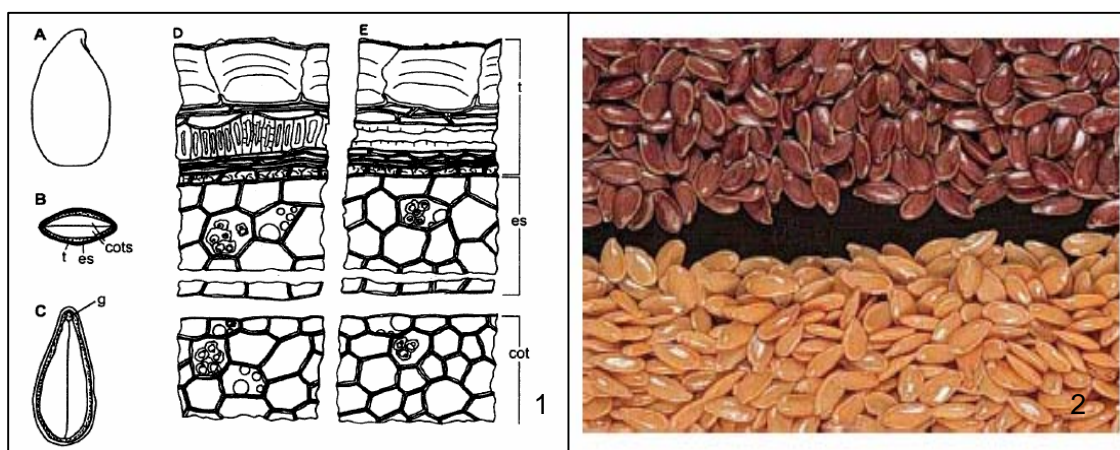


FIGURA 4 Estructura de la semilla de linaza (1) A-C tres vistas de la semilla de linaza (aprox. 7x). A: semilla. B: sección transversal. C: sección longitudinal. D: sección transversal (x400) y E: sección longitudinal (x400) muestra las células de la testa, endospermo y cotiledón. Abreviaciones: cot(s): cotiledón, t: testa, g: germen, es: endospermo. Fuente: DAUN. *et al* (2003), Semilla de linaza café y amarilla (2)

Las semillas de linaza se diferencian principalmente por su color: cafés y amarillas. La semilla de color café, se produce mayormente en Canadá, es rica en ácido α -linoleico (AAL), ácido graso omega-3 (CUADRO11). Mientras que la semilla de color amarillo puede ser de dos tipos. El primer tipo, es una variedad desarrollada en Estados Unidos

denominada omega, la cual es tan rica en AAL como la linaza café. El segundo tipo es una variedad de linaza totalmente diferente denominada Solin, la cual es baja en AAL. La linaza Solin fue desarrollada para el mercado de aceites para cocina. Así la linaza café y Omega se venden en tiendas naturistas, mientras que la linaza Solin no se vende directamente a los consumidores (MORRIS, 2003).

CUADRO 1 Tabla comparativa de la linaza café y amarilla para humedad, proteína y ácidos grasos.

Componente	Linaza café	Linaza Amarilla
Humedad (%)	7,7	7,0
Proteína * (g/100g)	22,3	29,2
Grasa total (g/100g)	44,4	43,6
Ácidos grasos saturados **	8,7	9,0
Ácidos grasos monoinsaturados**	18,0	23,5
Ácidos grasos poliinsaturados **		
Ácido alfa-linolénico	58,2	50,9
Ácido linoléico	14,6	15,8

* % nitrógeno x 6,25

** % del total de ácidos grasos

Fuente: MORRIS (2003)

2.7.3 Propiedades nutricionales. Según HALL *et al* 2006. El contenido de proteína de la linaza puede variar entre 10,5% y 31%, esta variación la atribuye entre otras cosas a la genética del cultivo y el ambiente donde se desarrolla, además del factor de conversión en la determinación del contenido de proteína, por ejemplo algunos autores utilizan para el cálculo de nitrógeno proteico para las variedades de Canadá un factor de 6,5, mientras otros utilizan para el cálculo del contenido de proteína de la linaza un factor de 5,41.

MORRIS (2003) detalla el patrón aminoacídico de la proteína de linaza, que resulta ser similar al de la proteína de soya (CUADRO 2), la cual es considerada como la proteína vegetal más nutritiva. Aparentemente existe una diferencia mínima entre el contenido

de aminoácidos de las proteínas correspondientes a las dos variedades de linaza, amarilla y café (CUADRO 2).

CUADRO 2 Composición aminoacídica de la linaza

Aminoácidos	Variedades de linaza		Harina de soya (g/100 g de proteína)
	Linaza café (g/100 g de proteína)	Linaza amarilla (g/100 g de proteína)	
Alanina	4,4	4,5	4,1
Arginina	9,2	9,4	7,3
Ácido aspártico	9,3	9,7	11,7
Cistina	1,1	1,1	1,1
Ácido Glutámico	19,6	19,7	18,6
Glicina	5,8	5,8	4,0
Histidina*	2,2	2,3	2,5
Isoleucina*	4,0	4,0	4,7
Leucina*	5,8	5,9	7,7
Lisina*	4,0	3,9	5,8
Metionina*	1,5	1,4	1,2
Fenilalanina*	4,6	4,7	5,1
Prolina	3,5	3,5	5,2
Serina	4,5	4,6	4,9
Treonina*	3,6	3,7	3,6
Triptofano*	1,8	NR	NR
Tirosina	2,3	2,3	3,4
Valina*	4,6	4,7	5,2

*Aminoácidos esenciales para los humanos

NR: no reportado

Fuente: MORRIS (2003)

Todas las variedades de linaza tienen un patrón aminoacídico similar. Tiene altas cantidades de arginina, ácido aspártico y ácido glutámico, mientras que lisina,

metionina y cistina son los aminoácidos limitantes (HALL *et al* 2006). Sin embargo, en el CUADRO 1 se observa que el contenido de lisina no está por debajo de otros aminoácidos. No obstante al comparar el contenido de lisina de la linaza con el contenido de la soya, presenta diferencias de un 2%. Lo cual es muy importante por la esencialidad de dicho aminoácido.

Por su parte BEST (2004) se refiere a la linaza como una semilla oleaginosa, que contiene el 40 % del peso en aceite del cual 95 % son ácidos grasos insaturados, y el 55% omega-3, además está compuesta de 20% de proteínas, 27% de fibra dietética y 2 % de antioxidante polifenólicos, incluyendo lignanos fitoestrógenos. Generalmente la proteína decrece a medida que el contenido de aceite aumenta (HALL *et al*, 2006).

La linaza es el único alimento en el que su contenido de omega-3 supera ampliamente su contenido de omega-6 (BEST. 2004), presentando un 57% de las grasas totales de ácido α -linolénico (omega -3) y un 16% de las grasas totales de ácido linoléico (omega-6) (MORRIS, 2003).

La linaza como otras oleaginosas, no contiene gluten. Además es baja en azúcares y almidones, suministrando únicamente 1 gramo (g) por cada 100 g. Por esta razón, la linaza contribuye poco a la ingestión total de carbohidratos (MORRIS 2003).

A diferencia de BEST (2004), MORRIS (2003) afirma que la fibra representa alrededor del 28% del peso de las semillas de linaza sin desgrasar. Además, menciona que las mayores fracciones de fibra en la linaza son: la celulosa, que es la principal estructura material en las paredes celulares de las plantas; mucílagos, que son un tipo de polisacárido que se torna viscoso una vez que se mezcla con agua; y la lignina, que es una fibra altamente ramificada que se encuentra dentro de las paredes celulares de plantas leñosas. Las ligninas están relacionadas con un componente similar denominado: lignanos. Ambas son partes de las paredes celulares de las plantas y están asociadas con los carbohidratos de las paredes celulares. Los lignanos son fitoquímicos (químicos vegetales) que son estudiados activamente, ya que se les atribuye un papel importante en la nutrición humana, particularmente en la prevención del cáncer. (MORRIS, 2003).

El salvado de linaza, entendiéndose por salvado la cáscara del grano después de la molienda, contiene entre sus componentes 55% de la fibra dietética y 6% de los fitoestrógenos bajo la forma de secoisolariciresinol diglucosido (SDG) (BEST, 2004). Lo anterior permite deducir que la harina de linaza, a partir de la semilla entera, contiene dicho fitoestrógeno muy importante a la hora de catalogar la linaza como alimento funcional.

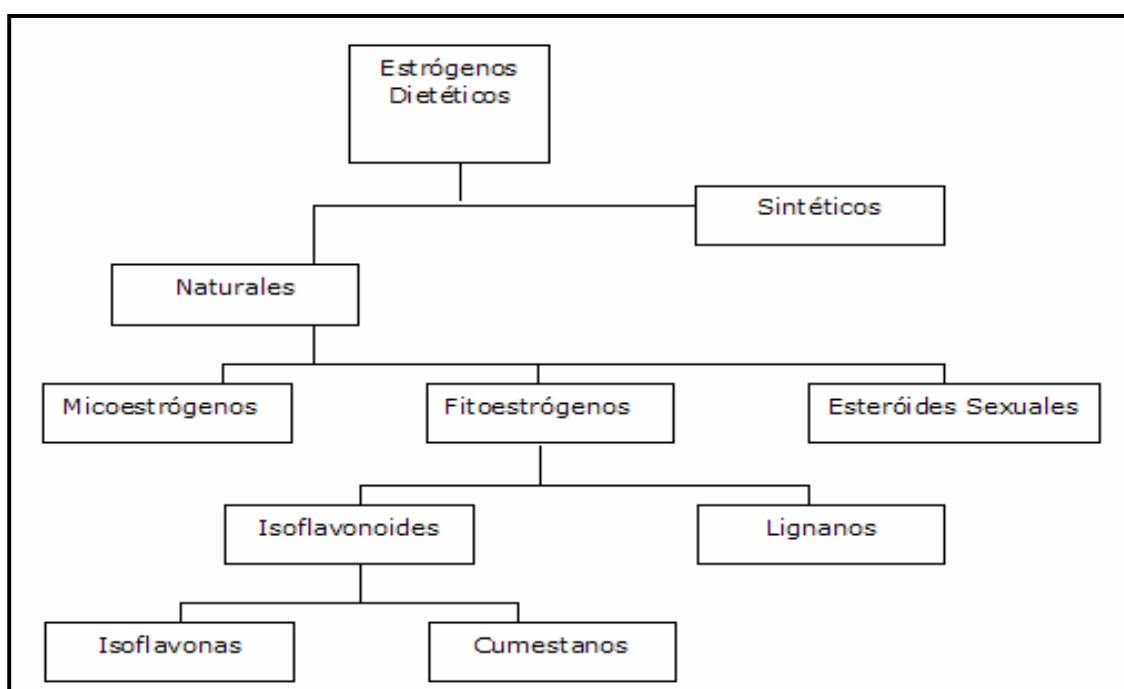


FIGURA 5 Clasificación de fitoestrógenos

Fuente: RUEDA Y PALACIOS (2007)

RUEDA Y PALACIOS (2007) se refiere a los fitoquímicos como un grupo de sustancias procedentes de varias especies vegetales que se caracterizan por tener cierta actividad estrogénica. Se encuentran principalmente en cereales, leguminosas y hortalizas. Los clasifica en dos familias: los isoflavonoides y lignanos (FIGURA 5).

MORRIS (2003) por su parte hace referencia a tres fitoquímicos presentes en la linaza.

Ácidos fenólicos: los ácidos fenólicos están entre los fitoquímicos (químicos vegetales) que se encuentran en mayor abundancia en las plantas. Estos ácidos parecen tener activos anti-oxidantes, anti-cáncer y anti-microbianos. La linaza contiene alrededor de 8 a 10 g de ácidos fenólicos por kg. de linaza. Debido a que estos ácidos se presentan en asociación con la fibra de las paredes celulares de las plantas, algunos de ellos podrían jugar un papel importante en los beneficios para la salud que se le atribuyen a la fibra de la linaza (MORRIS, 2003).

Lignanós: los lignanos de las plantas son compuestos fenólicos. Éstos son fitoquímicos biológicamente activos con un aparente potencial anti-cáncer y anti-oxidante. La linaza es particularmente una fuente importante del lignano denominado secoisolariciresinol diglicosido (SDG). El SDG es un lignano vegetal que se convierte en lignanos de mamíferos a través de la bacteria del colon de los humanos y otros animales. (MORRIS, 2003)

Los lignanos no se encuentran en el aceite de linaza excepto como sólidos suspendidos (BEST, 2004) por lo tanto se infiere que tanto en la harina integral de linaza, o sea aquella obtenida a partir de la semilla entera, como en la harina de linaza desgrasada se encuentran estos fitoestrógenos.

Flavonoides: los flavonoides son polifenoles que se encuentran en muchas frutas, vegetales y bebidas como el vino y el té. Estos anti-oxidantes unen ciertos metales, interactúan con las enzimas y tienen algunas acciones anti-inflamatorias. La linaza contiene cerca de 35-70 mg de flavonoides/100 g. (MORRIS, 2003)

En relación a las vitaminas presentes en la linaza, esta contiene menores cantidades de vitaminas hidrosolubles que liposolubles, como se muestra en el CUADRO 3. La vitamina E, es una vitamina liposoluble, que se encuentra presente en la linaza, principalmente como gamma-tocoferol, el cual funciona como anti-oxidante. El gamma-tocoferol protege las proteínas celulares, las grasas y el ADN del daño por oxidación ocasionado por radicales libres, lo que puede ayudar a prevenir enfermedades crónicas como enfermedades del corazón y embolias. Asimismo, promueve la excreción de sodio en la orina, lo cual puede ayudar a disminuir la presión en la sangre. El contenido

de tocoferol en la linaza dependerá de la variedad, madurez de la semilla, región de producción, condiciones de producción y método de extracción. El contenido de gamma-tocoferol puede variar desde 150 mg/kg a 800 mg/kg de linaza. (MORRIS, 2003)

CUADRO 3 Contenido vitamínico de la linaza

Hidrosoluble	mg/100g	mg/cuchda. Linaza molida
Ácido ascórbico (Vit. C)	0,50	0,04
Tiamina (Vit B ₁)	0,53	0,04
Riboflavina (B ₂)	0,23	0,02
Niacina	3,21	0,26
Piridoxina (B ₆)	0,61	0,05
Ácido paltoténico	0,57	0,05
	µg/100g	µg/cuchda.
Ácido fólico	112	9,0
Biotina	6	0,5
Liposolubles	Mg/ Kg de aceite	mg/ cuchda. de aceite
Carotenos	ND	ND
Vitamina E		
Alfa-tocoferol	7	0,10
Delta-tocoferol	10	0,14
Gamma-tocoferol	552	7,73

ND: no detectados

Fuente: MORRIS (2003)

Con respecto a los minerales, se puede ver en al CUADRO 4 que una cucharada de linaza molida contiene 34 mg de magnesio, casi la misma cantidad de magnesio que se encuentra en el plátano, ó en la mitad de una pechuga de pollo frita. La linaza molida contiene cerca de 66 mg de potasio por cucharada ó casi la misma cantidad de

potasio que se encuentra en un pan de cebada tostado, en una taza de 180 ml. de infusión de té ó en un huevo hervido. La linaza es baja en sodio. (MORRIS, 2003)

CUADRO 4 Contenido mineral de la linaza

	mg/100g	mg/cuchda. Linaza molida
Calcio	236	19,0
Cobre	1	0,1
Acero	5	0,4
Magnesio	431	34,0
Manganeso	3	0,2
Fosforo	622	50,0
Potasio	831	66,0
Sodio	27	2,0
Zinc	4	0,3

Fuente: MORRIS (2003)

2.5.4 Propiedades Funcionales

La proteína y la goma son componentes altamente abundantes en la linaza, por lo que se considera alimento funcional. La goma de la linaza tiene su valor nutricional como fibra dietética, la cual juega un rol importantísimo en reducir la diabetes y el riesgo de enfermedades coronarias, previene el cáncer de colon y recto y reduce la tendencia a la obesidad. (OOMAH, 2001)

Por otro lado la linaza tiene un alto contenido de omega-3 el cual es beneficioso para la salud, previniendo enfermedades cardiovasculares ya que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados y de fibra dietética ayudan a disminuir el colesterol total de la sangre y el colesterol LDL. Si a estos dos componente de la linaza (fibra y ácidos grasos omega 3) se le agrega un tercer compuesto, el lignano secoisolariciresinol diglicosido (SDG) se tiene que la linaza presenta un alto valor biológico como alimento funcional. (MORRIS, 2003)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

En este punto se identifica el lugar donde fue realizado el ensayo, además de los materiales, equipos, materia prima y microorganismos utilizados.

3.1.1 Materiales y equipos. La elaboración de harina de linaza y los ensayos experimentales se realizaron en los laboratorios de proceso, microbiología y química del Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos (ICYTAL) de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. El análisis proximal de la harina se realizó en los laboratorios de cereales del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

En la elaboración y análisis de la harina de linaza se utilizaron los siguientes materiales: molino de cuchillos (para café), tamices de especificaciones A.S.T.M E-11, balanza, cucharas, frascos de vidrios de 250ml, material de vidrio, estufas a distintas temperaturas $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ para la incubación de los microorganismos y $100 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ para la determinación de humedad.

3.1.2 Materia Prima La materia prima utilizada fue una fracción de harina de linaza, la cual se denominó: Harina Integral (HI)

La molienda se realizó a partir de semilla entera fresca de la variedad Celestina Baer (desarrollada y producida por semillas Baer, Temuco, Chile), triturada en un molino de cuchillos marca Moulinex.

La obtención de la porción de harina se realizó a través de tamices de entre 2500 μm y 600 μm de especificaciones A.S.T.M E-11.

	Abreviación	Tamaño de partícula
Harina Integral	HI	600 μm – 2500 μm

3.1.3 Microorganismos. Se utilizaron 2 especies de microorganismos probióticos para el estudio, estos fueron: *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*, los cuales fueron incubados a 32 ± 1 °C y 37 ± 1 °C respectivamente.

3.2 Método

A continuación se presenta el método empleado para el cultivo de los microorganismos en estudio y para la caracterización de la harina de linaza utilizada como materia prima para el medio de cultivo.

3.2.1 Cultivo de microorganismos. Este punto explica la metodología para el cultivo de *L. casei* y *L. acidophilus*.

3.2.1.1 Cultivo madre. Se realizó un cultivo madre, para cada uno de los microorganismos, con el cual se inoculó el medio respectivo. Esto se realizó según las especificaciones descritas en el CUADRO 5.

CUADRO 5 Especificaciones realización cultivo madre

	MEDIO	MO	MASA INOCULADA	TEMPERATURA INCUBACION	TIEMPO DE INCUBACIÓN MÍNIMO
CULTIVO MADRE	Caldo MRS	<i>L. casei</i> ó <i>L. acidophilus</i> según corresponda	0,1 g	$32/37 \pm 1$ °C según corresponda	3 horas

3.2.1.2 Siembra de cultivos. Los microorganismos se inocularon en los distintos medios a partir del cultivo madre. Fueron incubados en estufas por tiempos y temperaturas determinadas

3.2.1.2.1 *Lactobacillus casei*. El cultivo de *L. casei* se realizó según las especificaciones descritas en el CUADRO 6, el cual se realizó en triplicado tanto para el medio con harina de linaza como para el blanco (agua destilada).

CUADRO 6 Especificaciones siembra *L. casei*

	MEDIO	MO	VOLUMEN INOCULACION	INCUBACION	TIEMPO DE INCUBACIÓN
HARINA INTEGRAL R1, R2, R3	5mg HI + 10 ml. Agua destilada	<i>L. casei</i>	0,1 ml (cultivo madre)	32 ± 1 ° C	0 a 30 DIAS

3.2.1.2.2 *Lactobacillus acidophilus*. El cultivo de *L. acidophilus* se realizó según las especificaciones descritas en el CUADRO 7, el cual se realizó en triplicado tanto para el medio con harina de linaza como para el blanco (agua destilada).

CUADRO 7 Especificaciones siembra *L. acidophilus*

	MEDIO	MO	VOLUMEN INOCULACION	INCUBACION	TIEMPO DE INCUBACIÓN
HARINA INTEGRAL R1, R2, R3	5 mg HI + 10 ml agua destilada	<i>L. acidophilus</i>	0,1 ml (cultivo madre)	37 ± 1 ° C	0 a 30 DIAS

3.2.1.3 Diluciones y siembra. Se realizaron diluciones con el objetivo de obtener recuentos cuantificables. La cantidad de diluciones a realizar fueron las necesarias para cuantificar el crecimiento de los microorganismos a través de la siembra de dichas diluciones. Lo anterior se describe en el CUADRO 8.

CUADRO 8 Especificaciones realización de las distintas diluciones.

MEDIO	DILUCIÓN 10e-2	DILUCIÓN 10e-3	DILUCIÓN 10e-4	DILUCIÓN 10e-n
HARINA INTEGRAL (R1,R2,R3)	9,9 ml agua peptonada/0,1ml medio	9 ml agua peptonada/1ml dilución 10e-2	9 ml agua peptonada/1ml dilución 10e-3	9 ml agua peptonada/0,1ml dilución 10e-(n-1)

Se sembraron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} por ejemplo, para obtener recuentos de diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} respectivamente. Dicha siembra se realizó en duplicado según las especificaciones de la CUADRO 9.

CUADRO 9 Ejemplo de siembra, para recuento de microorganismos.

	MEDIO	VOLUMEN INOCULACIÓN	TEMPERATURA	TIEMPO DE INOCULACIÓN	RECuento
SIEMBRA	Agar MRS	0,1 ml dilución 10e-n	32/ 37 ± 1 ° C	72 Horas	10e-(n+1)

A continuación, en la FIGURA 6 se muestra la línea de flujo del experimento.

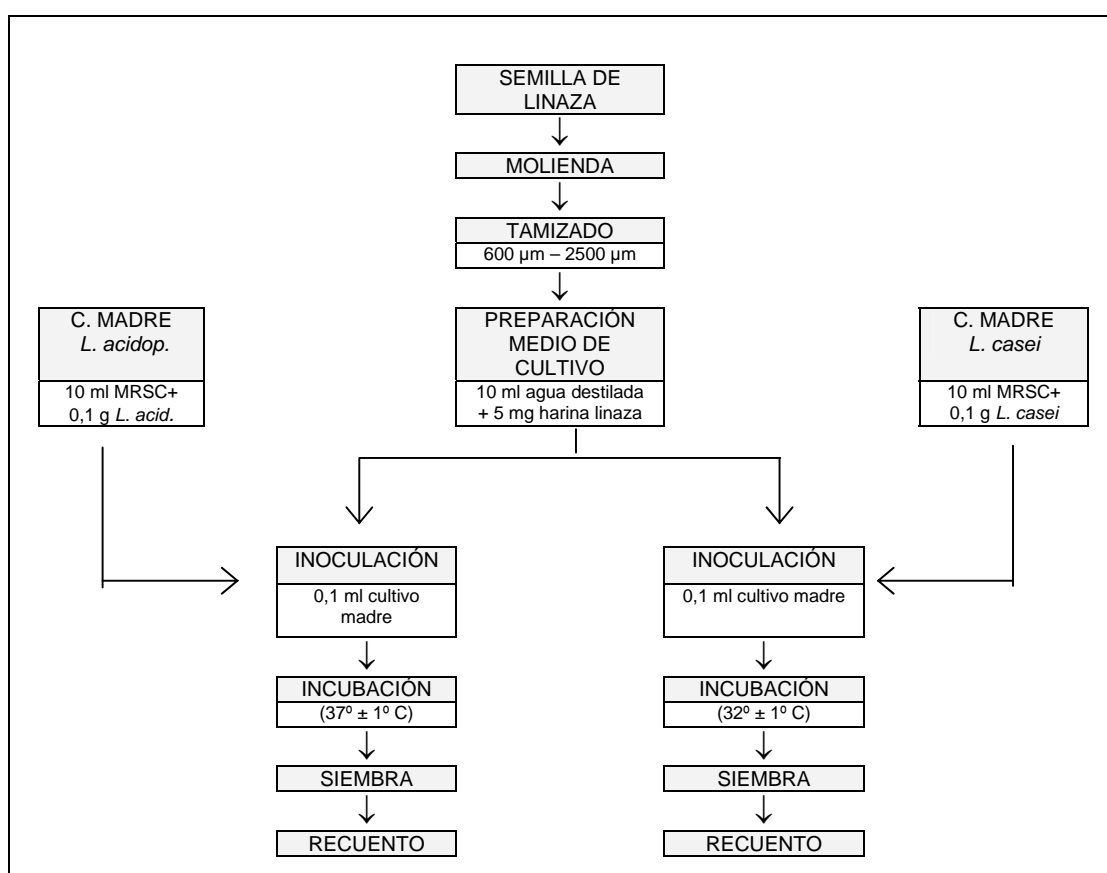


FIGURA 6 Línea de flujo del experimento

3.2.2 Análisis químico de la harina de linaza. En este punto se señala la metodología utilizada para el análisis proximal de la harina de linaza utilizada en el estudio.

3.2.2.1 Determinación de humedad. Se determinó la humedad de la harina de linaza según el método descrito por la AOAC (1995). Método oficial 925.09.

3.2.2.2 Determinación de proteínas. Se determinó las proteínas presentes en la harina de linaza según el método Kjeldahl, descrito por la AOAC (1995). Método oficial 955.04.

3.2.2.3 Determinación de materia grasa. Se determinó la porción de grasa total de la harina de linaza mediante el método Soxhlet, descrito por la AOAC (1995). Método oficial 920.39.

3.2.2.4 Determinación de fibra cruda. Se determinó el porcentaje de fibra cruda presente en la harina de linaza a través del método directo, descrito por la AOAC (1995). Método oficial 978.10

3.2.2.5 Determinación de cenizas. Se determinó el porcentaje de cenizas a través del método directo descrito por la AOAC (1995). Método oficial 942.05.

3.2.3 Diseño experimental. Se realizó un análisis de covarianza, con 2 factores “microorganismos” y “medios”. Con 2 niveles para microorganismos (*L. casei* y *L. acidophilus*), y 2 niveles para medios (harina de linaza y blanco).

El tiempo, es una covariable la cual presenta 10 niveles (días 0, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19, 30)

Del diseño experimental resultaron 4 combinaciones las cuales se realizaron en triplicado, obteniendo finalmente 12 ensayos, evaluados en los 10 niveles de la covariable. Las variables de respuesta fueron: curva de crecimiento, viabilidad del microorganismo sobre 10^6 , los cuales en conjunto se definen como efecto prebiótico.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico Statgraphics 5.1

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Harina de linaza.

La molienda de la semilla de linaza se realizó en un molino de cuchillos (para café), para luego tamizar y obtener el tamaño de harina deseado (de $>600\ \mu\text{m}$ a $<2500\ \mu\text{m}$). La obtención de la harina se realizó en triplicado.

En la FIGURA 7 se muestra los tamices utilizados para la separación de la fracción de harina utilizada en el ensayo y la fracción de harina obtenida.



FIGURA 7 Tamices A.S.T.M E-11 (a) Harina de linaza una vez finalizada la molienda (b)

Las tres repeticiones de harina de linaza (HI) se sometieron a un análisis proximal obteniéndose el resultado promedio que se muestra en el CUADRO 10.

Según HALL *et al.* el contenido de proteínas varía entre 10,5% y 31% dependiendo de la variedad, rango en el cual se encuentra la harina de linaza del presente trabajo (19,8%), sin embargo el valor descrito por MORRIS (2003) (20%) se ajusta más al

obtenido en el experimento. Lo mismo ocurre con el valor obtenido para extracto etéreo (39,9%), el cual casi coincide al descrito por MORRIS (2003).

CUADRO 10: valores promedio y desviación estándar para los componentes analizados para harina de linaza

	PROMEDIO*	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
HUMEDAD	5,4%	1,17
CENIZAS	2,4%	0,06
FIBRA CRUDA	14,7%	4,38
EXTRACTO ETEREO	39,9%	2,54
PROTEINA (Nx6,25)	19,8%	1,22
CARBOHIDRATOS**	17,7%	0,89

* Valor a partir de 3 valores medidos en duplicado en cada caso

** Valor obtenido por diferencia respecto del total

Si bien MORRIS (2003) reporta un contenido de carbohidratos (azúcares y almidones) de un 1%, y de fibra dietaria un 28%, la cual está compuesta por sustancias no digeribles tales como celulosas, hemicelulosas, pectinas, ligninas entre otras, de lo anterior resulta un total de 29%. Por otra parte en el ensayo se obtuvo un valor para carbohidratos de un 17,7 %, y para fibra cruda un valor de 14,7%, lo que suman un 32,4% siendo equivalente al reportado en la literatura, teniendo en cuenta la variedad de la semilla y método de análisis utilizado entre otros factores.

4.2 Crecimiento de microorganismos.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en relación a las variables de respuesta crecimiento de los microorganismos y viabilidad por sobre 10^6

4.2.1 *Lactobacillus casei*. A continuación en el CUADRO 11 se presentan los datos promedio, de las tres repeticiones, obtenidos para la variable de respuesta crecimiento, medidos a través de la concentración en ufc/ml a lo largo de 30 días, en los dos medios estudiados, harina integral de linaza (en agua destilada) y blanco (agua destilada pura).

CUADRO 11 Valores promedio de tres repeticiones, para el crecimiento de *L. casei*, en los dos medios estudiados a través del tiempo

Microorganismo	<i>Lactobacillus casei</i>	
Medio	<i>HI</i>	<i>Blanco</i>
Tiempo	ξ	ξ
0	1,23E+06	8,41E+05
2	1,51E+08	3,80E+06
5	1,23E+08	4,88E+05
7	2,19E+08	5,90E+05
9	3,55E+07	5,49E+04
12	5,26E+07	2,13E+04
14	4,14E+07	8,19E+04
16	1,26E+07	2,11E+04
19	2,29E+07	7,83E+02
30	6,98E+07	1,00E+00

Las curvas de crecimiento promedio de *L. casei* en medio con harina de linaza y blanco obtenidas a lo largo de 30 días de incubación a 32 ± 1 ° C. se muestra en la FIGURA 8. En el ANEXO 1 se presentan las curvas de crecimiento con sus respectivas repeticiones.

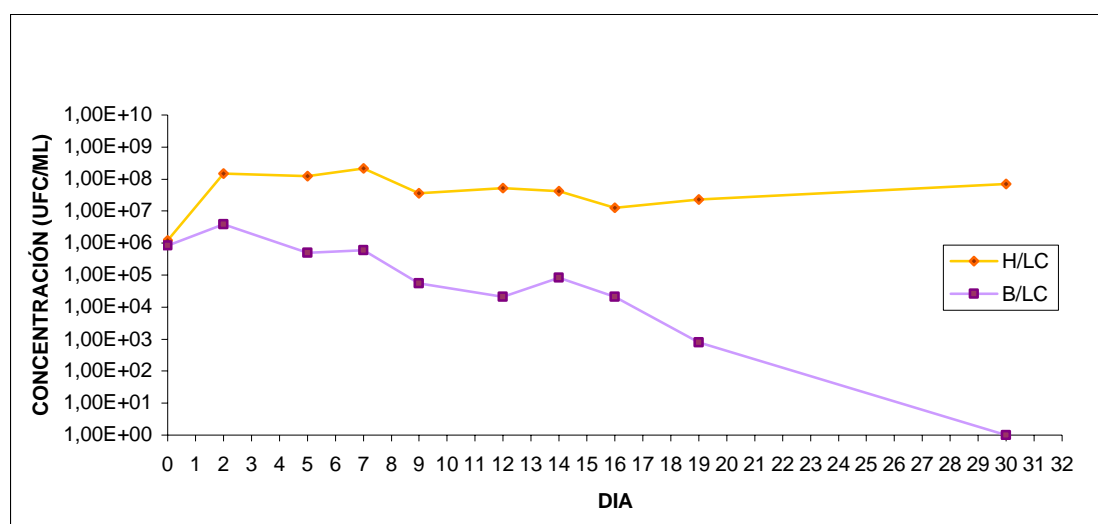


FIGURA 8: Curva promedio para crecimiento de *L. casei* en medio con harina de linaza y blanco

La FIGURA 8, muestra la curva de crecimiento de *L. casei* en la harina de linaza, donde se observa la fase de crecimiento exponencial entre el día 0 y 2, donde la

velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación mínimo, las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima. (PISABARRO, 2003; SCHLIGEL, 2007). El crecimiento para esta fase se incrementa desde una concentración inicial de $1,23 \times 10^6$ ufc/ml a una concentración de $1,51 \times 10^8$ ufc/ml, aumentando alrededor de 2 ciclos logarítmicos.

Para los días 2 hasta 30 se ve la fase estacionaria donde las bacterias no incrementan en número, sino desarrollan un metabolismo diferente al de la fase anterior, donde las concentraciones fluctúan entre $1,26 \times 10^7$ en el día 16 y $2,19 \times 10^8$ el día 7, esto concuerda con lo planteado por PISABARRO (2003) y por SCHLEGEL (2007).

En relación a la curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* en agua destilada (blanco) la FIGURA 8 muestra la fase exponencial entre el día 0 y el día 2, el cual incrementó desde $8,41 \times 10^5$ ufc/ml a $3,80 \times 10^6$ ufc/ml, sin embargo en los días posteriores comienza la fase de muerte, llegando al día 30 a una concentración de 0 ufc/ml.

A aplicar las curvas de tendencia (FIGURA 9) para ambos medios se obtienen curvas ajustadas al modelo, las cuales son del tipo exponencial.

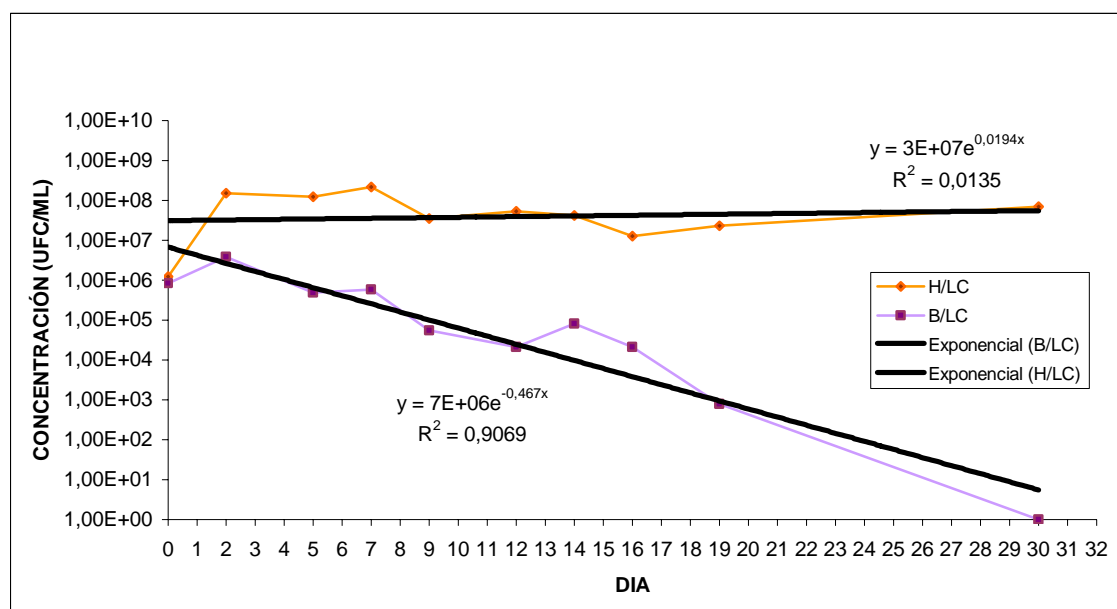


FIGURA 9 Curvas de tendencia para el crecimiento de *L. casei* en los medios en estudio.

Aplicando regresión lineal (ANEXO 2) a la curva de crecimiento de *L. casei* en harina de linaza se obtiene una pendiente no significativa y un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0,0135, lo cual explica lo descrito anteriormente, o sea, que no existe relación entre el crecimiento de los microorganismos y el tiempo de incubación, una vez pasado el día dos. En otras palabras para el tiempo medido en el ensayo (30 días) los microorganismos a partir del día dos no disminuyen ni aumentan su concentración, estadísticamente hablando, lo que explica la linealidad de la curva.

En relación a la curva de crecimiento de *L. casei* en agua destilada (blanco) al aplicarle regresión lineal (ANEXO 2) se obtiene una pendiente significativa y un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0,9096, lo cual deja en manifiesto, que a medida que el tiempo aumenta, el crecimiento de microorganismos disminuye por lo que la influencia del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *L. casei* es significativa.

4.2.2 *Lactobacillus acidophilus*. A continuación en el CUADRO 12 se presentan los datos promedio, de las tres repeticiones, obtenidos para la variable de respuesta: crecimiento, medidos a través de la concentración en ufc/g a lo largo de 30 días, en los dos medios estudiados: harina integral y blanco.

CUADRO 12 Valores promedio, de tres repeticiones, para el crecimiento de *L. acidophilus* en los dos medios estudiados a través del tiempo

Microorganismo	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
Medio	<i>HI</i>	<i>Blanco</i>
Tiempo	ξ	ξ
0	1,56E+06	1,38E+06
2	9,24E+05	5,50E+03
5	7,33E+05	1,33E+02
7	2,82E+06	0,00E+00
9	2,08E+05	0,00E+00
12	1,66E+05	0,00E+00
14	7,28E+04	0,00E+00
16	2,47E+04	0,00E+00
19	6,63E+04	0,00E+00
30	7,83E+03	0,00E+00

Las curvas de crecimiento promedio de *L. acidophilus* en HI y blanco obtenida a lo largo de 30 días de incubación a 37 ± 1 ° C. se muestra en la FIGURA 10. En el ANEXO 3 se presentan las curvas de crecimiento con sus respectivas repeticiones.

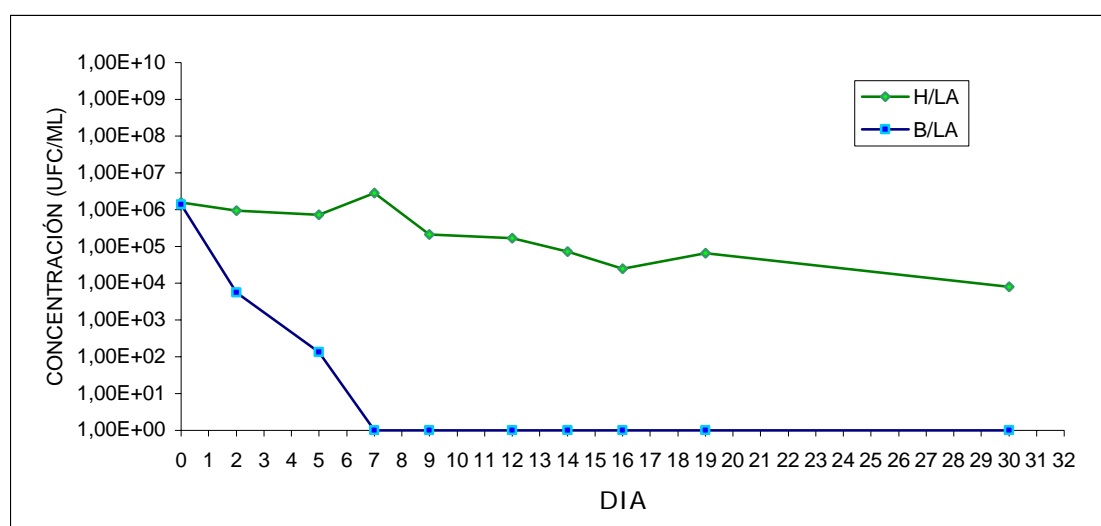


FIGURA 10 Curva promedio para crecimiento de *L. acidophilus* en medio con harina de linaza y blanco

A diferencia de lo que ocurre con *L. casei*, en el crecimiento de *L. acidophilus* en el medio con harina de linaza (FIGURA 10), se observa una fase lag o de adaptación entre los días 0 y 5, durante la cual los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones del ambientales, para poder iniciar le crecimiento exponencial (PISABARRO 2003; SCHLEGEL, 2007). A partir del día 5 y hasta el día 7 los microorganismos crecen exponencialmente donde la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación mínimo, las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima. (PISABARRO, 2003; SCHLEGEL, 2007). El crecimiento para esta fase se incrementa desde una concentración de $7,33 \times 10^5$ ufc/ml a una concentración de $2,82 \times 10^6$ ufc/ml, sin embargo el crecimiento no es tan explosivo como para *L. casei* ya que aumenta menos de un ciclo logarítmico.

A partir del día 7 se ve el comienzo de la fase de muerte, ya que, si bien el proceso es lento, la concentración disminuye considerablemente a través del tiempo, llegando al

día 30 con una concentración de $8,00 \times 10^3$, más de dos ciclos logarítmicos menos que al comenzar el ensayo ($1,56 \times 10^6$).

En relación a la curva de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en agua destilada (blanco), en la FIGURA 10 se puede observar que los microorganismos no son capaces de sobrevivir, comenzando tempranamente la fase de muerte, llegando en el día 7 a una concentración de 0 ufc/ml.

A aplicar las curvas de tendencia (FIGURA 11) para ambos medios se obtienen curvas ajustadas al modelo, las cuales son del tipo exponencial.

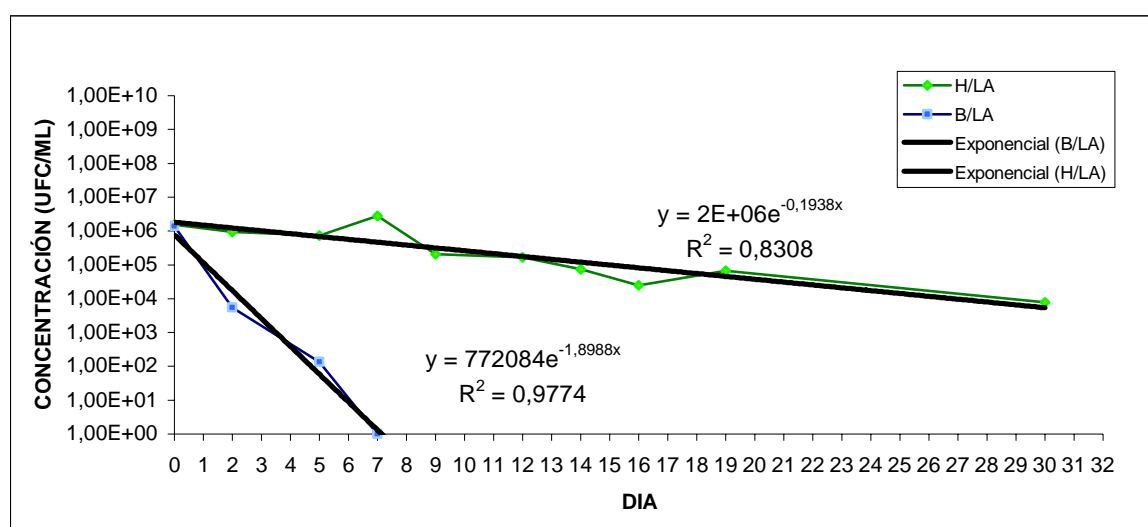


FIGURA 11 Curvas de tendencia para el crecimiento de *L. acidophilus* en los medios en estudio.

Aplicando regresión lineal (ANEXO 4) a la curva de crecimiento de *L. acidophilus* en harina de linaza se obtiene una pendiente significativa y un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0,8308, lo cual explica la relación que existe entre el crecimiento de los microorganismos y el tiempo de incubación, En otras palabras la concentración de microorganismos en harina de linaza, a medida que pasan los días considerados para este ensayo (30 días), va disminuyendo.

En relación a la curva de crecimiento de *L. acidophilus* en agua destilada (blanco) al aplicarle regresión lineal (ANEXO 4) se obtiene una pendiente significativa y un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0,9774, lo cual deja en manifiesto, que a medida que el tiempo aumenta, el crecimiento de microorganismos disminuye por lo que la influencia del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *L. acidophilus* es significativa.

4.2.3 *L. casei* en relación a *L. acidophilus*. Al analizar estadísticamente, a través de un análisis de covarianza (ANEXO 5), el crecimiento de *L. casei* y *L. acidophilus* en harina de linaza y agua destilada (blanco), tenemos lo siguiente:

- Existen diferencias significativas al 95% de confianza, entre el crecimiento de los dos microorganismos a lo largo del tiempo del estudio (ANEXO 5)
- Existen diferencias significativas al 95% de confianza, entre los dos medios estudiados. (ANEXO 5)
- No existen diferencias significativas con un 95% de confianza, entre las 3 repeticiones. (ANEXO 5)

Por otra parte no existe interacción entre los factores, lo cual significa que el medio con harina de linaza y blanco se comportan de la misma manera independiente del microorganismo aplicado, o sea cultivar microorganismos en harina de linaza siempre es diferente que cultivarlos en agua destilada, independiente del tipo de microorganismo. De la misma manera, para las condiciones de este ensayo, el crecimiento de *L. casei* o *L. acidophilus* siempre es diferente independiente del medio utilizado.

4.3 Viabilidad ($>10^6$).

A continuación se analiza la viabilidad de los dos microorganismos en estudio, cultivados en un medio con harina de linaza. Entendiéndose por viabilidad la posibilidad de los microorganismos de vivir en el medio.

En la FIGURA 12 se muestra la morfología de los microorganismos en estudio, observados en el microscopio (100x)

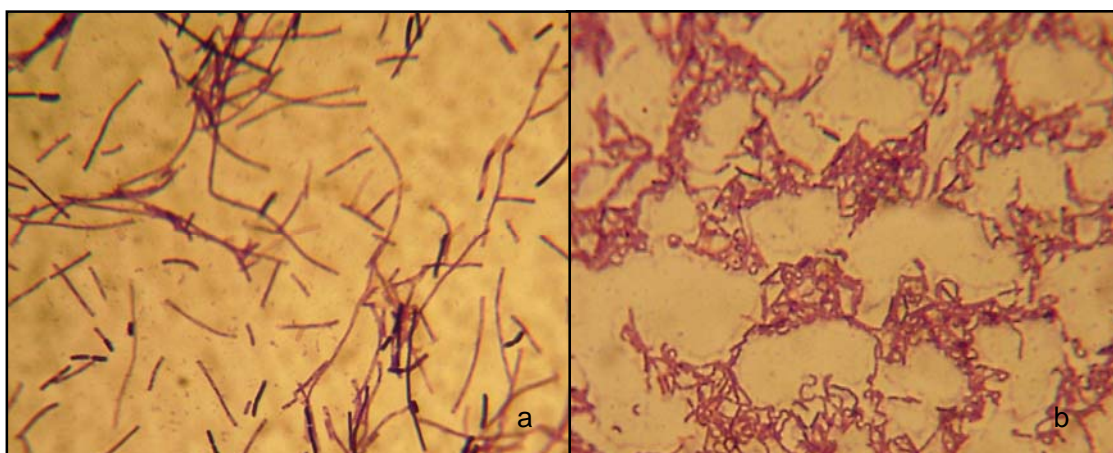


FIGURA 12 *L. acidophilus* (a) y *L. casei* (b). observados en el microscopio (100x)

4.31 *Lactobacillus casei*. En la FIGURA 13 se ve claramente que la viabilidad de *L. casei* en medio con harina de linaza está por sobre 10^6 ufc/ml, por lo tanto, para las condiciones de este ensayo *L. casei* se comporta como probiótico en presencia de harina de linaza, ya que según SHAH (2001) las bacterias probióticas deben ser viables y disponibles en altas concentraciones, típicamente 10^6 ufc/g de producto. Por lo que se puede decir que el medio con la harina de linaza se comportó como una sustancia prebiótica para *L. casei*.

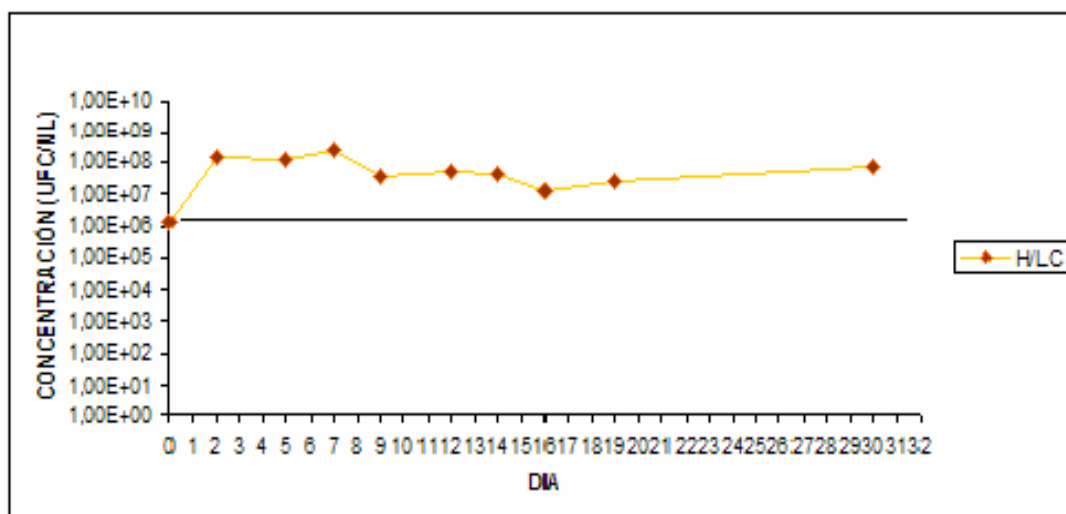


FIGURA 13 Viabilidad de *L. casei* en el tiempo.

4.4.2 *Lactobacillus acidophilus*. en la FIGURA 14 se ve claramente que la viabilidad de *L. acidophilus* en harina de linaza está por debajo de 10^6 ufc/ml, exceptuando el día 7, que supera dicha concentración, por lo que queda en manifiesto que *L. acidophilus* para las condiciones de este ensayo no se comporta como probiótico en presencia de harina de linaza, es más SHAH (2001) sostiene que si bien se han realizado estudios con concentraciones más bajas, es dudoso que concentraciones menores a 10^6 puedan presentar beneficios probióticos. Por lo tanto, se puede decir que la harina de linaza no se comporta como una sustancia prebiótica para *L. acidophilus*.

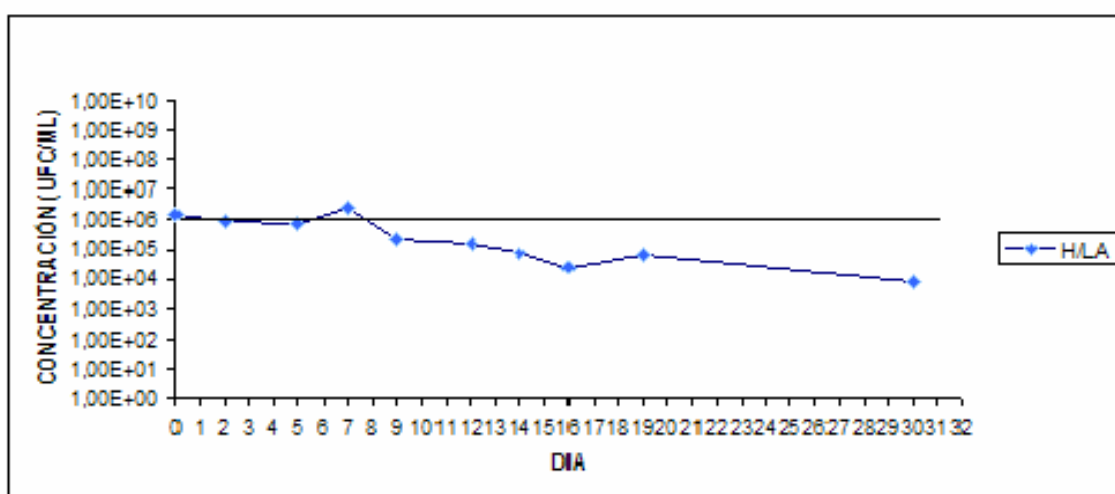


FIGURA 14 Viabilidad de *L. acidophilus* en el tiempo.

5. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones de este ensayo se puede, concluir, en primer lugar, que los microorganismos *L. casei* y *L. acidophilus* crecen mejor en un medio que contiene harina de linaza que en agua destilada.
- Al no tener una fuente de energía, los microorganismos aunque no mueren inmediatamente, debido a que son capaces de guardar energía, van disminuyendo, mientras que para los cultivados con una fuente de energía (linaza) aumentan y/o mantienen su población por sobre el blanco, es decir, el agua pura.
- Los resultados de crecimiento en el medio con linaza y en agua demuestran que *L. casei* tiene una mayor capacidad de acumulación de reservas provenientes del medio de activación (medio enriquecido, MRS) que *L. acidophilus*.
- En relación al comportamiento de los microorganismos como probióticos, se observó que *L. casei* se comporta como probiótico en presencia de harina de linaza, mientras que *L. acidophilus*, no, lo que permite concluir que la harina de linaza tiene un efecto prebiótico para *L. casei* mientras que para *L. acidophilus*, no.
- Comparando el crecimiento de ambos microorganismos en un medio con harina de linaza, se concluye que el crecimiento de *L. casei* en dicho medio fue mejor que el crecimiento de *L. acidophilus* en la misma solución, lo cual podría deberse a que *L. acidophilus* tiene un mejor comportamiento en condiciones anaeróbicas, lo que debería dar origen a nuevos estudios al respecto.

6. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto prebiótico de la linaza molida, a través del crecimiento de dos especies de microorganismos probióticos en aerobiosis. *L. casei* y *L. acidophilus*. Para lo cual se cultivó dichos microorganismos en un medio con 5 mg de harina de linaza en agua y en agua pura, este último como blanco de comparación. Los microorganismos se cultivaron a 32 y 37° C, respectivamente, durante 30 días. La capacidad prebiótica de la harina de linaza se evaluó a través del crecimiento de los microorganismos antes mencionados y la viabilidad de estos por sobre 10^6 ufc/ml. Los resultados mostraron que *L. casei* tuvo un crecimiento mayor en el medio con harina de linaza que *L. acidophilus*. Además, ambos microorganismos crecen mejor en el medio con harina de linaza que en agua pura. Por otra parte, *L. casei* logra tener una viabilidad por sobre 10^6 por lo que se puede decir que dicho microorganismo se comporta como probiótico en presencia de harina de linaza, y esta última tendría un efecto prebiótico sobre *L. casei*. Mientras que *L. acidophilus* no logra mantener su población por sobre 10^6 por lo que no se comportaría como probiótico y por ende la harina de linaza no tendría, bajo las condiciones del experimento, efecto prebiótico sobre dicho microorganismo.

Palabras claves: *Linum usitatissimum* L (Linaza), *Lactobacillus*, prebiótico, probióticos

6. SUMERRY

The objective of this work was to evaluate the prebiotic effect of the flaxseed flour, on the growth of two species of probiotics microorganisms in aerobiosis. *L. casei* and *L. acidophilus*. The mentioned microorganisms were cultivated in a medium with 5 mg of flaxseed flour in water and in pure water, the latter was used as a blank for comparison. They were cultivated to 32 and 37 ° C for 30 days. The prebiotic effect of the flaxseed flour was evaluated through the growth of the microorganisms before mentioned and the viability of these over 10⁶ cfu/ml. Results showed that *L. casei* has a better growth in the medium with flour of flaxseed than *L. acidophilus*. Both microorganisms grew better in the medium with flaxseed flour than in pure water. On the other hand, *L. casei* has a viability over 10⁶ cfu/ml, so that it is possible to say that the microorganism behaves like a probiotic in the presence of flaxseed flour, and the latter would have prebiotic effects on *L. casei*. *L. acidophilus* does not sustain its growth over 10⁶ cfu/ml so, it would not behave like a probiotic and therefore flaxseed flour would not have a prebiotic effect on it under these experimental conditions.

Palabras claves: *Linum usitatissimum* L (flaxseed), *Lactobacillus*, prebiotics, probiotics

7. BIBLIOGRAFIA

- BERNER LA, O'DONNELL JA. 1998. Funcional food and health claims legislation: applications to dairy food. *Int Dairy J.* 8(5/6); 355-362
- BEST, D. 2004. Low-Carb revolution fuels innovation with flaxseed. Functional ingredient.
<http://www.functionalingredientmag.com/fimag/articleDisplay.asp?strArticleId=514&strSite=FFNSite>
- COSKUNER Y, KARABABA E. 2005. Some physical properties of flaxseed (*Linum isitatisimum* L.) *Journal of food engineering.* 24:1067-1073
- CLYDESDALE F. 2004. Functional Foods: Opportunities & Challenges. *Food Technology.* 58 (12); 35-40
- DESAI AR, POWELL IB, SHAH NP. 2004. Survival and Activity of Probiotic Lactobacilli in Skim Milk Containing Prebiotics. *Journal of Food Science.* 69(3); 57-60
- DAUN, J. BARTHET, V. CHOMICK, B. DUGUID, S. 2003. Structure, Composition, and Variety Development, Manitoba, Canadá.
- DELZENNE NM, ROBERFROID MB. 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensm Wiss Technol,* 27;1-6
- Diario digital ADN mundo.
http://preview.adnmunco.com/contenidos/comercio/lino_produccion_ce_291206.html

- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2006. Probióticos en los alimentos, propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Consulta de expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico. Córdoba, Argentina. Informe del grupo de trabajo conjunto FAO/OMS sobre borrador de directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos. Londres, Notario, Canadá.
- GIBSON, GR. ROBERFROID, MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotic. *J Nutr.* 125; 1401-1412
- GUARNER F, SCHAAFSMA GJ., 1998, probiotics. *Int J Food Microbiol.* 39; 237-238
- HALL, C., TULBEK, M., XU, Y. 2006. FLAXSEED, ADVANCES IN FOOD AND NUTRITION RESEARCH VOL 51, 97PP
- KRISTO E. BILIADERIS C, TZANETAKIS N. 2003. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *International Dairy Journal.* 13; 517-528
- MACZULAK AE, WOLIN MJ, MILLER TL. 1993. Amounts of variable anaerobes, methanogens and bacterial fermentation products in feces of rats fed high fiber or fiber-free diets. *J Appl Environ Microbiol.* 59; 657-662
- MORIÑIGO MA. 2001. Probióticos. Encuentros en la biología. Facultad de Ciencias Universidad de Málaga. España. Número 71.
www.encuentros.uma.es

- MORRIS, D. 2003. Linaza- una elección inteligente. flax council of canada. www.flaxcouncil.ca
- MORRIS, D 2003. Linaza- una recopilación sobre sus efectos en la salud y nutrición. Flax council of canada. www.flaxcouncil.ca
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS AOAC. 1995. Volumen I- II.
- OOMAH, B. D. 2001. Flaxseed as a functional food source. Journal of the Science of Food and Agriculture. 81; 889–894.
- PICCA C., DEVOTO R. 2003. Participacion del geoplasma INTA en el mercado de semilla de lino.
- PISABARRO A. 2003. Microbiología Clínica. Departamento de Producción Agraria. Universidad de Navarra. Pamplona. España. 142pp.
- ROBERFROID MB. 1999. Funcional foods. Danone Woeld Newsletter 18; 1-11
- ROBERFROID MB. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional food. American Journal of Clinical Nutrition. 71:1682-1687
- ROSADO, J. ONDARZA, M. 2003, Prebióticos y probióticos: efectos e implicaciones en la fisiología de la nutrición. <http://www.nutrar.com/detalle.asp?ID=2358>
- ROWLAND IR, TANAKA R. 1993. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. Journal of Applied Bacteriology. 74; 667-674

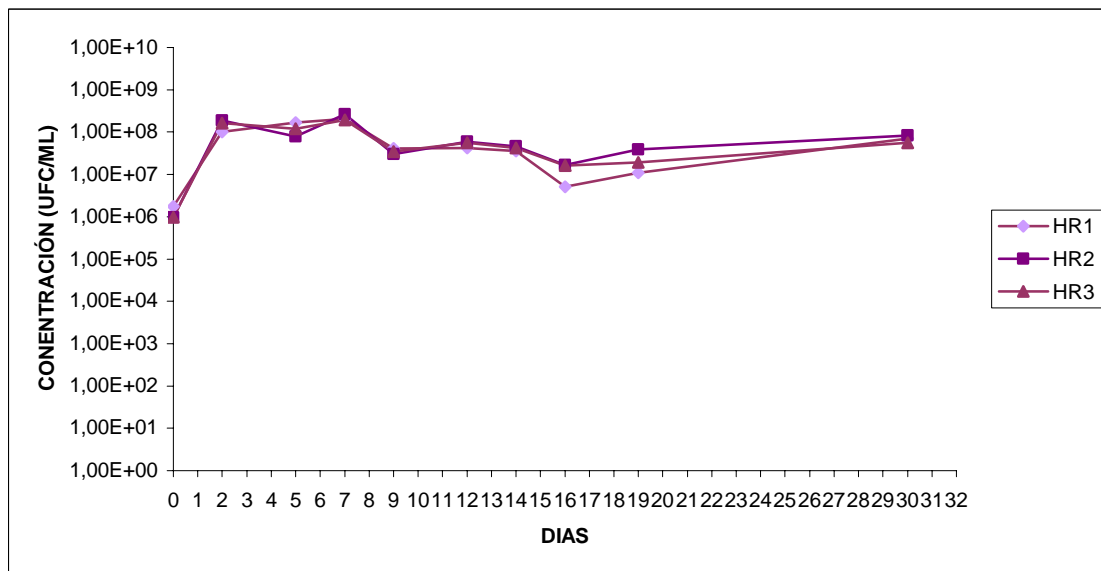
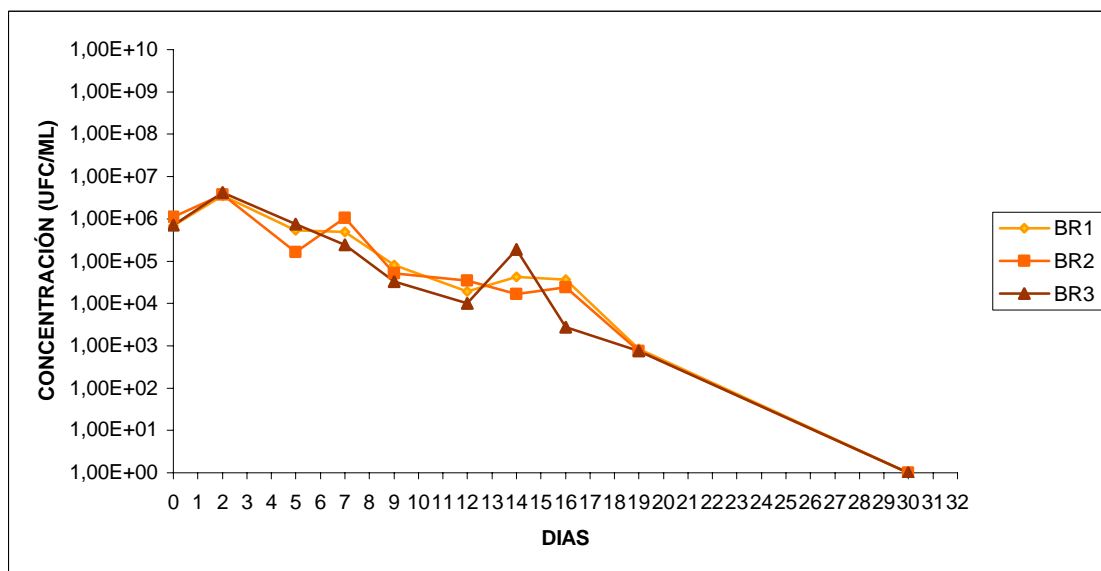
- RUEDA C, PALACIOS S. 2006. Fitoestrógenos: estado actual. Instituto Palacios Salud y Medicina de la Mujer. Universidad del Rosario. Madrid, España.
<http://encolombia.com/medicina/menopausia/meno9103-fitoestogenos.htm>
- SCHLEGEL H. 1997. Hidrobiología general, ediciones Omega, S.A., Barcelona, España. 657pp.
- SCHREZENMEIR J, DE VRESE M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definition. American Journal of Clinical Nutrition. 73: 361-364
- SHAH, N. 2001. Funcional Food from Probiotics and Prebiotics. Food technology. 55 (11); 46-52
- SILVA, E. VERDALET, I. 2003. Alimentos e ingredientes derivados de la leche, Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 53(4); 1-24
- TANNOCK GW, MUNRO K, HARMSEN HJ, WELLING GW, SMART J, GOPAL PK. 2000. Analysis of fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing lactobacillus rhamnosus DR20. appl Environ Microbiol. 66; 2578-2588
- TARANTO, MP., MÉDICI, M., FRONT DE VALDEZ, G. 2005. Alimentos funcionales probióticos, revista Química Viva. 1 (4); 26-34
- VAN LOO J, COUSSEMENT P, DE LEENHEER L, HOEBREGS H, SMITS G. 1995. Inulin and oligofructosa in the western diets. CRC Crit Rev Food Sci Technol.
- VINDEROLA C.G., PROSELLO W., GHILBERTO D. AND REINHEIMER J 2000. Viability of probiotic (Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus and

Lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in argentinian fresh cheese.
Journal of dairy Science 83; 1905-1911

- WANG X, GIBSON GR. 1993. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. Journal of Applied Bacteriology. 75; 373-380
- LEE YK, NOMOTO K, SALMINEN S, GORBACH S. 1999. Handbook of probiotics. Wiley interscience publication. New york. U.S.A. 211 pp.
- ZIEMER CJ, GIBSON GR. 1998. An overview the probiotics, prebiotics and simbiotics in de funcional food concept: perspectiva and future strategies. Int Dairy J. 8(5/6); 473-479

ANEXOS

ANEXO 1

Curvas de crecimiento para *Lactobacillus casei* en medio con harina de linaza (3 repeticiones)**Curvas de crecimiento para *Lactobacillus casei* en agua destilada (blanco) (3 repeticiones)**

ANEXO 2

Análisis de regresión para el crecimiento de *Lactobacillus casei* en medio con harina de linazaRegression Analysis - Exponential model: $Y = \exp(a + b \cdot X)$ Dependent variable: CONCENTRACION
Independent variable: TIEMPO

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	17,2535	0,834251	20,6814	0,0000
Slope	0,0194213	0,0587559	0,330543	0,7495

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0,270217	1	0,270217	0,11	0,7495
Residual	19,7856	8	2,47319		
Total (Corr.)	20,0558	9			

Correlation Coefficient = 0,116075
R-squared = 1,34733 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = -10,9843 percent
Standard Error of Est. = 1,57264
Mean absolute error = 1,03193
Durbin-Watson statistic = 1,48337 (P=0,0977)
Lag 1 residual autocorrelation = -0,00661266

Análisis de regresión para el crecimiento de *Lactobacillus casei* en agua destilada (blanco)Regression Analysis - Exponential model: $Y = \exp(a + b \cdot X)$ Dependent variable: CONCENTRACION
Independent variable: TIEMPO

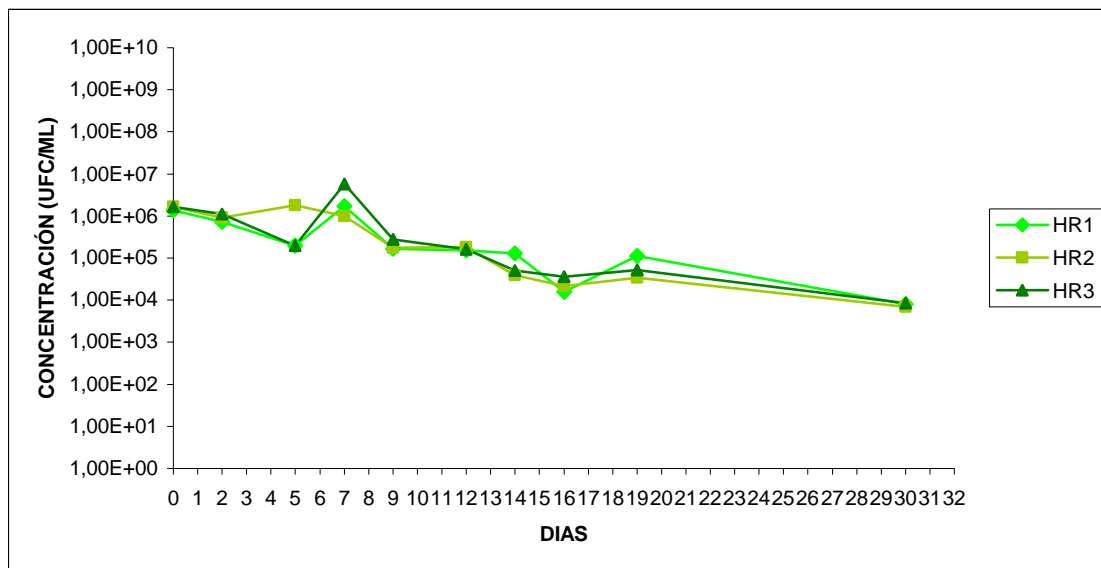
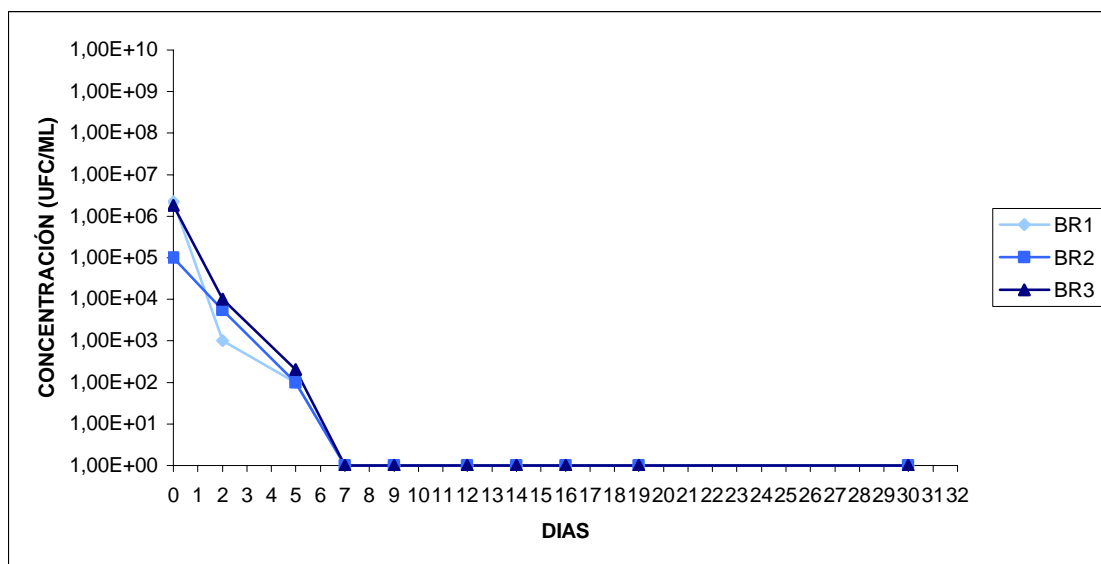
Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	15,7229	0,751234	20,9295	0,0000
Slope	-0,467012	0,0529091	-8,82669	0,0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	156,247	1	156,247	77,91	0,0000
Residual	16,0437	8	2,00547		
Total (Corr.)	172,291	9			

Correlation Coefficient = -0,952302
R-squared = 90,688 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 89,524 percent
Standard Error of Est. = 1,41615
Mean absolute error = 1,00612
Durbin-Watson statistic = 1,32344 (P=0,0561)
Lag 1 residual autocorrelation = 0,111931

ANEXO 3

Curvas de crecimiento para *Lactobacillus acidophilus* en medio con harina de linaza (3 repeticiones)**Curvas de crecimiento para *Lactobacillus acidophilus* en agua destilada (blanco) (3 repeticiones)**

ANEXO 4

Análisis de regresión para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en medio con harina de linaza

Regression Analysis - Exponential model: $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Dependent variable: CONCENTRACION
Independent variable: TEIMPO

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	14,4096	0,439061	32,819	0,0000
Slope	-0,193851	0,0309228	-6,26886	0,0002

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	26,921	1	26,921	39,30	0,0002
Residual	5,4803	8	0,685038		
Total (Corr.)	32,4013	9			

Correlation Coefficient = -0,911516
R-squared = 83,0862 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 80,9719 percent
Standard Error of Est. = 0,82767
Mean absolute error = 0,5223
Durbin-Watson statistic = 2,06849 (P=0,3034)
Lag 1 residual autocorrelation = -0,0488826

Análisis de regresión para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en agua destilada (blanco)

Regression Analysis - Exponential model: $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Dependent variable: CONCENTRACION
Independent variable: TIEMPO

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	7,11502	2,03048	3,50411	0,0080
Slope	-0,381664	0,143006	-2,66888	0,0284

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	104,356	1	104,356	7,12	0,0284
Residual	117,207	8	14,6508		
Total (Corr.)	221,563	9			

Correlation Coefficient = -0,686295
R-squared = 47,1001 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 40,4876 percent
Standard Error of Est. = 3,82764
Mean absolute error = 2,75098
Durbin-Watson statistic = 0,58311 (P=0,0005)
Lag 1 residual autocorrelation = 0,417898

ANEXO 5

Análisis de covarianza del experimento

Analysis of Variance for CONCENTRACIÓN - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value

COVARIATES					
TIEMPO	3,04759E15	1	3,04759E15	1,94	0,1667
MAIN EFFECTS					
A:MEDIO	3,97536E16	1	3,97536E16	25,27	0,0000
B:MO	3,96055E16	1	3,96055E16	25,17	0,0000
C:REPETICION	1,915E14	2	9,57502E13	0,06	0,9410
RESIDUAL	1,79362E17	114	1,57335E15		

TOTAL (CORRECTED)	2,61961E17	119			

All F-ratios are based on the residual mean square error.