



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Ingeniería en Alimentos

Determinación de la capacidad de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* para liberar lignanos a partir de harina de linaza

Memoria presentada como parte de los
requisitos para optar al título de
Ingeniero en Alimentos

Daniela Alejandra Ampuero Guíñez

Valdivia – Chile

2011

PROFESOR PATROCINANTE:

Sr. Ociel Muñoz Fariña

Bioquímico. Dr. en Ciencias Químicas

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESORES INFORMANTES:

Sr. Alejandro Romero Mella

Bioquímico, Ph. D.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Sr. Haroldo Magariños Hawkins

Técnico en Lechería.

Magíster en Ciencia y Tecnología de la Leche

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
1	INTRODUCCIÓN	3
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	Linaza	5
2.1.1	Historia de la linaza	5
2.1.2	Características de la linaza	6
2.1.3	Composición de la linaza	6
2.1.3.1	Lípidos	6
2.1.3.2	Carbohidratos	8
2.1.3.3	Proteínas	8
2.1.3.4	Vitaminas y minerales	10
2.1.3.5	Compuestos fenólicos	11
2.1.3.5.1	Lignanos	11
2.1.3.5.2	Metabolismo de lignanos	13
2.1.3.5.3	Efectos biológicos de los lignanos	17
2.1.3.5.4	Contenido de lignanos en linaza comparado con otros alimentos	18

2.2	Probióticos	19
2.2.1	Historia de los probióticos	20
2.2.2	Mecanismo de acción de los probióticos	20
2.2.3	Efectos beneficiosos para la salud	21
2.2.4	Viabilidad de los probióticos	22
2.2.5	Selección de probióticos	22
2.2.6	Características del grupo <i>Lactobacillus acidophilus</i>	22
2.2.7	Características del grupo <i>Lactobacillus casei</i>	23
2.3	Prebióticos	24
2.3.1	Simbiosis	25
2.4	Aminoácidos libres	26
2.5	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	27
3	MATERIAL Y MÉTODO	30
3.1	Lugar de trabajo	30
3.2	Materiales y equipos	30
3.2.1	Materia prima	30
3.2.2	Microorganismos	30
3.2.3	Activación de los microorganismos	30
3.3	Metodología	30
3.3.1	Preparación de las muestras	31

3.3.2	Cultivo de microorganismos	32
3.3.3	Diluciones seriadas e inoculo de probióticos <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i> en placas petri por recuento	33
3.3.4	Análisis químico realizados a las muestras	34
3.3.4.1	Determinación de lignanos	34
3.3.4.2	Determinación de aminoácidos libres	36
3.3.5	Diseño experimental	38
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
4.1	Cinética de microorganismos	40
4.2	Determinación de lignanos	42
4.2.1	Determinación de los cambios de SDG, en la fermentación de harinas de linaza	42
4.2.2	Determinación de los cambios de SECO, en la fermentación de harinas de linaza	44
4.2.3	Determinación de los cambios de END, en la fermentación de harinas de linaza	46
4.2.4	Determinación de los cambios de ENL, en la fermentación de harinas de linaza	48
4.3	Bioaccesibilidad de los lignanos de la harina de linaza entera y desgrasada	48
4.4	Determinación de aminoácidos libres	54
4.4.1	Aminoácidos alifáticos	55

4.4.2	Aminoácidos aromáticos	56
4.4.3	Aminoácidos azufrados	57
4.4.4	Aminoácidos hidrofílicos	59
4.4.4.1	Aminoácidos ácidos	59
4.4.4.2	Aminoácidos básicos	59
4.4.4.3	Aminoácidos hidroxilados	60
5	CONCLUSIONES	66
6	BIBLIOGRAFÍA	67
7	ANEXOS	74

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición de aminoácidos en linaza entera y harina de linaza	9
2	Contenido vitamínico de la linaza	10
3	Contenido de lignanos en varios alimentos	18
4	Microorganismos usados como probióticos	19
5	Efectos beneficiosos sobre la salud documentados en ensayos clínicos en humanos de algunos microorganismos usados como probióticos	21
6	Taxonomía de <i>Lactobacillus casei</i>	24
7	Parámetros instrumentales y experimentales para la determinación de lignanos por HPLC	35
8	Gradiente utilizado para la determinación de lignanos	36
9	Parámetros instrumentales y experimentales para la determinación de aminoácidos libres por HPLC	37
10	Gradiente utilizado para la determinación de aminoácidos libres	38
11	Bioaccesibilidad de lignanos	49

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso metabólico de ácidos grasos omega-3 y omega-6	7
2	Estructura química de secoisolariciresinol diglicósido y sus metabolitos	12
3	Estructura química de lignanos	13
4	Metabolismo de los lignanos de la linaza por bacterias en el intestino	14
5	Circulación enterohepática de lignanos, sus metabolitos del colon e hígado. Los sitios de metabolismo, absorción y secreción son mostrados esquemáticamente	16
6	Esquema de preparación de muestras	31
7	Procedimiento experimental del cultivo de microorganismos	32
8	Diluciones y siembra de microorganismos probióticos	33
9	Diseño experimental	39
10	Cinética de microorganismos	41
11	Cromatograma del conjunto de lignanos vegetales y mamíferos	42
12	Producción de SDG en la fermentación de harina de linaza entera y desgrasada	44
13	Producción de SECO en la fermentación de harina de linaza entera y desgrasada	46
14	Producción de END en la fermentación de harina de linaza entera y desgrasada	48

15	Cromatograma de la producción de lignanos en la fermentación de <i>L. casei</i> en un medio con harina de linaza entera durante 12 días	50
16	Cromatograma de la producción de lignanos en la fermentación de <i>L. casei</i> en un medio con harina de linaza desgrasada durante 12 días	51
17	Cromatograma de la producción de lignanos en la fermentación de <i>L. acidophilus</i> en un medio con harina de linaza entera durante 12 días	52
18	Cromatograma de la producción de lignanos en la fermentación de <i>L. acidophilus</i> en un medio con harina de linaza desgrasada durante 12 días	53
19	Cromatograma de patrones de PITC-aminoácidos	54
20	Aminoácidos alifáticos estudiado en la fermentación de los probióticos	56
21	Aminoácidos aromáticos estudiados en la fermentación de los probióticos	57
22	Aminoácido azufrado estudiado en la fermentación de los probióticos	58
23	Aminoácidos ácidos estudiados en la fermentación de los probióticos	59
24	Aminoácidos básicos estudiados en la fermentación de los probióticos	60
25	Aminoácidos hidroxilados estudiados en la fermentación de los probióticos	61
26	Cromatograma de la producción de aminoácidos libres en la fermentación de <i>L. casei</i> en un medio con harina entera durante 12 días	62
27	Cromatograma de la producción de aminoácidos libres en la fermentación de <i>L. casei</i> en un medio con harina desgrasada durante 12 días	63

- | | | |
|----|---|----|
| 28 | Cromatograma de la producción de aminoácidos libres en la fermentación de <i>L. acidophilus</i> en un medio con harina entera durante 12 días | 64 |
| 29 | Cromatograma de la producción de aminoácidos libres en la fermentación de <i>L. acidophilus</i> en un medio con harina desgrasada durante 12 días | 65 |

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Modo de empleo de caldo de Man, Rogosa y Sharpe	74
2	Método del recuento de <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	75
3	Curva de calibración de lignanos	77
4	Curva de calibración de aminoácidos libres	78

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar si las bacterias lácticas *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* son capaces de fermentar harina de linaza, liberar y metabolizar el secoisolariciresinol diglicósido (SDG) generando los lignanos mamíferos, enterodiol y enterolactona. Para el cumplimiento de dicho objetivo los microorganismos se cultivaron en medios que contenían 5 mg de harina de linaza entera y harina de linaza desgrasada en agua. El *Lactobacillus casei* fue incubado en aerobiosis a $32^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y *Lactobacillus acidophilus* en campanas de anaerobiosis a $38^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Las muestras fueron analizadas durante un período de tiempo representado en horas (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 168, 216, 288), separadas en fase sólida (SPE) y finalmente llevadas a cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Paralelo a ello, se evaluó la degradación de las proteínas en la fermentación de harinas de linaza mediante la determinación de aminoácidos libres por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con derivatización por fenilisotiocianato.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio, las bacterias lácticas *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* son capaces de metabolizar el secoisolariciresinol diglicósido (SDG), pero sólo el *Lactobacillus casei* es capaz de liberar el agliconas secoisolariciresinol (SECO) y generar enterodiol (ED), lignano con actividad biológica. Las bacterias estudiadas no generan enterolactona (EL) en medios con harina de linaza entera y harina de linaza desgrasada, debido a que el enterodiol (ED) no es oxidado. Mediante este estudio queda comprobado que el *Lactobacillus casei* es adecuado para la conversión de lignanos, lo cual hace factible la posibilidad de incluir linaza en alimentos lácticos que contengan esta bacteria, lo que ayudaría o mejoraría la bioaccesibilidad de estos compuestos en el sistema digestivo.

Además, se puede apreciar durante la fermentación de las harinas de linaza entera y desgrasada con *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* que se produce la degradación de las proteínas a aminoácidos libres.

SUMMARY

The objective of this study was to determine if the lactic acid bacteria *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* are capable to ferment flaxseed meal, release and metabolize diglucoside secoisolariciresinol (SDG) to generate the mammalian lignans, enterodiol and enterolactone.

To fulfill this objective the microorganisms were cultured in media containing 5 mg of whole flaxseed flour and defatted flax flour in water. *Lactobacillus casei* was incubated aerobically at $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and *Lactobacillus acidophilus* in anaerobic chamber at $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The samples were analyzed over a period of time represented in hours (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 168, 216, 288), separated in solid phase (SPE) and finally led to high performance liquid chromatography (HPLC). Additionally, the protein degradation in the fermentation of flaxseed meal was evaluated for free amino acid determination by high performance liquid chromatography (HPLC) with derivatization by phenylisothiocyanate.

According to the results of this study, the lactic acid bacteria *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* are able to metabolize diglucoside secoisolariciresinol (SDG), but only *Lactobacillus casei* is capable to release the aglycones secoisolariciresinol (SECO) and generate enterodiol (ED), a lignan with biological activity. The bacteria studied did not produce enterolactone (EL) when they were in mediums with linseed meal defatted and whole, because the enterodiol (ED) is not oxidized. Through this study it has been proven that *Lactobacillus casei* is suitable for the conversion of lignans, which makes factible the possibility of including flaxseed in dairy foods containing this bacteria, which would help or improve the bioavailability of these compounds in the digestive system.

In addition, it can be seen that during the fermentation of whole flaxseed and defatted meal with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* produces protein degradation to free amino acid.

1 INTRODUCCION

Los beneficios de una correcta alimentación van más allá del adecuado aporte energético y la prevención de enfermedades carenciales. Es por esta razón que en la última década se ha centrado la atención en los alimentos funcionales, los cuales tienen como fin promover la salud y contribuir al bienestar de aquel que la consume, así como, reducir el riesgo de contraer enfermedades.

Dentro de este marco se encuentran los probióticos, microorganismos vivos que al administrarse en cantidades adecuadas confieren beneficios en la salud.

Del mismo modo, se ha puesto gran interés en la linaza por poseer un exclusivo perfil de nutrimentos e importantes cantidades de compuestos bioactivos, como ácido alfa-linolénico, lignanos y fibra dietética. El secoisolariciresinol diglicósido (SDG) es un lignano abundante en la dieta que se encuentra en varios alimentos, y en altas concentraciones en la linaza. EL SDG es metabolizado por las bacterias del colon a los llamados lignanos mamíferos (enterodiol y enterolactona), y su interés radica en que estos compuestos tendrían la capacidad de prevenir la aparición de cáncer, especialmente los dependientes de hormonas como el de mamas y próstata, y a la vez disminuir, la arteriosclerosis y diabetes.

En el presente estudio se determinó si las bacterias lácticas *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* son capaces de metabolizar la linaza y producir secoisolariciresinol diglicósido (SDG), y subsecuentemente generar los lignanos mamíferos con actividad biológica enterodiol y enterolactona, con la finalidad de determinar la factibilidad de incluir linaza en alimentos lácticos y ayudar o mejorar la bioaccesibilidad de los lignanos en el sistema digestivo.

HIPÓTESIS

Las bacterias lácticas *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* son capaces de fermentar harina de linaza, liberar y metabolizar el secoisolariciresinol diglicósido (SDG) generando los lignanos mamíferos enterodiol y enterolactona.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la capacidad de las bacterias lácticas (*Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*) de fermentar harina de linaza y producir lignanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar los lignanos (SDG, SECO, ED y EL) que se generan a partir de la fermentación de harina de linaza por bacterias lácticas.
- Evaluar la degradación o metabolización de las proteínas en la fermentación de harina de linaza por bacterias lácticas.
- Comparar distintas cepas de bacterias lácticas, y evaluar su capacidad de producción de lignanos en la fermentación de linaza.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Linaza

La linaza (*Linum usitatissimum L*) es la semilla de la planta de lino, una especie anual de entre 0,3 y 1 metro de altura, de la familia de las Lináceas, que se cultiva para producir fibra y aceite de lino, el cual es un aceite secante que se utiliza para la fabricación de pinturas, linóleo y jabones suaves (MORRIS, 2003).

La linaza ha sido incorporada como un ingrediente en varias formulaciones de alimentos y actualmente ha crecido la demanda en la industria de alimentos (FIGUEROLA *et al.*, 2008).

2.1.1 Historia de la linaza. El origen de la linaza no está definido con exactitud, posiblemente sea del Mediterráneo o de Asia occidental. Se cultiva en Sudamérica en regiones templadas y subtropicales como fuente de fibra, aceite y para usos medicinales. Se propaga por medio de semillas en suelos bien abonados y drenados (MORRIS, 2003).

Es un producto milenario. Los arqueólogos han hallado prendas de lino en las pirámides; en La Odisea, de Homero se menciona como material para la construcción de embarcaciones; y en la Biblia tiene también algunas apariciones. En Egipto antiguo se utilizaba para la preparación de aceites para embalsamar a las momias (OOMAH, 2001).

Algunos registros muestran que en el sur de la antigua Mesopotamia se usaba el riego para cultivar linaza. Los babilonios cultivaron semilla de linaza desde el año 3000 A.C. y un milenio después, Hipócrates usaba la semilla de linaza para aliviar el malestar intestinal (THOMPSON *et al.*, 1991).

La semilla de linaza era tan importante para la salud en estas épocas que en el Siglo VIII, Carlo Magno emitió leyes y reglamentos que regían su consumo (THOMPSON *et al.*, 1991).

Actualmente se cultiva en alrededor de 50 países, la mayoría de los cuales están en el hemisferio norte. Canadá es el principal productor, seguido por China, Estados Unidos

e India. La producción en Chile es muy pequeña y la mayoría de lo que se consume, ya sea como suplemento o como ingrediente para repostería, se importa desde Canadá (FIGUEROLA *et al.*, 2008; RUBILAR *et al.*, 2010).

Las propiedades de la linaza son múltiples y tienen que ver principalmente con su alto contenido de ácidos grasos omega 3, proteínas, vitaminas y fibra soluble e insoluble (MORRIS, 2003; RUBILAR *et al.*, 2010).

2.1.2 Características de la linaza. La semilla de linaza se caracteriza por ser de forma plana y ovalada, con un extremo aguzado y una longitud de 4 a 6 mm. El revestimiento de la semilla posee una apariencia suave y brillante, y el color puede variar entre marrón oscuro y amarillo claro (FIGUEROLA *et al.*, 2008).

Esta semilla está formada por una cubierta, un embrión que consta de dos cotiledones grandes y aplanados que constituyen la mayor proporción del embrión, un hipocótilo corto y una radícula. La cubierta de la semilla de lino se genera a partir del óvulo y se compone de cinco capas diferentes, siendo la más importante la capa epidérmica, conocida como mucílago, y la testa que se compone de células pigmentadas que determinan el color de la semilla y que contienen la mayoría de la fibra soluble y dos interiores ricas en fibra y lignanos (MAZZA, 2000).

2.1.3 Composición de la linaza.

La linaza consta de 40% de lípidos, 30% de fibra dietética y 20 % de proteína. La composición proximal de la semilla varía principalmente de acuerdo a la genética y el medio ambiente, entre otros (FIGUEROLA *et al.*, 2008, RUBILAR *et al.*, 2010).

2.1.3.1 Lípidos. La linaza es una semilla oleaginosa, fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente en ácido α -linolénico (ALA), ácido graso esencial omega 3 (ω -3) y ácido linoleico, ácido graso esencial omega 6 (ω -6). Estos ácidos grasos poliinsaturados son esenciales para los humanos, y deben obtenerse de las grasas y aceites de los alimentos debido a que el organismo no los produce.

El ácido α -linolénico y ácido linoleico constituyen el 57% y 16% del total de ácidos grasos totales en la semilla de linaza respectivamente (DAUN y DECLERCQ, 1994; DAUN *et al.*, 2003).

Los ácidos grasos esenciales son precursores de ácidos grasos de cadena larga, algunos de los cuales se convierten en compuestos poderosos que afectan varios procesos biológicos, incluyendo la inflamación y señalización de las células. Además son necesarios para la estructura de las membranas de las células y dado que son insaturados, ayudan a mantener las membranas flexibles. Afectan la expresión de los genes, es decir, activan a los genes para la creación de proteínas celulares y poseen acciones antibacteriales (MORRIS, 2003).

En la Figura 1 se muestra la conversión de ALA a ácidos grasos de cadena larga, ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA), y el metabolismo de ácidos grasos omega 6. El ALA se convierte en ácidos grasos omega-3 de cadena larga a través de una serie de desaturaciones y elongaciones.

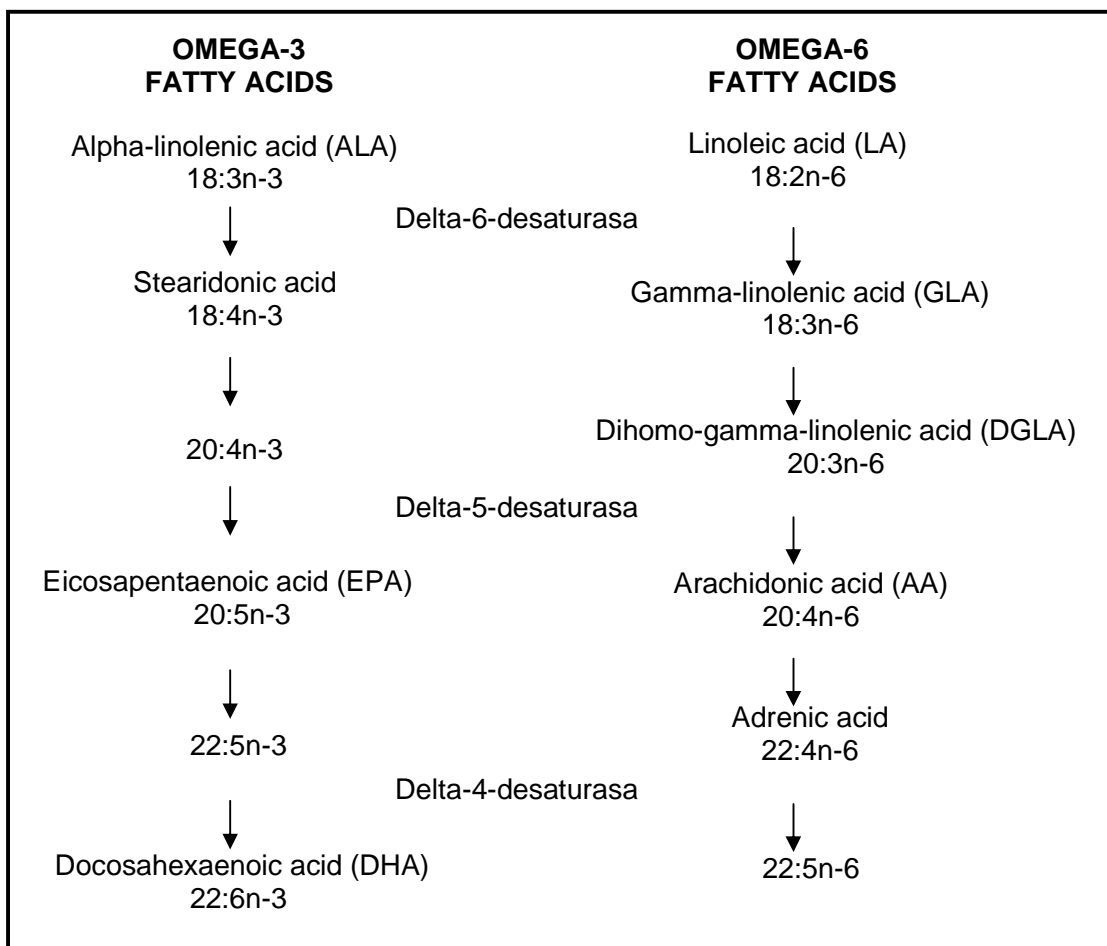


FIGURA 1 Proceso metabólico de ácidos grasos omega-3 y omega-6.

FUENTE: MORRIS (2003)

Los ácidos grasos omega-3 tienen efectos biológicos que los hacen útiles en la prevención y tratamiento de condiciones crónicas como la diabetes tipo 2, enfermedades del hígado, artritis reumatoide, presión alta de la sangre, enfermedades coronarias, embolias, enfermedad de Alzheimer, alcoholismo y ciertos tipos de cáncer.

Complementar la dieta con linaza aumenta el contenido de fosfolípidos, triglicéridos y/o ésteres de colesterol de dos a ocho veces en la sangre (TOBOREK *et al.*, 2002; SAMPATH and NTAMBI, 2004).

2.1.3.2 Carbohidratos. La linaza posee un bajo contenido de carbohidratos, el cual equivale a 1g/100g de linaza. Los carbohidratos presentes en mayor proporción en esta semilla son la fibra dietética, siendo rica fuente de fibra dietética soluble e insoluble, la que en total puede alcanzar el 28% del peso seco de la semilla, con una relación de 75% de fibra insoluble y 25% de fibra soluble o mucílago.

La fibra dietética actúa como un agente esponjante en el intestino. Dicha fibra incrementa el peso fecal y la viscosidad del material digerido, mientras que reduce el tiempo de tránsito del material a través del intestino. De esta manera, la fibra dietética ayuda a controlar el apetito y la glucosa en la sangre, promueve la laxación y reduce los lípidos de la sangre. Las dietas ricas en fibra dietética pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedades del corazón, diabetes, el cáncer colorrectal, la obesidad e inflamación (BRENNAN, 2005; FIGUEROLA *et al.*, 2008; MORRIS, 2003).

2.1.3.3 Proteínas. La linaza es rica en arginina, ácido aspártico y ácido glutámico; mientras que los aminoácidos limitantes son lisina, metionina y cisteína como lo indica el Cuadro 1.

En comparación a otras semillas, el contenido de globulinas y albúminas constituye el 77% y 27% de la proteína total, respectivamente.

Las condiciones de procesamiento (descarado o desgrasado) afectan el contenido de proteína del producto derivado de la linaza. La cáscara de linaza tiene bajo contenido de proteínas, por lo que, la harina sin cáscara y desgrasada tiene un alto valor proteico (FIGUEROLA *et al.*, 2008, MORRIS, 2003).

CUADRO 1 Composición de aminoácidos en linaza entera y harina de linaza.

Aminoácidos (Abreviatura)	Linaza entera (g/100g)	Harina de linaza (g/100g)
Alanina (Ala)	4,4	5,5
Arginina (Arg)	9,2	11,1
Ácido aspártico (Asp)	9,3	12,4
Cistina (C-C)	1,1	4,3
Ácido glutámico (Glu)	19,6	26,4
Glicina (Gly)	5,8	7,1
Histidina (His) *	2,2	3,1
Isoleucina (Ile) *	4,0	5,0
Leucina (Leu) *	5,8	7,1
Lisina (Lys) *	4,0	4,3
Metionina (Met) *	1,5	2,5
Fenilalanina (Phe) *	4,6	5,3
Prolina (Pro)	3,5	5,5
Serina (Ser)	4,5	5,9
Treonina (Thr) *	3,6	5,1
Triptófano (Trp)	1,8	1,7
Tirosina (Tyr)	2,3	3,1
Valina (Val) *	4,6	5,6

* Aminoácidos esenciales para los humanos

FUENTE: Adaptado de BHATTY and CHERDKIATGUMCHAI (1990) y MORRIS (2003).

2.1.3.4 Vitaminas y minerales. Entre los minerales que contiene la linaza destaca el potasio, fósforo, hierro, zinc y manganeso (FIGUEROLA *et al.*, 2008). Dentro de las vitaminas que contiene la semilla predominan las del grupo B como lo muestra el Cuadro 2. Además está presente la vitamina E, vitamina soluble en grasa que se encuentra principalmente como gamma-tocoferol. El gamma-tocoferol es un antioxidante que protege a las proteínas celulares y a las grasas de la oxidación, promueve la excreción de sodio en la orina, lo cual puede ayudar a disminuir la presión en la sangre; y ayuda a reducir el riesgo de enfermedades del corazón, algunos tipos de cáncer y la enfermedad de Alzheimer (MORRIS, 2003). El contenido de gamma-tocoferol puede variar desde 8,5 a 39,5 mg/100g de semilla o entre 0,7-3,2 mg/cda de linaza molida (DAUN *et al.*, 2003).

CUADRO 2 Contenido vitamínico de la linaza

Soluble en agua	mg/100g	Linaza molida (mg/cda)
Ácido ascórbico/ Vitamina C	0,50	0,04
Tiamina/Vitamina B ₁	0,53	0,04
Riboflavina/Vitamina B ₂	0,23	0,02
Niacina/ácido nicotínico	3,21	0,26
Piridoxina/Vitamina B ₆	0,61	0,05
Ácido pantoténico	0,57 mcg/100g	0,05 mcg/100g
Ácido fólico	112	9,0
Biotina	6	0,5
Soluble en grasa	mg/Kg en aceite	mg/cda en aceite
Alfa-tocoferol	7	0,10
Delta-tocoferol	10	0,14
Gamma-tocoferol	552	7,73 mcg/cda
Vitamina K	No detectable	0,3

cda = cucharada

FUENTE: Adaptado de MORRIS (2003)

2.1.3.5 Compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos son estructuras químicas formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyéndose también derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. Estos compuestos están distribuidos en todo el reino vegetal, siendo la forma más frecuente de encontrarlos en la naturaleza conjugados con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque en algunos casos se pueden producir uniones entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Los más comunes son la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y xilosa, así como los ácidos glucurónico y galacturónico (BRAVO and SAURA-CALIXTO, 1998).

Los compuestos fenólicos tienen importancia en la salud, ya que se incorporan al organismo humano al consumir alimentos de origen vegetal. La linaza posee una alta concentración de compuestos fenólicos donde los lignanos son de particular relevancia.

2.1.3.5.1 Lignanos. Los lignanos son compuestos encontrados en altas concentraciones en la linaza como secoisolariciresinol diglicósido (SDG). Se ha descrito que los lignanos son compuestos biológicamente activos con propiedades tales como, estrogénicas y antiestrogénicas, antioxidantes, antitumorales e inhibición de enzimas envueltas en el metabolismo hormonal. Es por esta razón que se le han asociado con efectos beneficiosos en disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, diabetes y enfermedades renales. Así mismo, tiene implicancias en la prevención de cáncer de mama y próstata. Sin embargo, estos posibles efectos en la salud dependen de la microbiota humana (CLAVEL *et al.*, 2005; LAMPE, 2006, RUBILAR *et al.*, 2010).

MAZZA (2000) define los lignanos como “compuestos fenólicos formados por la unión de dos residuos de ácido cinámico que contienen un núcleo de 2,3-dibencilbutano”.

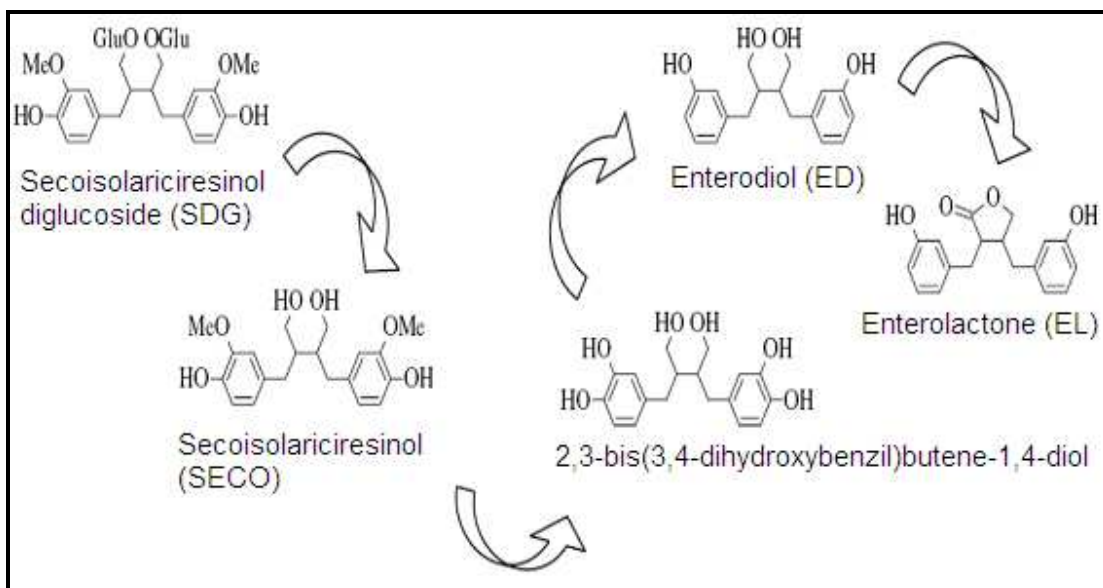


FIGURA 2 Estructura química de secoisolariciresinol diglicósido (SDG) y sus metabolitos.

FUENTE: KITTS *et al.* (1999)

Las bacterias intestinales convierten el secoisolariciresinol diglicósido (SDG), vía el agliconas secoisolariciresinol (SECO) a los lignanos mamíferos enterodiol y enterolactona (Figura 2), que han sido definidos como los principales lignanos presentes en el suero, orina, bilis y fluidos seminales de humanos y animales (CLAVEL *et al.*, 2005; WANG, 2002).

Otros lignanos presentes en la linaza son el isolariciresinol, pinoresinol y mataresinol y otros derivados del ácido ferúlico como lo muestra la Figura 3 (FIGUEROLA *et al.*, 2008; RUBILAR *et al.*, 2010).

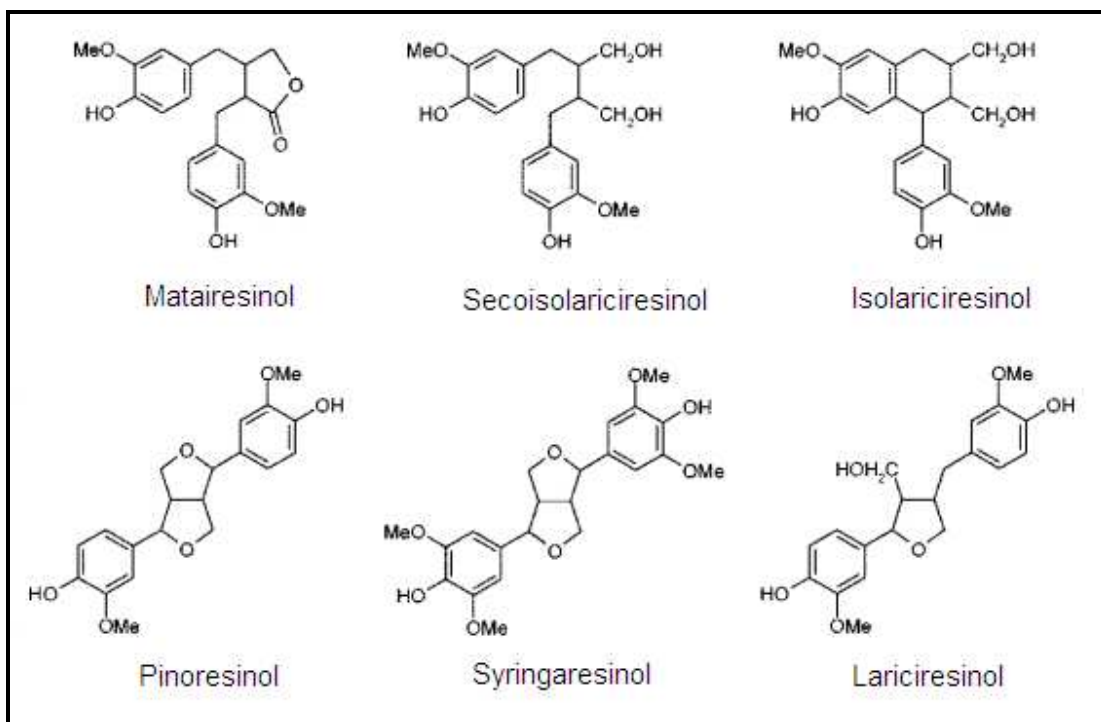


FIGURA 3 Estructura química de lignanos

FUENTE: BEGUM *et al.* (2004)

2.1.3.5.2 Metabolismo de lignanos. Los lignanos secoisolariciresinol diglicósido (SDG) provenientes de la dieta al momento de ser ingeridos son sometidos al proceso de digestión, en el cual factores como el pH gástrico e intestinal, las fermentaciones intestinales, la excreción biliar, el tiempo de tránsito en el tubo digestivo, entre otros, pueden afectar a la biodisponibilidad y a la absorción (GEE *et al.*, 1998).

El SDG es metabolizado por las bacterias intestinales humano a través de una serie de reacciones de hidrólisis, dehidroxilación y reacciones de demetilación a enterodiol que puede ser oxidado a enterolactona como lo muestra la Figura 4 (HU *et al.*, 2007).

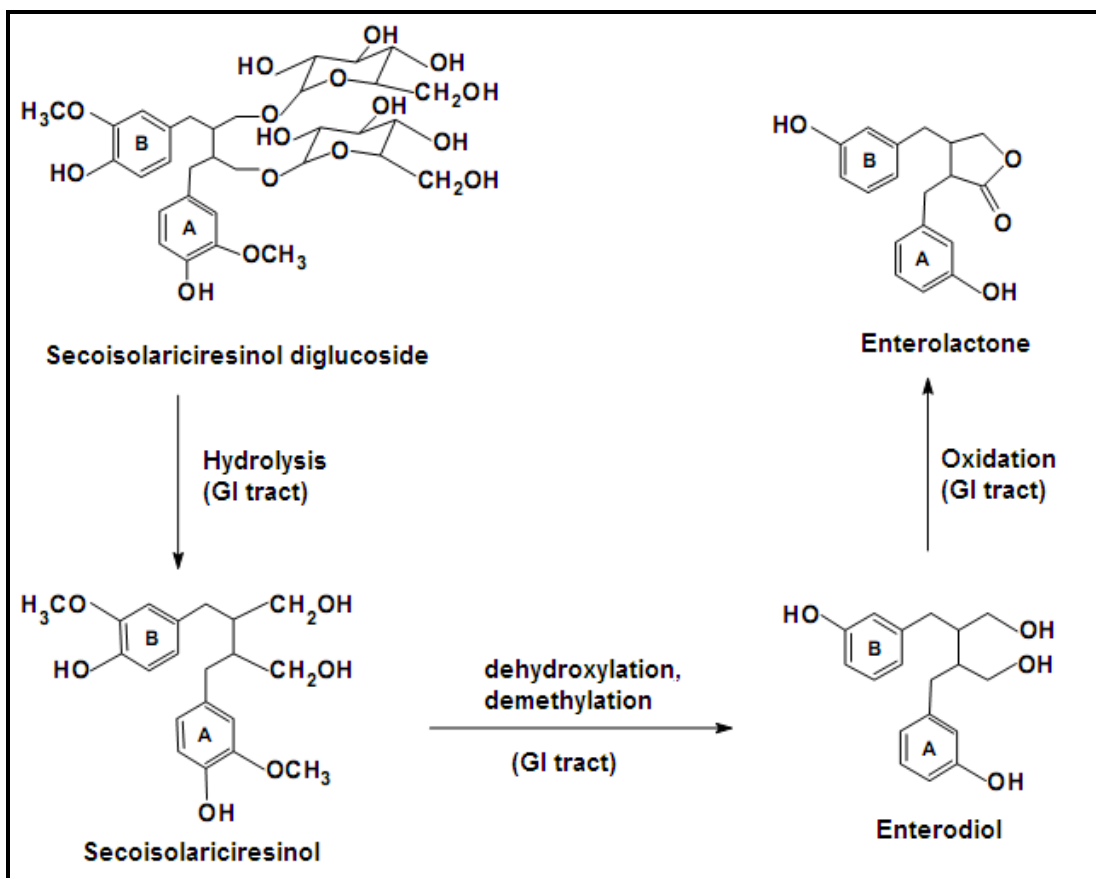


FIGURA 4 Metabolismo de los lignanos de la linaza por bacterias en el intestino.
FUENTE: HU *et al.* (2007)

Estas bacterias intestinales junto a las enzimas β -glucosidasas de los alimentos y al ácido clorhídrico gástrico hidrolizan los compuestos conjugados a su agliconas secoisolariciresinol (SECO) transformándolos en lignanos mamíferos enterodiol y enterolactona respectivamente. Estos últimos poseen mayor capacidad antioxidante que sus precursores. Se les denomina lignanos mamíferos debido a que son producidos en el intestino de los humanos y otros mamíferos. El grado de conversión depende de la actividad de la microflora intestinal y el uso de antimicrobianos (CLAVEL *et al.*, 2005; MORRIS, 2003).

Una vez que son absorbidos en el intestino delgado los lignanos se conjugan nuevamente en el hígado con ácido glucurónico y sulfato, a través de reacciones catalizadas por enzimas de fase II (UPD-glucuronosiltransferasas y sulfotransferasas)

con la finalidad de aumentar la polaridad de las sustancias exógenas, para facilitar al organismo su excreción. La sulfatación es mediada por la enzima sulfurotransferasas, adquiridas en la dieta y tiene la función de catalizar la transferencia de un grupo sulfato de la 3-adenosina-5'-fosfosulfato a un grupo hidroxilo de diferentes sustratos. Mientras que la glucuronidación es realizada por la enzima uribin-bifosfato-glucuronosiltransferasa, enzima que se encuentra en la membrana del retículo endoplasmático de distintos tejidos y la cual cataliza la transferencia de un ácido glucurónico desde el ácido UDP-glucurónico a esteroides, ácidos biliares, polifenoles y miles de componentes de la dieta (MORRIS, 2003).

MORRIS (2003) señala que los lignanos mamíferos, enterodiol y enterolactona poseen tres destinos metabólicos como lo indica la Figura 5:

1. Pueden ser excretados directamente en las heces.
2. Pueden ser tomados por células epiteliales de las paredes del colon humano, conjugadas con ácido glucurónico ó sulfato y excretadas en las heces, ó pueden entrar en la circulación.
3. Pueden ser absorbidos en el intestino y transportados al hígado, en donde formas libres son conjugadas principalmente con gluconatos antes de ser liberadas en el torrente sanguíneo. Eventualmente, pasan a través de circulación enterohepática (es decir, son segregadas en la bilis y re-absorbidas del intestino) para luego ser excretadas en la orina de forma conjugada.

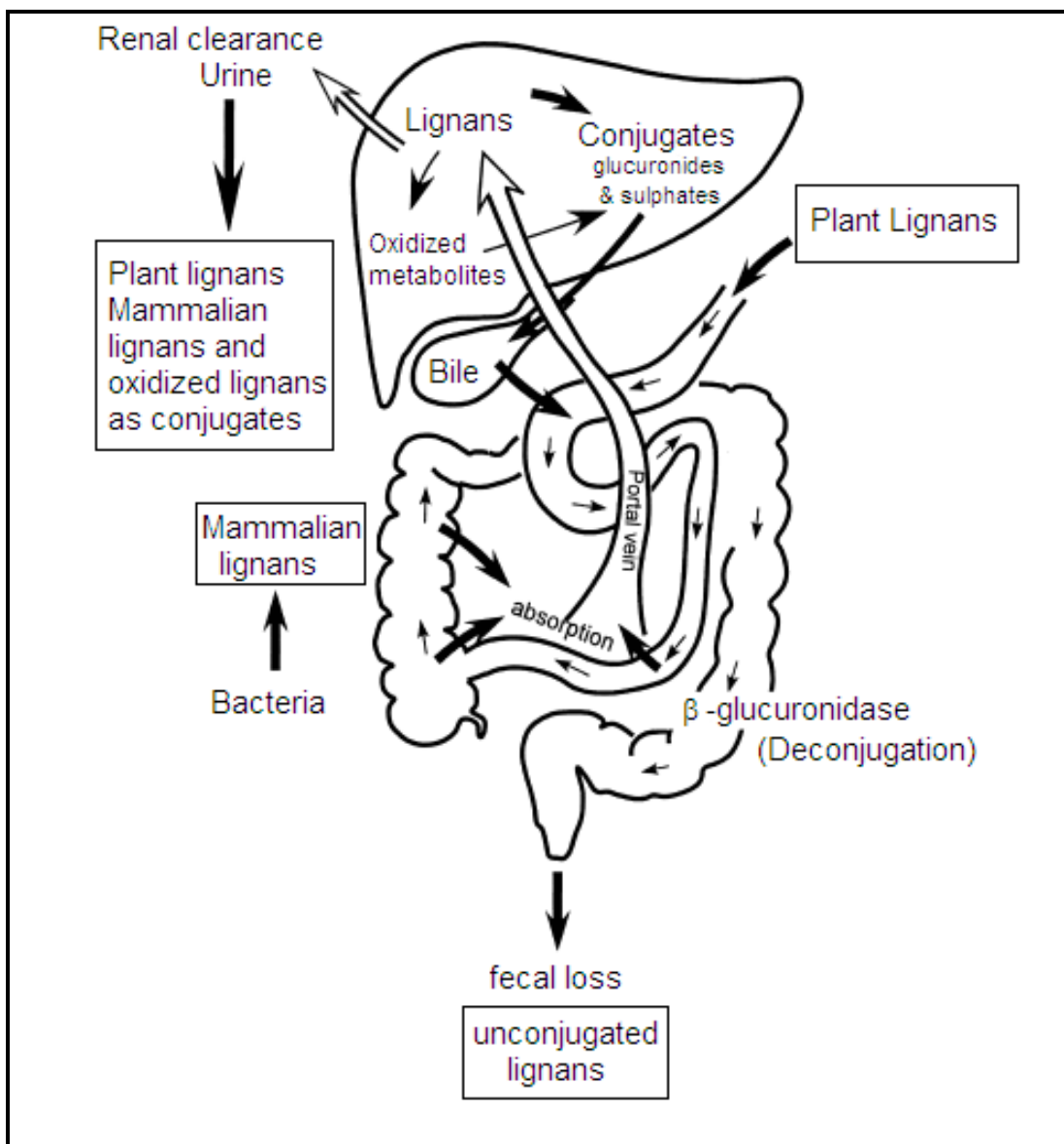


FIGURA 5 Circulación enterohepática de lignanos, sus metabolitos del colon e hígado. Los sitios de metabolismo, absorción y secreción son mostrados esquemáticamente.

FUENTE: SETCHELL *et al.* (1982)

La concentración de enterodiól y enterolactona en las heces, sangre y orina está relacionada con la concentración de lignanos vegetales en la dieta. El consumir linaza ó productos que contengan linaza incrementan los niveles de lignanos mamíferos en la

sangre y la excreción de lignanos mamíferos y/o lignanos totales en las heces y la orina. Al consumir una dieta fortalecida con lignano SDG derivado de la linaza, se incrementa la excreción de lignanos mamíferos, lo cual puede ser asegurada a través de la trituración y molienda de la linaza (MEAGHER *et al.*, 1999; METZLER, 2003; MORRIS, 2003; ZIMMERMAN *et al.*, 2006).

2.1.3.5.3 Efectos biológicos de los lignanos. Los lignanos de la linaza y los lignanos mamíferos (enterodiol y enterolactona) son biológicamente activos. Los lignanos tienen efectos anticancerígenos y antivirales, influyen en la expresión de los genes (activación), y pueden proteger contra enfermedades vinculadas con los estrógenos, como la osteoporosis (MORRIS, 2003). Las dietas ricas en lignanos, pueden ayudar a mantener una buena función cognoscitiva en las mujeres postmenopáusicas; reducir el riesgo de fibroides en el útero en mujeres de mediana edad; reducir el riesgo de cáncer en las mujeres; y reducir el riesgo de eventos coronarios agudo-fatales y el cáncer de próstata en los hombres (ATKINSON *et al.*, 2006; CLAVEL *et al.*, 2005; FRANCO *et al.*, 2005; HEDELIN *et al.*, 2006; TOUILLAUD *et al.*, 2007).

Además, otro beneficio para la salud aportado por los lignanos de la linaza reside en su capacidad antioxidante como secuestradores de radicales hidroxilos, y como compuestos estrogénicos y anti-estrogénicos por su similitud estructural con el 17- β -estradiol. La actividad antioxidante del lignano de la linaza (SDG) está relacionada con la supresión de las condiciones oxidantes de las especies reactivas de oxígeno. El secoisolariciresinol diglicósido y su agliconas secoisolariciresinol (SECO) muestran una muy alta capacidad antioxidante y efectos protectores del daño al ADN y a los liposomas especialmente en las células epiteliales del colon expuestas a estos compuestos, durante el metabolismo de las bacterias del colon que los transforman en lignanos de mamíferos (HU *et al.*, 2007; RAJESHA *et al.*, 2006; RUBILAR *et al.*, 2010). Otra característica de los lignanos mamíferos es que inhibe la actividad de la aromatasa, enzima involucrada en la producción de estrógenos. Una actividad decreciente de aromatasa es una forma bajo la cual los lignanos protegen contra el cáncer de mama (MORRIS, 2003)

2.1.3.5.4 Contenido de lignanos en linaza comparado con otros alimentos. Los lignanos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal encontrándose en la mayoría de los granos sin refinar tales como cebada y avena; leguminosas como la soya; en vegetales como brócoli, zanahoria, y espinaca. Sin embargo, la linaza contiene altos niveles del precursor vegetal de lignanos secoisolariciresinol diglicósido (SDG) y provee de 75-800 veces más lignanos vegetales que otras fuentes encontradas en dietas vegetales como lo indica el Cuadro 3 (THOMPSON *et al.*, 2006).

El secoisolariciresinol diglicósido (SDG) es el más abundante de la dieta y fluctúa entre 11,7 y 24,1 mg/g en harina desgrasada y 6,1 y 13,3 mg/g en semilla seca. Este rango tan amplio de contenido de SDG se debe a las diferencias en los cultivos de la linaza, las regiones de producción y el método de análisis empleado (MORRIS, 2003).

CUADRO 3 Contenido de lignanos en varios alimentos

Grupo Alimenticio	Alimento	Lignanos totales (mg/g)
Semilla y nueces	Semilla de linaza	3790.0
	Semilla de sésamo	80.0
	Semillas de girasol	2.1
	Castañas	1.9
Cereales y granos	Pan de centeno	47.9
Verduras	Ajo	5.8
	Aceite de oliva	1.4
Frutas secas	Pasas secas	1.8

FUENTE: Adaptado de THOMPSON *et al.* (2006)

2.2 Probióticos

En los últimos años ha surgido un interés en el uso de microorganismos en alimentos, debido a su aporte en el aroma y sabor, pero principalmente por sus beneficios en la restauración de la salud y tratamiento de enfermedades.

Bajo condiciones naturales, se desarrolla una microflora protectora en el intestino y no es necesario un suplemento bacteriano, pero los cambios en los hábitos alimentarios y el estilo de vida han hecho que se consuman alimentos procesados y estériles, sustancias antibacterianas que afectan el acceso y la colonización de ciertos tipos de bacterias (ANURADHA y RAJESHWARI, 2005).

Según la FAO/OMS (2006) los probióticos son “microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios de salud sobre el hospedero o receptor”. Del mismo modo, SANZ *et al.* (2003) los define como productos que contienen microorganismos definidos y viables en concentración suficiente para modificar la microflora del huésped, ejerciendo así un efecto beneficioso sobre la salud de éste.

En el Cuadro 4 se clasifican tres grupos de microorganismos usados como probióticos.

CUADRO 4 Microorganismos usados como probióticos.

Lactobacilli	Bifidobacteria	Otros LAB
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bif. Animalis</i>	<i>Ec. faecium</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Bif. breve</i>	<i>Ec. faecalis</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Bif. infantis</i>	<i>Lc. Lactis</i>
<i>Lb. reuterii</i>	<i>Bif. longum</i>	
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Bif. adolescentis</i>	
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Bif. lactis</i>	
<i>Lb. paracasei</i>	<i>Bif. Bifidum</i>	
<i>Lb. fermentum</i>		
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. crispatus</i>		
<i>Lb. Gasseri</i>		

FUENTE: SALMINEM y OUWEHAND (2002)

2.2.1 Historia de los probióticos. Existe una estrecha relación entre dieta y estado de salud. En los últimos años se ha observado un creciente interés por el papel de los probióticos en la salud humana. El término probiótico deriva del griego y significa “a favor de la vida”. La observación general de los beneficios otorgados por los probióticos fue descubierto por Eli Metchnikoff, científico ruso que obtuvo el premio Nobel y quién indicó que la “dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora del organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles” (CURRY y CROW, 2002).

2.2.2 Mecanismo de acción de los probióticos. Diversos autores (DUNNE *et al.*, 2001; GONZALEZ *et al.*, 2003; REID *et al.*, 2003; ROLFE, 2000; YOUNG and HUFFMANS, 2003) han descrito varios mecanismos de acción de los probióticos para mejorar la resistencia del huésped contra organismos patógenos, dentro de las cuales destacan:

- Producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. Estos compuestos reducen el número de células viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas. En la industria alimentaria las bacterias lácticas se utilizan como conservadores biológicos por la producción de bacteriocinas que ejercen acción antibacteriana y contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos.
- Disminuyen el pH intestinal lo cual favorece el crecimiento de organismos beneficiosos.
- Aumentan la resistencia a la colonización compitiendo con patógenos para unirse a los sitios de adhesión en la superficie del epitelio intestinal. Algunas cepas han sido escogidas por su habilidad de adherencia a las células epiteliales como *Lactobacillus spp.*
- Compiten por nutrientes. Las bacterias ácido lácticas pueden utilizar los nutrientes consumidos por organismos patógenos.
- Estimulan la respuesta inmune. Estudios recientes han señalado que la estimulación de la inmunidad innata y adquirida protegen contra la enfermedad

intestinal. Estos microorganismos pueden alertar al sistema inmune y favorecer el rechazo de agentes infecciosos estimulando de esta forma, la producción de inmunoglobulina A (IgA), activando macrófagos e incrementando el interferón-gamma (IFN-gamma) y citoquinas proinflamatorias.

2.2.3 Efectos beneficiosos para la salud. Los principales efectos benéficos asociados a los probióticos son el mejoramiento en la digestión de la lactosa; reducción de la inflamación intestinal y del estreñimiento; disminución de la diarrea después del tratamiento con antibióticos; estimulación del sistema inmune; mejora en la resistencia a las infecciones; reducción en la aparición de reacciones alérgicas; protección contra algunos tipos de cáncer y descenso tanto en los niveles de colesterol como en la incidencia de enfermedades cardíacas, entre otros (SALMINEN y OUWEHAND, 2002; OUWEHAND *et al.*, 2003).

CUADRO 5 Efectos beneficiosos sobre la salud documentados en ensayos clínicos en humanos de algunos microorganismos usados como probióticos.

Género	Especie	Beneficio
<i>Lactobacillus</i>	<i>Casei</i>	Acorta la diarrea causada por rotavirus. Reduce la recurrencia cáncer de vejiga.
	<i>Acidophilus</i>	Reduce diarrea asociada a antibióticos. Adhesión a las células intestinales humanas.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactis</i>	Prevención de la diarrea del viajero, tratamiento contra la diarrea viral incluyendo rotavirus.
	<i>Bifidum</i>	Reduce la duración de la diarrea y aumenta la respuesta inmunológica.
<i>Enterococcus</i>	<i>Faecium</i>	Tratamiento de diarrea aguda en adultos.

FUENTE: OUWEHAND *et al.* (2003)

2.2.4 Viabilidad de los probióticos. Para denominar que los probióticos ejercen beneficios sobre la salud, deben estar disponibles en una cantidad determinada. La ingestión en cifras de $\geq 10^6$ células por gramo es recomendable para un alimento probiótico como el yogurt (KURMAN y RASIC, 1991). SAMONA and ROBINSON (1991) señalan igualmente, que para conferir beneficios para la salud a los humanos, el recuento viable de bifidobacterias en el momento del consumo debe ser de 10^6 ufc/g. Una población viable de bifidobacterias de 5 ciclos log ufc/g en el producto final ha sido señalada como el mínimo terapéutico para obtener los beneficios mencionados (NAIDU *et al.*, 1999). Por ello es tan importante que los alimentos probióticos sean transportados y mantenidos en condiciones de refrigeración adecuadas de manera que la flora se mantenga viable y se consuman probióticos activos.

2.2.5 Selección de probióticos. Una bacteria para ser clasificada como probiótico debe cumplir ciertos requisitos como no presentar patogeneidad ni toxicidad. Preferentemente debe ser habitante normal del intestino, lo cual le asegura una resistencia a las condiciones del medio, como por ejemplo, tener capacidad de resistir los ácidos gástricos y la bilis, además, propiedad de adherirse al epitelio intestinal, lo que se asocia a su persistencia en el ambiente intestinal; lo ideal es que sean capaces de colonizar y establecerse en el tracto digestivo, capaces de crecer rápidamente y poder dominar por exclusión competitiva a otros microorganismos en el tracto intestinal. Por otra parte deben mantener viabilidad durante el almacenamiento y uso, tener la capacidad para sobrevivir y metabolizar en el intestino y finalmente desarrollar efectos beneficiosos sobre el huésped (ANURADHA y RAJESHWARI, 2005; NAIDU *et al.*, 1999).

LIONG and SHAH (2005), encontraron que cepas de *Lactobacillus (acidophilus y casei)* tienen buena tolerancia a los ácidos y bilis, y una alta remoción de colesterol a través de varios mecanismos.

2.2.6 Características del grupo *Lactobacillus acidophilus*. La especie *Lactobacillus acidophilus* es una de las más conocidas y estudiadas del género *Lactobacillus*. Es una bacteria comensal que habita normalmente en el ser humano, a lo largo del tracto digestivo y en la vagina, sin causar enfermedad. Es un microaerófilo

homofermentativo pues produce exclusivamente ácido láctico y peróxido de hidrógeno. Además, son gram positivos, se presentan como varillas con extremos redondeados no esporulados, generalmente de 0,6-0,9 x 1,5-6 μm que se producen individualmente en parejas y en cadenas cortas. Sus requerimientos nutricionales incluyen pantotenato de calcio, ácido fólico, niacina y riboflavina. (GOPAL, 2002)

Según LEE *et al.* (1999) la temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos están dentro del rango 35-37°C y el medio de cultivo óptimo es agar M.R.S o De Man, Rogosa y Sharpe.

En términos generales, es un microorganismo benéfico, ya que colabora con el cuerpo para conseguir más nutrientes de la comida que se ingiere, produce vitamina K, lactasa y sustancias antimicrobianas como acidolina, acidolfina, lactocidina y lactacina. Durante la digestión aumenta la biodisponibilidad de niacina, ácido fólico, vitamina B6 (piridoxina), B12, biotina, ácidos grasos y calcio. Puede ayudar en la desconjugación y separación de aminoácidos por los ácidos biliares que posteriormente pueden ser reciclados por el cuerpo (EBI, 2005).

2.2.7 Características del grupo *Lactobacillus casei*. Los miembros del grupo *Lactobacillus casei* son bastones inmóviles, no forman esporas, catalasa negativos, gram positivos y generalmente de 0,7 - 1,1 μm x 2,0 - 4,0 μm , además se encuentran solos, en pares o cadenas. Todas las especies en el grupo son heterofermentativos facultativos, que producen ácido láctico como el principal producto final de la fermentación y no producen gas de la glucosa. Bajo condiciones limitadas de glucosa, producen otros tres productos como: ácido acético, etanol y ácido fórmico. La temperatura óptima de crecimiento para *Lactobacillus casei* oscila entre 30 y 35°C y crecen de forma apropiada en agar MRS. Además produce vitaminas B₁, B₂, B₆, B₁₂.

Este grupo se puede clasificar, según su taxonomía, en las especies: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus paracasei subsp. tolerans* y *Lactobacillus rhamnosus* (CURRY y CROW, 2002). Genéticamente son similares, la diferencia radica en las temperaturas óptimas de crecimiento y habilidad para fermentar distintos tipos de carbohidratos, como se observa en el Cuadro 6.

CUADRO 6 Taxonomía de *Lactobacillus casei*

Forma taxonómica	Actual taxonomía	Propiedades metabólicas	
		Temperatura de crecimiento	Fermentación de azúcares
<i>L. casei</i> subsp. <i>Casei</i>	<i>L. casei</i>	10 - 40°C	Ribosa-sacarosa-D-tiranos
<i>L. casei</i> subsp. <i>Paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i>	10 - 40°C	Gran diversidad de metabolización de azúcares
<i>L. casei</i> subsp. <i>Tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>Tolerans</i>	10 - 37°C resistente a 72°C, 40 min	Muy poca metabolización de azúcares
<i>L. casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	15 - 45°C	Ramnosa

FUENTE: DANONE WORLD NEWSLETTER (1995)

2.3 Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que actúan beneficiosamente sobre los microorganismos de la flora intestinal, lo que genera una estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una a varias bacterias en el colon (TANAKA y SAKO, 2002).

Diversos autores definen los prebióticos como componentes dietéticos tales como carbohidratos específicos que pueden ser utilizados selectivamente como nutrientes por las especies probióticas y con ello aumentar su número, previniendo de esta manera la colonización del intestino por probables patógenos (GIBSON and FULLER, 2000; SCHREZENMEIER and DE VRESE, 2001).

El prerrequisito de un agente prebiótico es que no debe ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal y debe ser un sustrato selectivo para un número limitado de bacterias beneficiosas, que altere el balance de la microflora intestinal en favor de una composición más saludable. Si bien los carbohidratos, proteínas y lípidos que son digeribles y no absorbible en el intestino delgado podrían ser candidatos a los prebióticos, sólo los hidratos de carbono no digeribles de unidades de monosacáridos diferentes, con más longitud de cadena corta hasta ahora han sido reconocidos y establecidos como agentes prebióticos (TANAKA y SAKO, 2002).

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 sustratos particulares, 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 (ROSADO y ONDARZA, 2003).

Es por esta razón que la incorporación de prebióticos específicos como carbohidratos dietéticos, logra estimular el crecimiento de ciertos microorganismos beneficiosos en el huésped (ROWLAND and TANAKA, 1993).

2.3.1 Simbiosis. La combinación de prebióticos con probióticos se ha definido como simbiótico, lo cual beneficia al huésped mediante el aumento de la sobrevivencia e implantación de los microorganismos vivos de los suplementos dietéticos en el sistema gastrointestinal. Sin embargo, se ha descrito un efecto sinérgico entre ambos, es decir, los prebióticos pueden estimular el crecimiento de cepas específicas y por tanto, contribuir a la instalación de una microflora bacteriana específica con efectos beneficiosos para la salud. Un ejemplo de sinergismo lo constituye la relación de la cantidad de fibra dietética en la dieta con la microflora intestinal. Una dieta pobre en fibra puede producir cambios en la ecología de la microflora intestinal y una disminución en la población de *Lactobacillus* con un aumento de bacteroides (ROBERFROID, 2000).

2.4 Aminoácidos libres.

Los aminoácidos constituyen el alfabeto de la estructura proteica y determinan muchas propiedades importantes de las proteínas. Todos ellos son α -aminoácidos y constan de un grupo amino, un grupo carboxilo, un hidrógeno y un grupo distintivo llamado R unidos a un mismo carbono denominado carbono- α . El carbono- α recibe este nombre por ser el carbono adyacente al carbono del grupo carboxilo, y el grupo diferenciador de los distintos aminoácidos (R) se denomina *cadena lateral* (GARRIDO y TEIJON, 2006).

La semilla de linaza es rica en proteínas, y está demostrado en estudios que la composición aminoacídica encontrada en la proteína de la linaza es similar a la de la soja, considerada como una de las más nutritivas entre las proteínas de origen vegetal. Además posee una cantidad importante de aminoácidos esenciales, que el cuerpo no puede sintetizar, y es por ello que deben obtenerse de la dieta (MORRIS, 2003).

GARRIDO y TEIJON (2006) señalan que los aminoácidos se pueden clasificar según la polaridad del grupo R, como se describe a continuación:

- **Aminoácidos alifáticos.** Corresponden a grupos con cadena lateral apolar o hidrofóbicas. Dentro de este grupo se encuentran las cadenas laterales voluminosas, como ocurre con alanina, valina, leucina e isoleucina. La glicina, debido a su pequeño tamaño, genera un mínimo impedimento estérico permitiendo con ello una alta flexibilidad estructural. La prolina, a diferencia del resto de los aminoácidos posee un grupo amino secundario, formando un anillo. Este anillo le da rigidez a la molécula, por lo que suele intercalarse entre aminoácidos hidrofóbicos de manera de impedir la formación de estructuras secundarias, reduciendo así la flexibilidad del extremo polipeptídico.
- **Aminoácidos aromáticos.** Estos grupos aromáticos conforman la cadena lateral fenilalanina (benceno) y tirosina (fenol), los que son relativamente apolares. Estos aminoácidos pueden participar en interacciones hidrofóbicas, especialmente fuertes.

- **Aminoácidos azufrados.** Existen dos aminoácidos cuyas cadenas laterales poseen átomos de azufre, son la cisteína, que posee un grupo sulfhidrilo, y la metionina, que posee un enlace tioéster.
- **Aminoácidos hidrofílicos**

Este grupo se puede subdividir en aminoácidos ácidos, hidroxilados y básicos.

- **Aminoácidos ácidos.** Estos aminoácidos son altamente polares, poseen un segundo grupo carboxilo que se encuentra completamente ionizado y por tanto están cargados negativamente a pH fisiológico. Dentro de este grupo se encuentra el ácido aspártico y el ácido glutámico.
- **Aminoácidos básicos.** Estos aminoácidos contienen cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico y todos poseen seis átomos de carbono. Dentro de este grupo se encuentra la lisina, la arginina y la histidina. Se ha descrito que la linaza tiene altas cantidades de arginina (HALL *et al* 2006).
- **Aminoácidos hidroxilados.** Este grupo incluye el grupo hidroxilo dentro de su cadena lateral. Forman puentes de hidrógeno y también utilizan la atracción electrostática para su plegamiento. Dentro de los aminoácidos hidroxilados se destacan la serina y treonina.

2.5 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada debido a su sensibilidad, selectividad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y, sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la Industria.

Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas (SKOOG, 2001).

La técnica se basa en la habilidad de una columna cromatográfica, empacada con una fase estacionaria, para separar los componentes de una mezcla, la cual es disuelta en una fase móvil o eluyente, y pasada a través de la columna.

Un adecuado sistema de detección continuo localiza los analitos presentes en el eluyente midiendo sus propiedades físicas o químicas. Un gráfico de la respuesta del detector en función del tiempo, o volumen del eluyente, muestra una serie de picos llamados cromatograma (PUENTES, 2004).

La elusión de los componentes de una muestra puede realizarse de dos maneras: isocráticamente, es decir; una separación que utiliza un solo disolvente de composición constante, o bien, usando una elusión en gradiente que utiliza dos o más disolventes con polaridad significativamente distinta, variando la relación de los disolventes en forma programada durante el tiempo de elusión (SKOOG, 2001).

Con respecto a los compuestos fenólicos, BANKOVA *et al.*, (1992) señala que una de las características químicas de los grupos OH de estos compuestos es la capacidad que tienen en formar enlaces por puentes de hidrógeno. Este hecho dificulta el análisis de estos compuestos mediante cromatografía de gases porque disminuye su volatilidad. Es por ello que en los últimos 20 años la técnica analítica que ha predominado al momento de llevar a cabo la separación y caracterización de los compuestos fenólicos ha sido la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con columna de fase reversa. Muchos de los compuestos fenólicos, como las formas agliconas (hidrofóbicas) o las formas glicosiladas (hidrofílicas) de los flavonoides, tienen un elevado peso molecular además de otras características, que hacen que dentro del mundo de las técnicas separativas, el HPLC sea la que aporta mejores resultados en los análisis. Es una técnica que permite realizar separaciones en las que se separan simultáneamente todos los compuestos analizados, además de sus posibles derivados o productos de degradación. Incluso es capaz de dar lugar a la determinación de cantidades muy bajas de analito en presencia de interferentes u otros compuestos que coeluyen.

Entre las ventajas que convierten al HPLC en la técnica más importante para el análisis de compuestos fenólicos en muestras sobre todo vegetales, se encuentran la amplia variedad de columnas disponibles en el mercado y la posibilidad de combinar

dos o más columnas en el mismo análisis. Este método permite el acoplamiento de numerosos sistemas de detección. La detección de compuestos fenólicos mediante HPLC se ha realizado principalmente empleando UV-Vis, arreglo de diodos, espectrometría de masas y por resonancia magnética nuclear (ROBBINS, 2003).

3 MATERIAL Y METODO

3.1 Lugar de trabajo

La investigación se llevó a cabo en las dependencias de la Universidad Austral de Chile, específicamente en los laboratorios de microbiología y análisis instrumental del Instituto de Ciencias y Tecnología de los alimentos (ICYTAL) de la Facultad de Ciencias Agrarias. Los recursos para la realización de esta investigación se obtuvieron del proyecto Fondecyt 1080277.

3.2 Materiales y equipos

3.2.1 Materia prima: La materia prima utilizada fue linaza entera y linaza desgrasada de la variedad Celestina del año 2008. El procedimiento de desgrase de la harina de linaza fue realizado mediante un equipo soxhlet durante un tiempo de dos horas con hexano y posterior secado en una estufa a 36°C. La harina de linaza entera, en cambio, fue triturada con un molino de cuchillos marca Moulinex a partir de la semilla entera. Una vez que se obtuvieron ambos tipos de linaza se procedió a tamizarlas en un tamiz con un tamaño de partícula de 600 µm, de especificaciones A.S.T.M E-11.

3.2.2 Microorganismos: Se utilizaron dos especies de microorganismos probióticos para el estudio, estos fueron: *Lactobacillus casei* incubado en aerobiosis a 32°C±1°C y *Lactobacillus acidophilus* incubado en campanas de anaerobiosis a 38°C±1°C.

3.2.3 Activación de los microorganismos: Para activar los probióticos en estudio fue necesario nutrirlas con caldo MRS e incubarlos por una hora a una temperatura de 38°C±1°C.

3.3 Metodología

A continuación se presenta la metodología empleada para el cultivo de los microorganismos en estudio y el procedimiento de los análisis químicos realizados a las muestras de linaza con probióticos posterior fermentación, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

3.3.1 Preparación de las muestras. A un tubo de tapa rosca con 10 ml de caldo MRS esterilizado a 121°C se le agregó 0,1 g de bacteria probiótica liofilizada, se incubó por 1 hora a sus respectivas temperaturas óptimas de crecimiento, posteriormente a partir del cultivo madre se realizó una inoculación donde se tomó 0,1 ml de este cultivo y se agregó a los tubos que contienen el medio de cultivo (5 mg de linaza más 10 ml de agua destilada) como lo indica la Figura 6.

Luego se incubaron los probióticos *Lactobacillus casei* en aerobiosis a 32°C±1°C y *Lactobacillus acidophilus* en campanas de anaerobiosis a 38°C±1°C.

Las muestras son analizadas durante un período de tiempo, representadas en horas (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 168, 216, 288). Una vez que se alcanza el tiempo estimado, la muestra debe ser centrifugada a 12000 rpm durante 5 minutos para eliminar bacterias y restos de harinas de linaza, se desecha el pellet y se guarda el sobrenadante a -20°C hasta ser analizadas por cromatografía de alta eficiencia (HPLC).

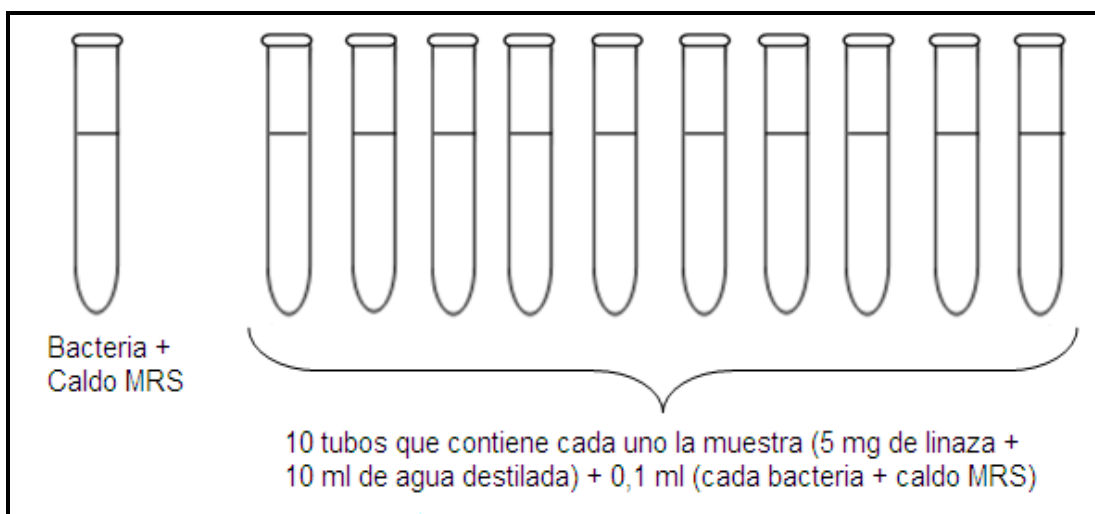


FIGURA 6 Esquema de preparación de muestras.

FUENTE: Elaboración propia.

3.3.2 Cultivo de microorganismos. Este método se muestra esquemáticamente en la Figura 7.

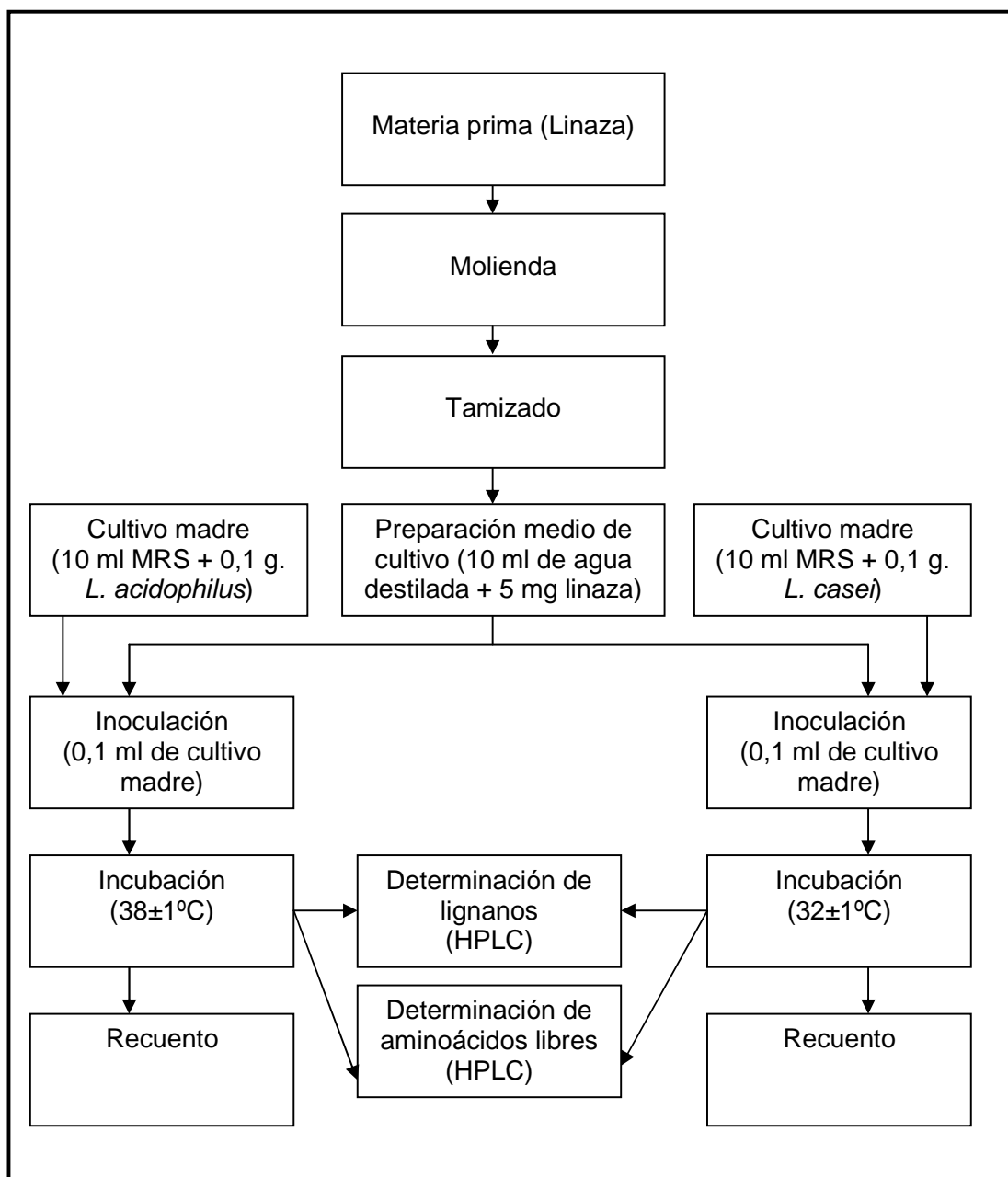


FIGURA 7 Procedimiento experimental del cultivo de microorganismos.

FUENTE: Adaptado de BAEZA (2008)

3.3.3 Diluciones seriadas e inculo de probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* en placas petri para recuento. Se realizaron diluciones seriadas con el objetivo de obtener recuentos cuantificables. La cantidad de diluciones a realizar fueron las necesarias para cuantificar el crecimiento de los microorganismos como se ejemplifica en la Figura 8. Todos los análisis fueron realizados en duplicado.

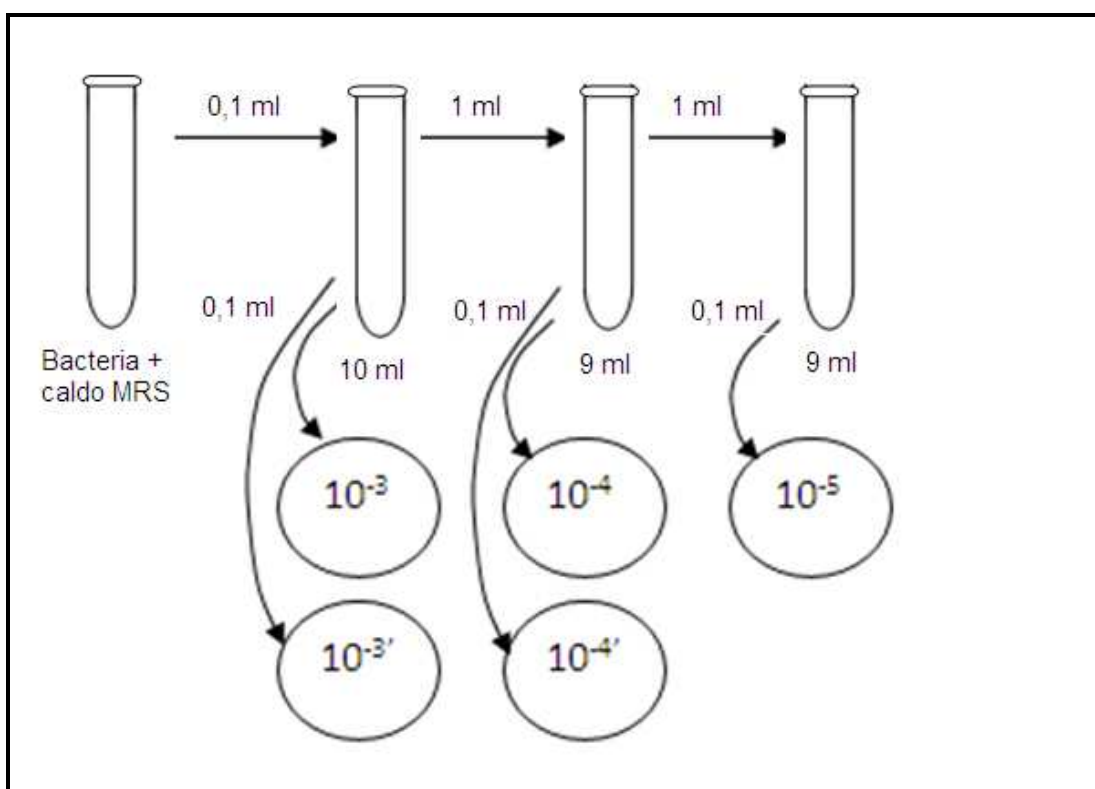


FIGURA 8 Diluciones y siembra de microorganismos probióticos.

FUENTE: Elaboración propia

3.3.4 Análisis químico realizado a las muestras.

A continuación se describe la metodología utilizada para el análisis de las muestras.

3.3.4.1 Determinación de lignanos. Esta metodología se basa en el método descrito por CHEN (2007), el cual fue modificado en el transcurso del estudio para la detección simultánea de los lignanos secoisolariciresinol diglicósido (SDG), secoisolariciresinol (SECO), enterodiol (ED) y enterolactona (EL).

La metodología consiste en pasar la muestra a través de una columna de separación de fase sólida rp-18 (SPE) con la finalidad de limpiar la muestra y eliminar sustancias no deseadas que puedan interferir en el análisis posterior (proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, etc.). Para poder llevar a cabo la separación se procede a lavar la columna con volúmenes (1,5 ml) de agua y metanol a lo menos tres veces. Cuando el último volumen de metanol ha pasado, se agrega 1 ml de muestra, se deja pasar hasta el comienzo de la resina, luego se agregan 500 μ l de metanol, se deja pasar hasta el comienzo de la resina, se cambia el tubo de desechos por el tubo de recolección del eluato. Se agregan 1,5 ml de metanol, para eluir y recolectar los lignanos en solución.

Posteriormente la muestra es llevada a cromatografía de alta eficiencia (HPLC), donde es introducida en una columna cromatográfica que contiene la fase estacionaria, a través del sistema de inyección.

Los parámetros instrumentales y experimentales para la determinación de los lignanos mediante HPLC se ilustran en el Cuadro 7.

CUADRO 7 Parámetros instrumentales y experimentales para la determinación de lignanos por HPLC.

Fase móvil A	1% ácido acético acuoso: acetonitrilo (85:15)
Fase móvil B	Acetonitrilo
Flujo	1ml/min
Columna	Luna RP C8 (4,6 mm x 250 mm), 5 µm, Phenomenex
Detector	HPLC UV-visible modelo L-4250 (Merck - Hitachi)
Bomba	HPLC modelo L-6200 (Merck - Hitachi)
Integrador	Clarity, Data Apex
Longitud de onda	280 nm
Temperatura	Ambiente
Modo	En gradiente
Volumen de inyección	20 µl
Tiempo corrida HPLC	40 min

En el Cuadro 8 se puede observar el gradiente utilizado para poder detectar los lignanos simultáneamente.

CUADRO 8 Gradiente utilizado para la determinación de lignanos

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0	1	85	15
11	1	65	35
15	1	50	50
25	1	50	50
25,1	1	85	15

3.3.4.2 Determinación de aminoácidos libres. Este análisis se determinó a través del método PITC descrito por WHITE *et al.* (1986)

La preparación de la muestra consiste en tomar 100 µl de muestra y homogeneizarlo con 10 µl TCA al 10%. Agitarlo y centrifugarlo a 12000 rpm durante 5 minutos. Retirar el sobrenadante y congelarlo a -18°C.

El procedimiento es el siguiente:

- En distintos tubos colocar 20 µl de cada muestra. Cada tubo debe ser secado a través de una bomba de vacío aproximadamente 30 minutos.
- Agregar 20 µl de solución de resecado (A), la cual contiene una mezcla de etanol, agua, trietilamina; en una relación 2:2:1, a cada tubo y secar durante 30 minutos.
- Agregar 20 µl de solución de derivatización (B) a cada tubo. Este reactivo consiste en una solución de etanol, trietilamina, agua, fenilisotiocianato (PITC); en una relación 7:1:1:1. Permitir que estén 20 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Luego liofilizar durante 45 minutos.
- Congelar las muestras a -18°C, si no son inyectadas inmediatamente al HPLC.
- Descongelar las muestras al momento de inyectar al HPLC, diluirlas con 200 µl de la fase móvil (60 ml acetonitrilo, 400 ml agua calidad milli Q) y agitar en vortex.

- Inyectar las muestras al HPLC.

Los parámetros instrumentales y experimentales para la determinación de aminoácidos libres por HPLC se ilustran en el Cuadro 9.

CUADRO 9 Parámetros instrumentales y experimentales para la determinación de aminoácidos libres por HPLC.

Fase móvil A	Acetato sodio trihidrato: trietilamina: acetonitrilo
Fase móvil B	Acetonitrilo
Flujo	1ml/min
Columna	C18
Detector	HPLC UV-visible modelo L-4250 (Merck - Hitachi)
Bomba	HPLC modelo L-6200 (Merck - Hitachi)
Integrador	Clarity, Data Apex
Longitud de onda	254 nm
Temperatura	Ambiente
Modo	En gradiente
Volumen de inyección	20 µl
Tiempo corrida HPLC	40 min

En el Cuadro 10 se puede observar el gradiente utilizado para poder detectar aminoácidos libres.

CUADRO 10 Gradiente utilizado para la determinación de aminoácidos libres.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
Inicial	1	100	0
10	1	54	46
10,5	1	0	100
11,5	1	0	100
12	1.5	0	100
12,5	1.5	100	0
20	1.5	100	0
20,5	1	100	0

3.3.5 Diseño experimental. El diseño experimental consta de dos factores “microorganismos” y “medios”. Con 2 niveles para microorganismos (*L. casei* y *L. acidophilus*), y 2 niveles para medios (harina de linaza entera y desgrasada).

El tiempo es una covariable la cual presenta 10 niveles (días, 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 168, 216, 288).

Del diseño experimental resultaron 4 combinaciones, las cuales se realizaron en duplicado, obteniendo finalmente 8 ensayos (Figura 9), evaluados en los 10 niveles de la covariable. Las variables de respuesta fueron los lignanos y los aminoácidos libres.

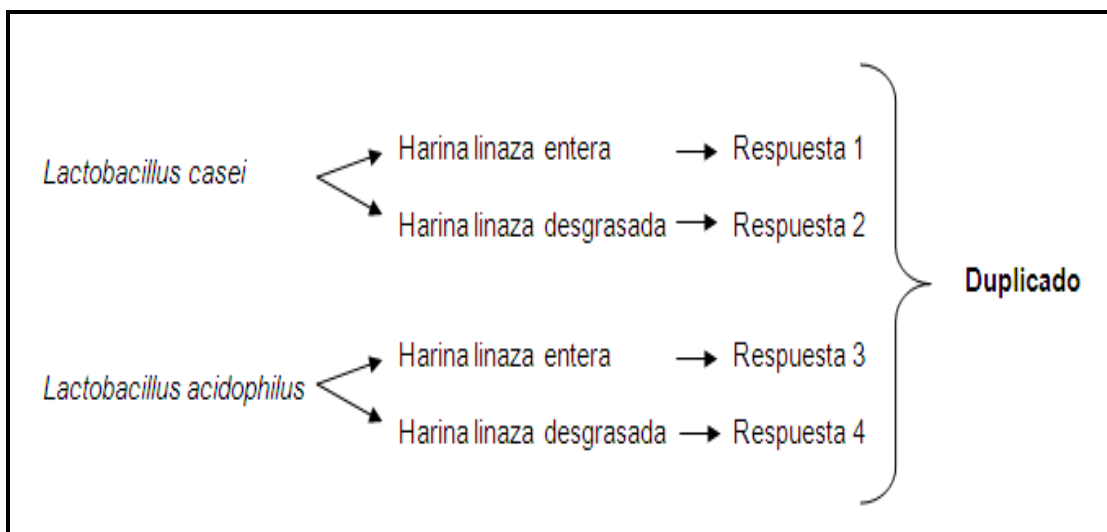


FIGURA 9. Diseño experimental

Para el análisis de los datos se utilizó el programa SigmaPlot.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

El objetivo principal de este estudio fue determinar si las bacterias lácticas *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* incubados en un ambiente aeróbico y anaeróbico respectivamente durante 12 días, son capaces de fermentar la harina de linaza (entera y desgrasada) y generar lignanos vegetales como secoisolariciresinol diglicósido (SDG) y los lignanos mamíferos con actividad biológica (enterodiol y enterolactona), con la finalidad de determinar la factibilidad de incluir linaza en alimentos lácticos y ayudar o mejorar la bioaccesibilidad de los lignanos en el sistema digestivo.

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos, no existen estudios similares que describan el efecto que ejercen los microorganismos probióticos en la fermentación de linaza, y si bien en la actualidad ha crecido la demanda por esta semilla en la industria alimentaria, por ser rica en fibra, ácidos grasos omega 3 y lignanos, la población, en general, desconoce la importancia de los lignanos sobre el organismo.

4.1 Cinética sobrevida de microorganismos. De acuerdo a los resultados obtenidos de la fermentación de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*, incubados aeróbicamente a 32°C y anaeróbicamente a 38°C respectivamente, en medios que contienen tanto harina entera como harina desgrasada, se pudo determinar que estos probióticos tienen una viabilidad de 9 días en ambos medios. Esto indica que la harina de linaza, tanto molida como desgrasada, no es el único sustrato que necesita este probiótico o no aportan la cantidad suficiente para mantenerse viable en el tiempo. Para aumentar el número de microorganismos benéficos además de carbono, fuentes de energía y sustratos fermentables que contiene la linaza tales como, fibra dietética, almidón resistente, se deben incluir aminoácidos, vitaminas y nucleótidos, los cuales pasan a través del tracto intestinal al colon de forma que las bacterias puedan utilizarlo (SCHREZENMEIR y DE VRESE, 2001).

En la Figura 10 se puede observar la cinética sobrevida de los microorganismos con el tiempo de incubación. Se puede apreciar una disminución del contenido de ambos microorganismos, incubados tanto aeróbica como anaeróbicamente, donde se observa que la viabilidad de los mismos llega hasta aproximadamente el noveno día, siendo el *Lactobacillus casei* incubado en harina desgrasada el que presenta la mayor sobrevida (12 días).

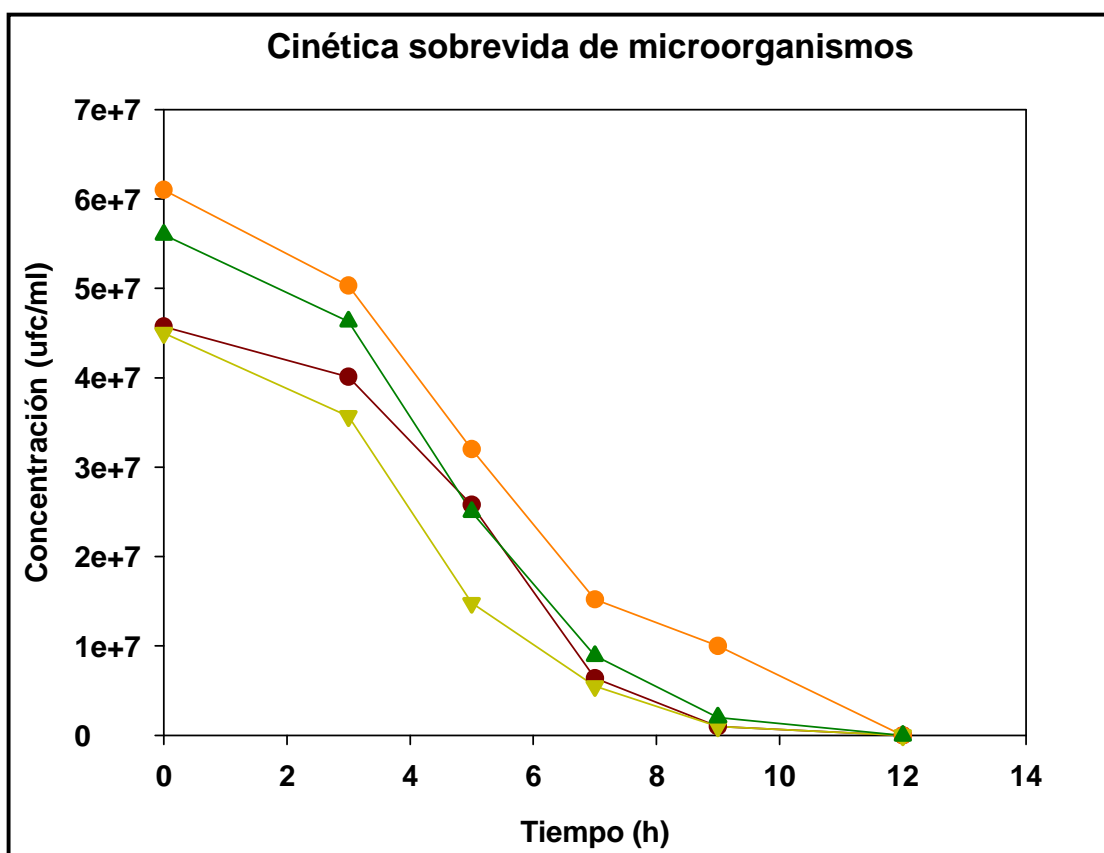


FIGURA 10 Cinética de microorganismos. ● *L. casei* - Harina entera; ● *L. casei* - Harina desgrasada; ▼ *L. acidophilus* - Harina entera; ▲ *L. acidophilus* - Harina desgrasada.

4.2 Determinación de lignanos

Para determinar la capacidad de las bacterias probióticas utilizadas (*Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*) para fermentar las diferentes harinas de linaza se utilizó una metodología de cromatografía líquida (HPLC) donde se detectaron los lignanos investigados secoisolariciresinol diglicósido (SDG), secoisolariciresinol (SECO), enterodiol (END), matairesinol (MATA) y finalmente enterolactona (ENL) como se muestra en la Figura 11.

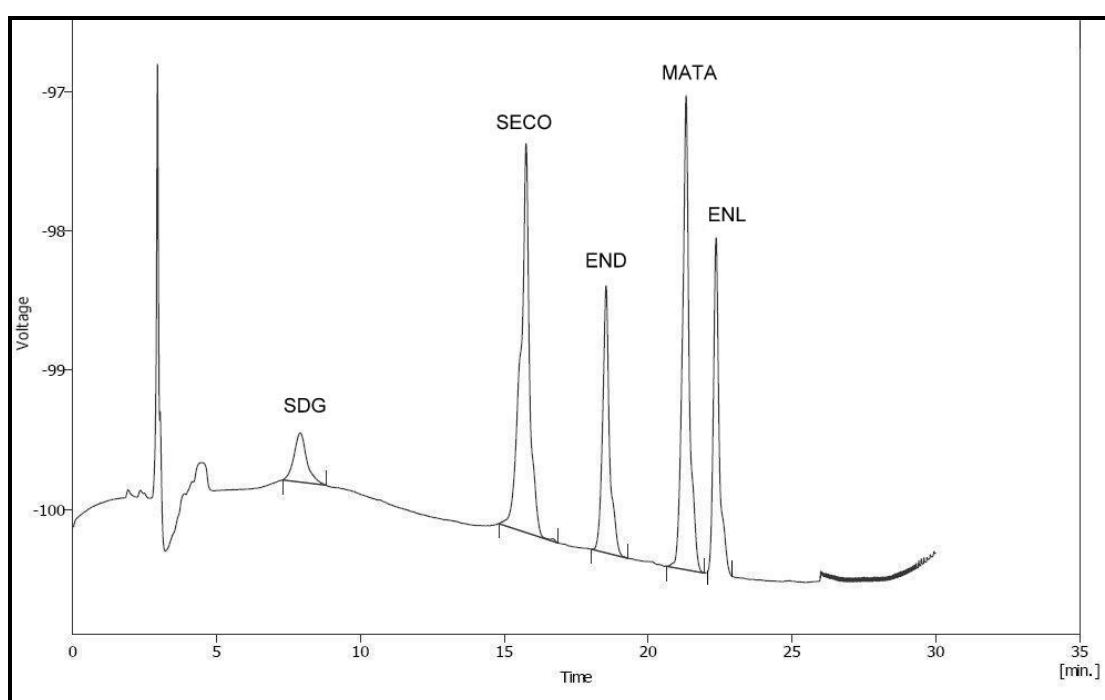


FIGURA 11 Cromatograma del conjunto de lignanos vegetales y mamíferos.

4.2.1 Determinación de los cambios de SDG, en la fermentación de harinas de linaza. En la Figura 12 se observa la presencia de SDG en las fermentaciones con los probióticos *L. casei* y *L. acidophilus*.

Durante las primeras horas de incubación hay un aumento de SDG en la fermentación de ambos microorganismos probióticos, debido a que estas bacterias metabolizan los

componentes que contienen las harinas (entera y desgrasada) para posteriormente generar los compuestos con actividad biológica.

A partir de las 24 horas el SDG permanece constante en el tiempo, esto probablemente se debe a que las bacterias se encuentran en la fase estacionaria, donde desarrollan un metabolismo diferente ya que se agota algún nutriente esencial del medio (PISABARRO, 2003).

Además, se puede observar que al incubar los probióticos con harina desgrasada la concentración de SDG aumenta considerablemente, esto es debido a que las bacterias al encontrarse en un medio libre de grasa consumen los polímeros complejos como los polisacáridos y proteínas. Este proceso comienza con la depolimerización de carbohidratos complejos y proteínas y dan lugar a compuestos mono y oligosacáridos. Como resultado de esta fermentación bacteriana se produce hidrógeno, dióxido de carbono, gas metano, y ácidos de cadena corta (AGCC), acetato, butirato y propionato. El butirato es el combustible ideal de las células epiteliales del colon, el cual alcanza un 70% de su energía a través de la oxidación de butirato y cumple un rol importante en la inflamación crónica de la mucosa intestinal y en la prevención de riesgo de cáncer de colon. El ácido láctico, etanol, ácido succínico y formiato son intermediarios importantes que también son degradados a ácidos grasos de cadena corta, CO₂ y H₂. Mientras que las proteínas se descomponen en péptidos y aminoácidos, y gracias a la fermentación también dan lugar a la formación de ácidos grasos de cadena corta, CO₂ y H₂ (BLAUT and CLAVEL, 2007).

Finalmente transcurridos los 12 días de incubación se puede observar un descenso de SDG, en este período, además se produjo una reducción del número de bacterias viables del cultivo. Se describe que en el caso de los *Lactobacillus* es relativamente clara la condición de producir y acumular ácidos, lo que provoca que las células viables se reduzcan exponencialmente (PISABARRO 2003).

La actividad biológica de la linaza depende de la presencia de ciertas bacterias en el intestino. De acuerdo con los resultados obtenidos, los microorganismos probióticos estudiados, son capaces de fermentar linaza y producir SDG como lo muestra la Figura 12.

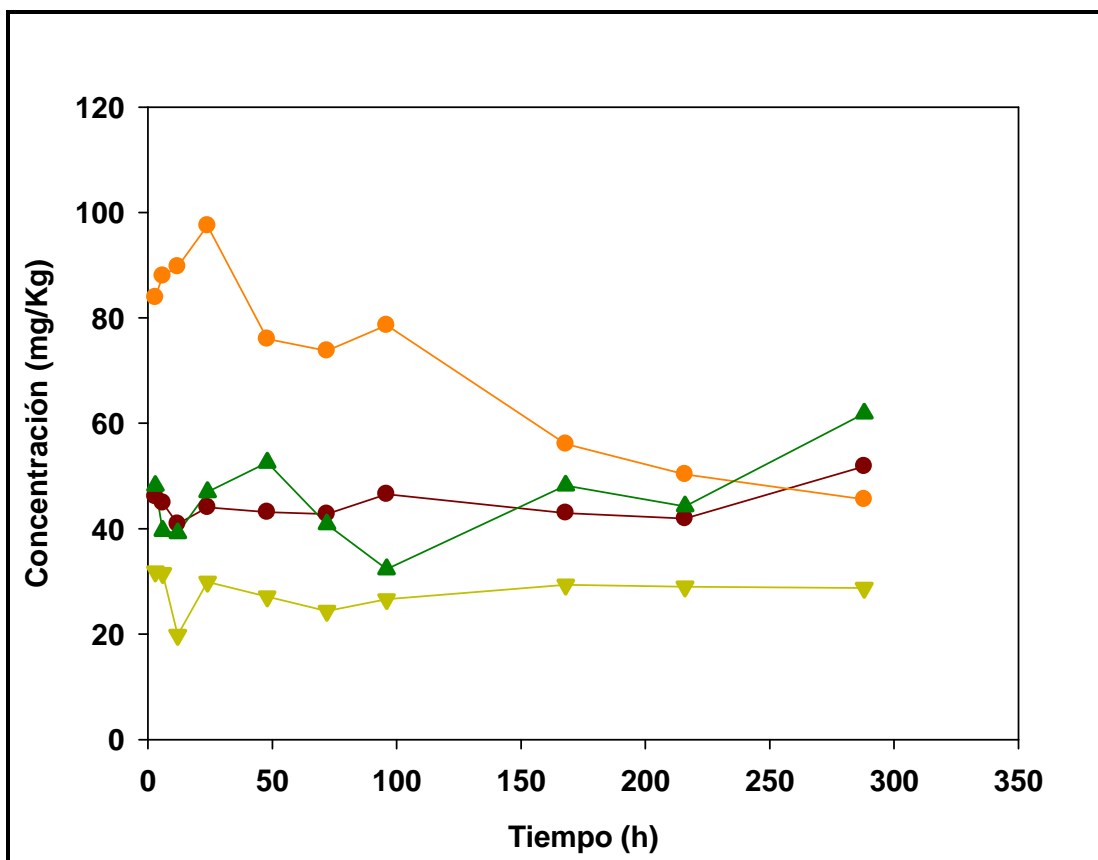


FIGURA 12 Producción de SDG en la fermentación de harina de linaza entera y desgrasada. ● *L. casei* - Harina entera; ● *L. casei* - Harina desgrasada; ▼ *L. acidophilus* - Harina entera; ▲ *L. acidophilus* - Harina desgrasada.

4.2.2 Determinación de los cambios de SECO, en la fermentación de harinas de linaza. Con respecto a la producción de SECO se puede observar en la Figura 13 que el probiótico *L. casei*, tanto en el medio con harina de linaza entera como desgrasada, generan SECO, situación que no ocurre con la bacteria *L. acidophilus*. Una de las razones que puede explicar este fenómeno es que el probiótico *Lactobacillus acidophilus* no es capaz de generar las enzimas necesarias para metabolizar el SDG y generar seco.

En la figura 13 se puede observar que durante las primeras horas de incubación hay un aumento en la concentración de secoisolariciresinol, generándose un máximo de este lignano en la harina de linaza entera y desgrasada de 0,5938 mg/kg y 0,8302 mg/kg respectivamente a las 6 horas de incubación, donde los microorganismos han adaptado su metabolismo a las condiciones del medio y consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima (PISABARRO, 2003). A partir de las 24 horas de incubación, el secoisolariciresinol permanece constante en el tiempo debido a que las bacterias se encuentran en una fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio (PISABARRO, 2003). En el caso de la fermentación con harina de linaza entera se aprecia un descenso progresivo a los 7 días, mientras que en el caso de la harina de linaza desgrasada el lignano vegetal permanece constante en el tiempo.

Se debe destacar que la producción de lignanos está directamente relacionada con la actividad de la microflora intestinal. Dentro de este marco, a partir del SDG el *L. casei*, microorganismo probiótico que se encuentra a nivel del colon, junto a las enzimas β -glucosidasas de los alimentos y al ácido clorhídrico hidrolizan los compuestos conjugados como SDG a la agliconas secoisolariciresinol (SECO), por lo cual el *L. casei* es un probiótico capaz de realizar la conversión de lignanos (CLAVEL *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2007).

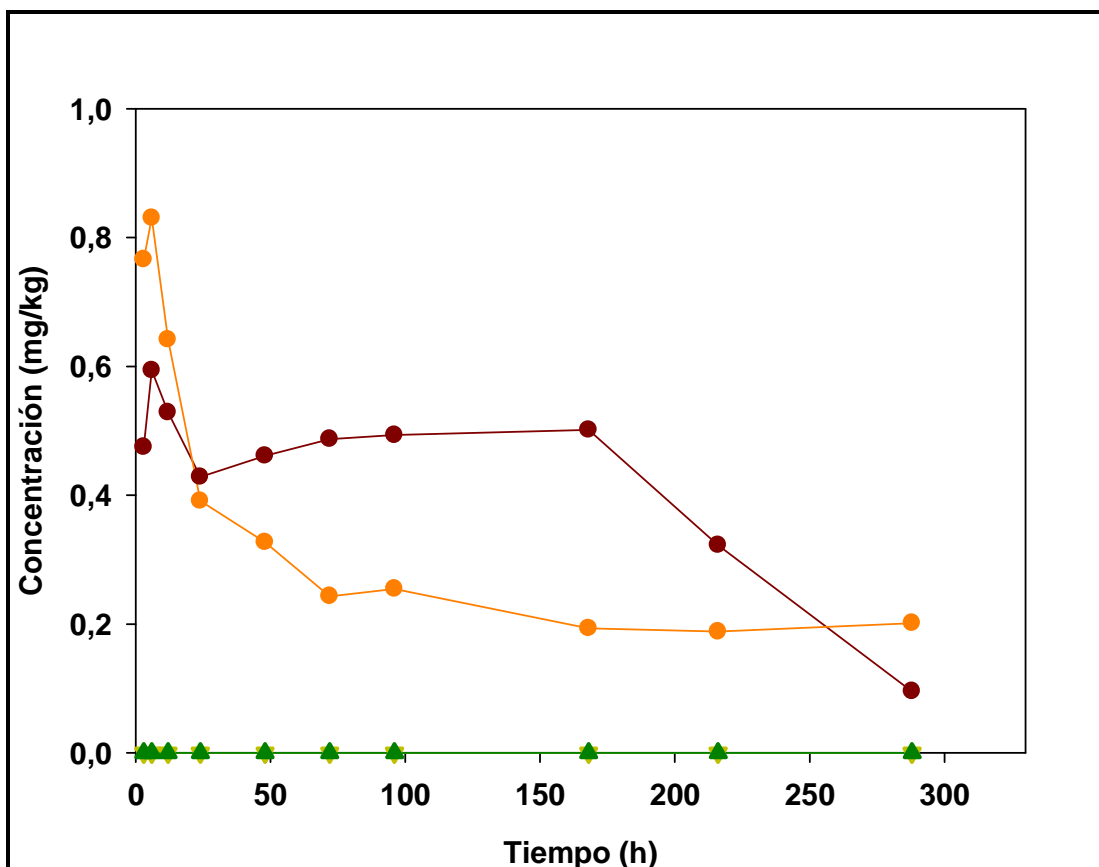


FIGURA 13 Producción de SECO en la fermentación de harina de linaza entera y desgrasada. ● *L. casei* - Harina entera; ● *L. casei* - Harina desgrasada; ▼ *L. acidophilus* - Harina entera; ▲ *L. acidophilus* - Harina desgrasada.

4.2.3 Determinación de los cambios de END en la fermentación harinas de linaza. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede señalar que el probiótico *L. casei* en los medios que contienen harina de linaza entera como desgrasada, después de hidrolizar los compuestos conjugados a su agliconas secoisolariciresinol (SECO) lo transforman en END como lo indica la Figura 14. Según lo que indica HU *et al.* (2007) esta transformación es realizada mediante una serie de reacciones de hidrólisis, dehidroxilación y reacciones de demetilación para generar este lignano (Figura 4).

Como se puede apreciar en la Figura 14, en la harina desgrasada hay mayor concentración de enterodiol, que en el caso de la harina entera, porque durante la fermentación, las bacterias consumen los carbohidratos y las proteínas que contiene la harina de linaza para su buen desarrollo, lo que da lugar al ácido láctico, alcohol y dióxido de carbono (BLAUT and CLAVEL, 2007).

Además, en la fermentación de *L. casei* con harina de linaza entera y desgrasada se observa un aumento de enterodiol en las primeras horas de incubación donde este probiótico consume los nutrientes a velocidad máxima. En el caso del medio que contiene harina desgrasada se aprecia una concentración de enterodiol constante en el tiempo, mientras que el medio con harina entera hay un aumento progresivo hasta las 96 horas.

Posterior a los 4 días de incubación se puede apreciar que la concentración de enterodiol en la harina desgrasada aumenta considerablemente mientras que en la harina entera se genera una disminución de este lignano.

Lo anterior indica que durante la fermentación del probiótico *L. casei* en los medios que contenían harina de linaza entera y desgrasada, hay producción de enterodiol, lo que puede ayudar o mejorar la bioaccesibilidad de estos compuestos en el sistema digestivo, logrando un buen funcionamiento del tracto gastrointestinal debido a que este lignano es fundamental por sus efectos antioxidantes y por ser inhibidor de varias enzimas del metabolismo de los esteroides tales como la aromatasa, lo que indica el rol principal que juega la linaza en la dieta, por ser la semilla que provee más lignanos vegetales que otras fuentes encontradas en dietas vegetales (ADLERCREUTZ *et al.*, 1993; WANG, 2002).

Además se puede apreciar que el probiótico *L. acidophilus* no produce enterodiol, porque no hay hidrólisis de los compuestos conjugados a secoisolariciresinol (SECO).

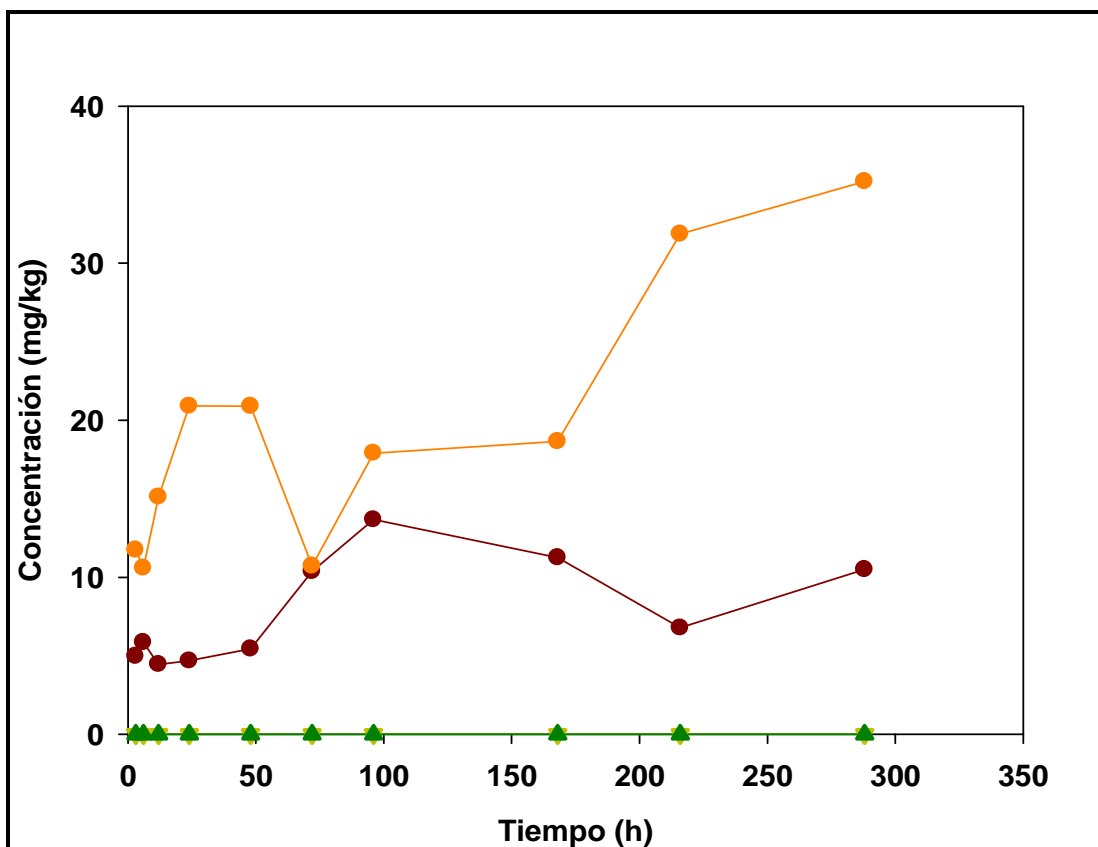


FIGURA 14 Producción de END en la fermentación de harina de linaza entera y desgrasada. ● *L. casei* - Harina entera; ● *L. casei* - Harina desgrasada; ▼ *L. acidophilus* - Harina entera; ▲ *L. acidophilus* - Harina desgrasada.

4.2.4 Determinación de los cambios de ENL en la fermentación de harinas de linaza. De acuerdo a los datos obtenidos se pudo determinar que los probióticos estudiados no generan enterolactona, esto se debe a que una vez producido el enterodiol (END), éste no es oxidado a enterolactona (HU *et al.*, 2007).

4.3 Bioaccesibilidad de los lignanos de la harina de linaza entera y desgrasada.

De acuerdo a la concentración de los lignanos vegetales y mamíferos en el día 12 de incubación, se determinó la bioaccesibilidad de éstos, con la finalidad de determinar qué porcentaje son liberados desde la matriz y por lo tanto, se encuentran libres.

Para ello, se utiliza la siguiente fórmula de bioaccesibilidad:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{\text{lignanos}_{\text{libres}}}{\text{lignanos}_{\text{totales}}} \times 100$$

Para el cálculo de los lignanos totales se determinó el SDG total, y en base a este valor se transformó el contenido de SDG en SECO y END.

En el cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos a partir de la fórmula señalada anteriormente, lo que indica que hay una liberación mínima de SDG en relación al total.

Además, se observa que el probiótico *L. casei* no presenta mayores diferencias de bioaccesibilidad al usar harina de linaza entera y desgrasada. Sin embargo, el *L. acidophilus* estaría liberando más SDG con harina desgrasada que con harina entera.

Con respecto al porcentaje de bioaccesibilidad de SECO, se observa que el *L. casei* no libera este lignano, ni en harina de linaza entera ni en desgrasada. No obstante esto puede deberse a que SECO es transformado rápidamente a END. Por otra parte, se puede ver que el *L. casei* está liberando más END con harina desgrasada que con harina entera.

CUADRO 11 Bioaccesibilidad de lignanos

Bioaccesibilidad (%)	<i>Lactobacillus casei</i>		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	Harina linaza entera	Harina linaza desgrasada	Harina linaza entera	Harina linaza desgrasada
SDG	0,682	0,599	0,378	0,813
SECO	0,002	0,005	-	-
END	0,313	1,051	-	-

(-) No hay producción de SECO y END con el probiótico *Lactobacillus acidophilus*.

A continuación en las Figuras 15, 16, 17 y 18 se muestran de forma esquemática los resultados obtenidos de la producción de lignanos a través del tiempo.

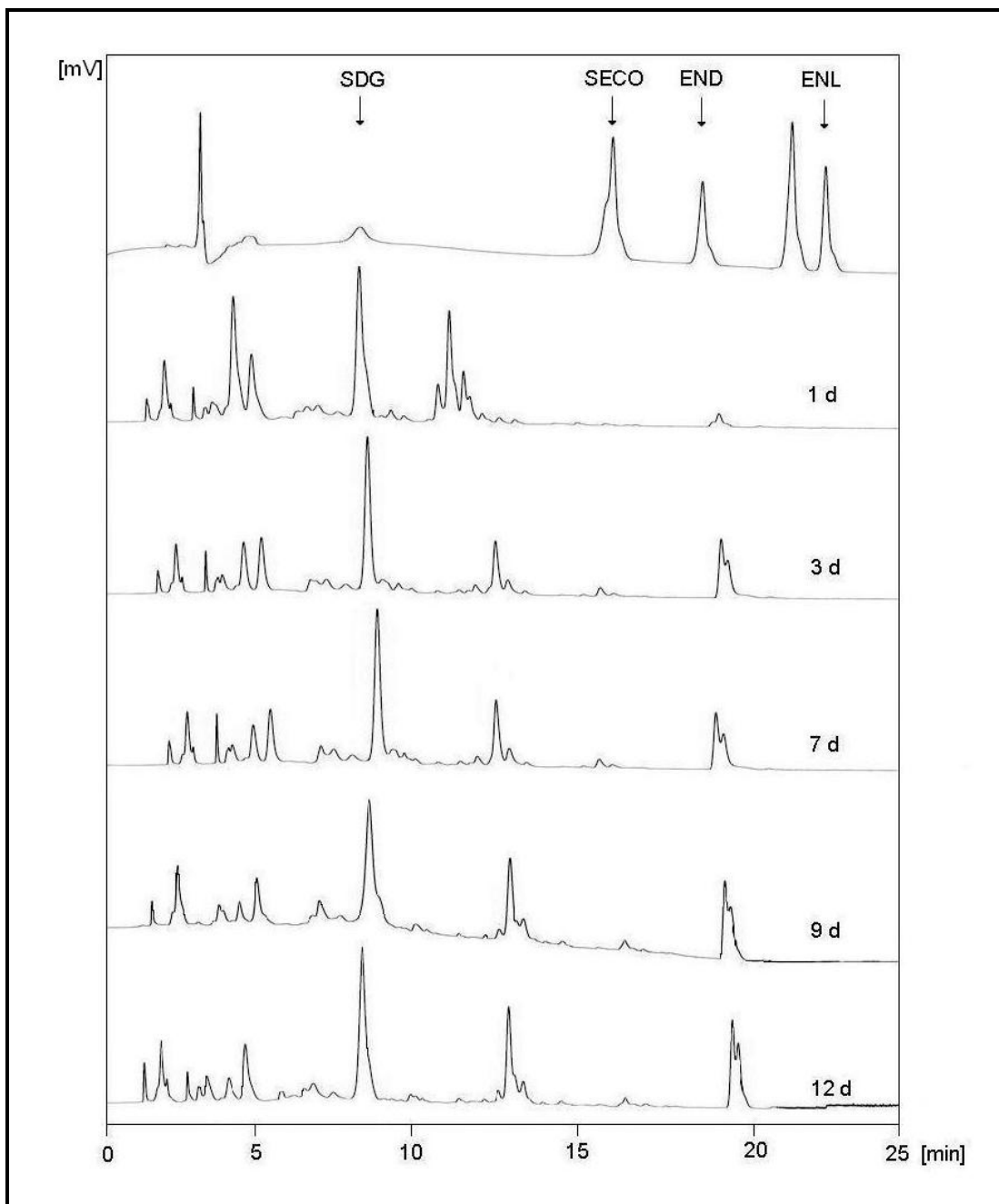


FIGURA 15 Cromatograma de la producción de lignanos en la fermentación de *L. casei* en un medio con harina de linaza entera durante 12 días.

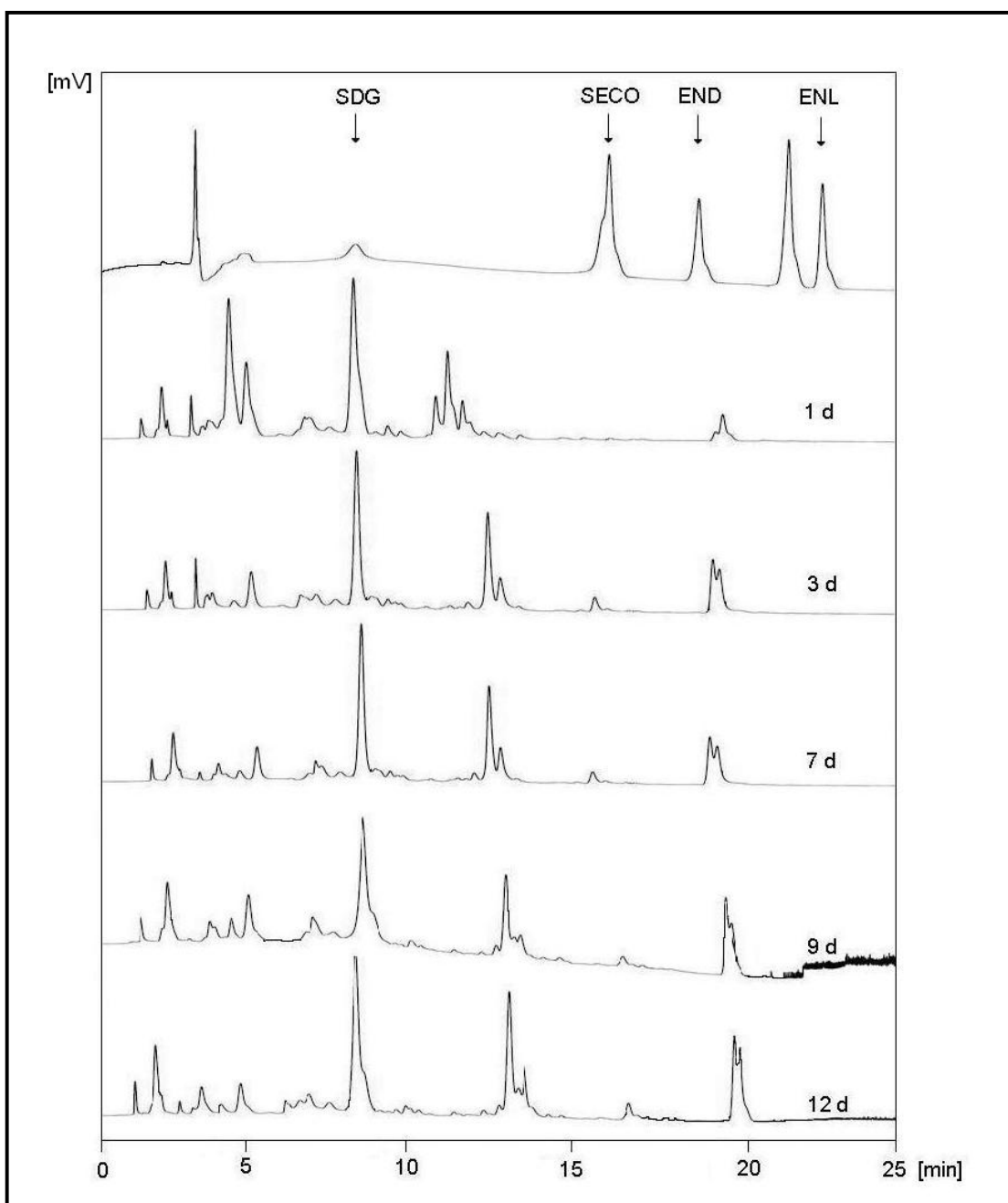


FIGURA 16 Cromatograma de la producción de lignanos en la fermentación de *L. casei* en un medio con harina de linaza desgrasada durante 12 días.

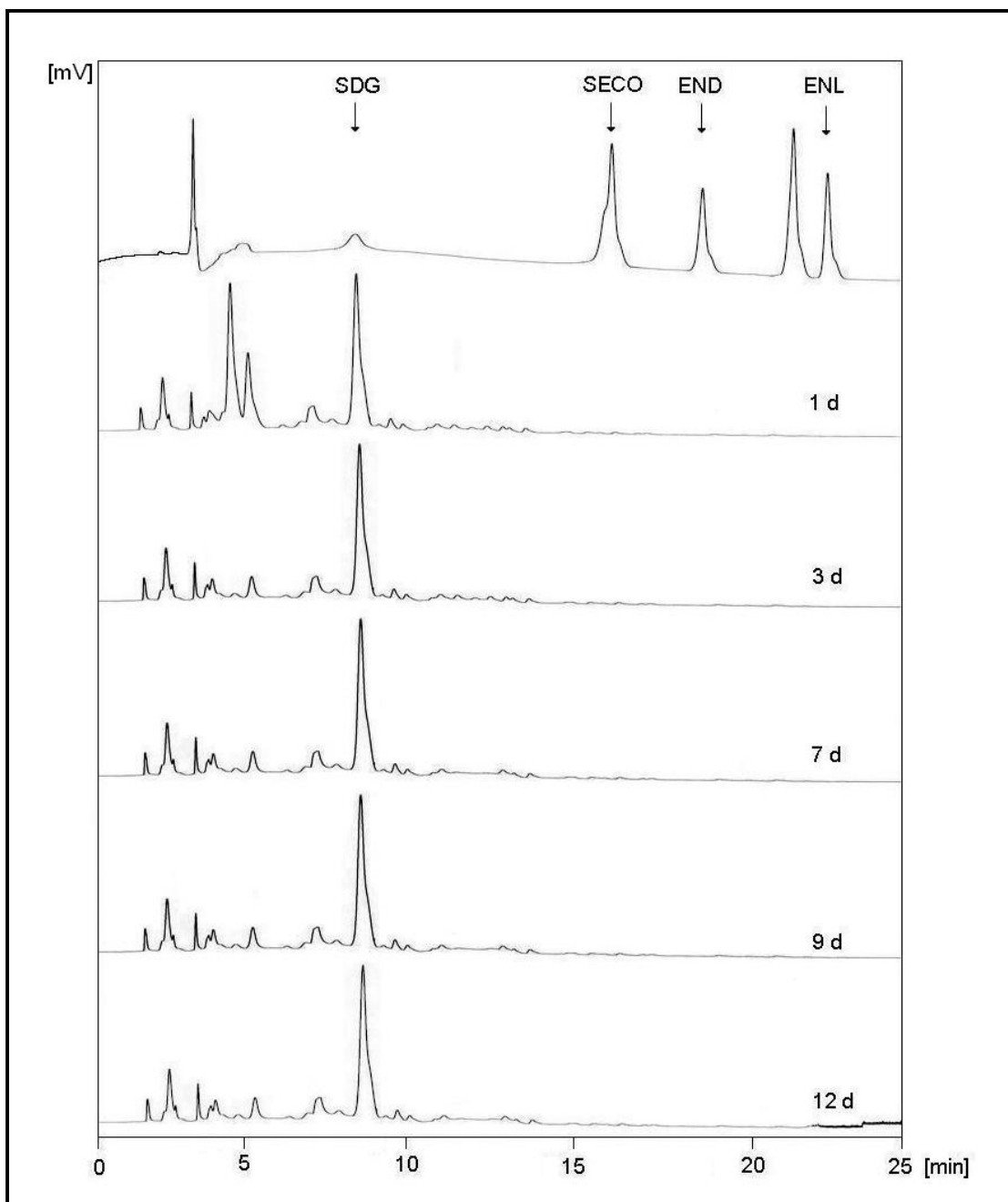


FIGURA 17 Cromatograma de la producción de lignanos en la fermentación de *L. acidophilus* en un medio con harina de linaza entera durante 12 días.

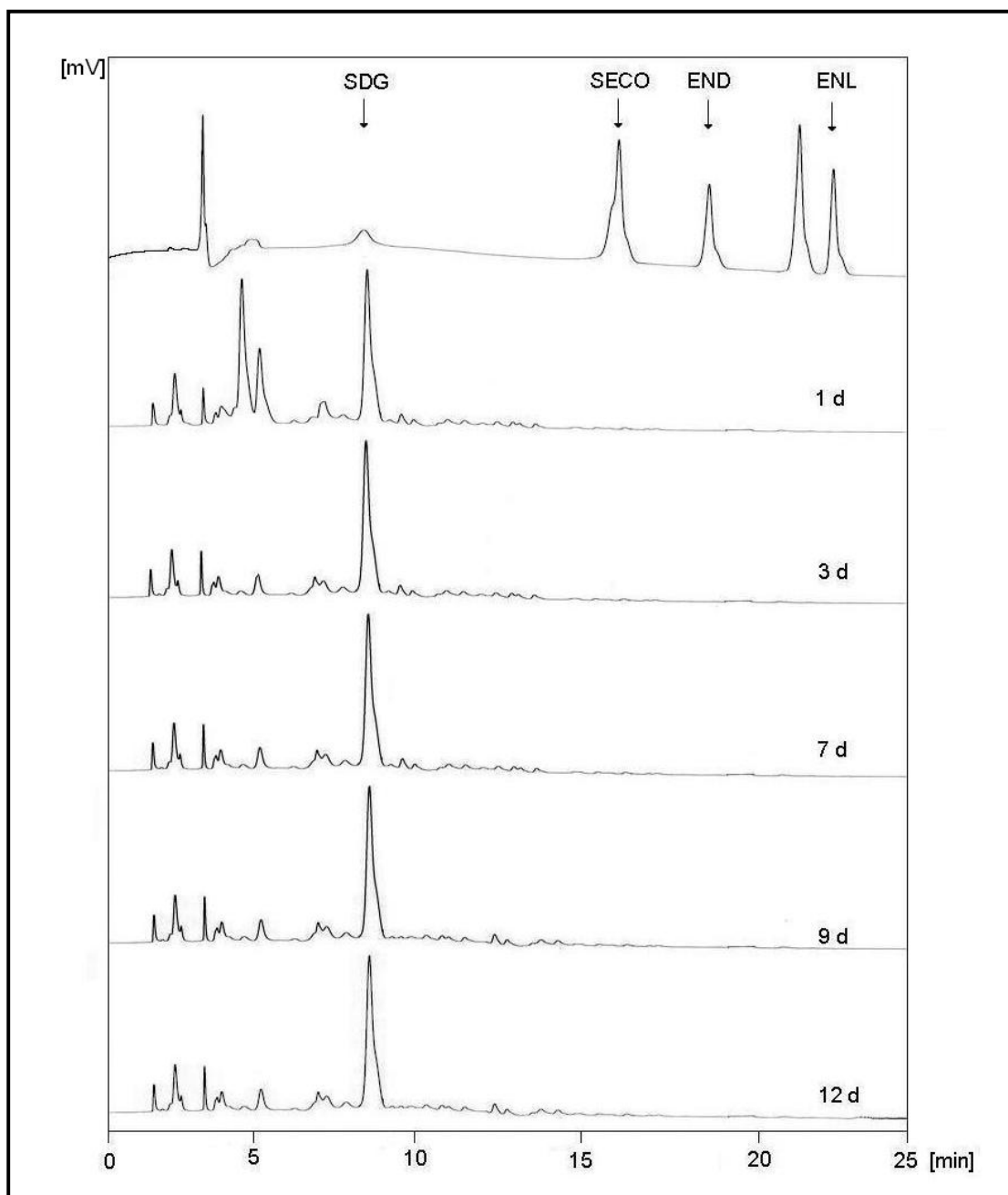


FIGURA 18 Cromatograma de la producción de lignanos en la fermentación de *L. acidophilus* en un medio con harina de linaza desgrasada durante 12 días.

4.4 Determinación de aminoácidos libres

Dentro del estudio se llevó a cabo la determinación de aminoácidos libres por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con la finalidad de evaluar la degradación o metabolización de las proteínas de la linaza en la fermentación de las harinas de linaza (entera y desgrasada) por bacterias lácticas *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*.

Para poder llevar a cabo los análisis correspondientes se estableció un patrón como lo muestra la Figura 19.

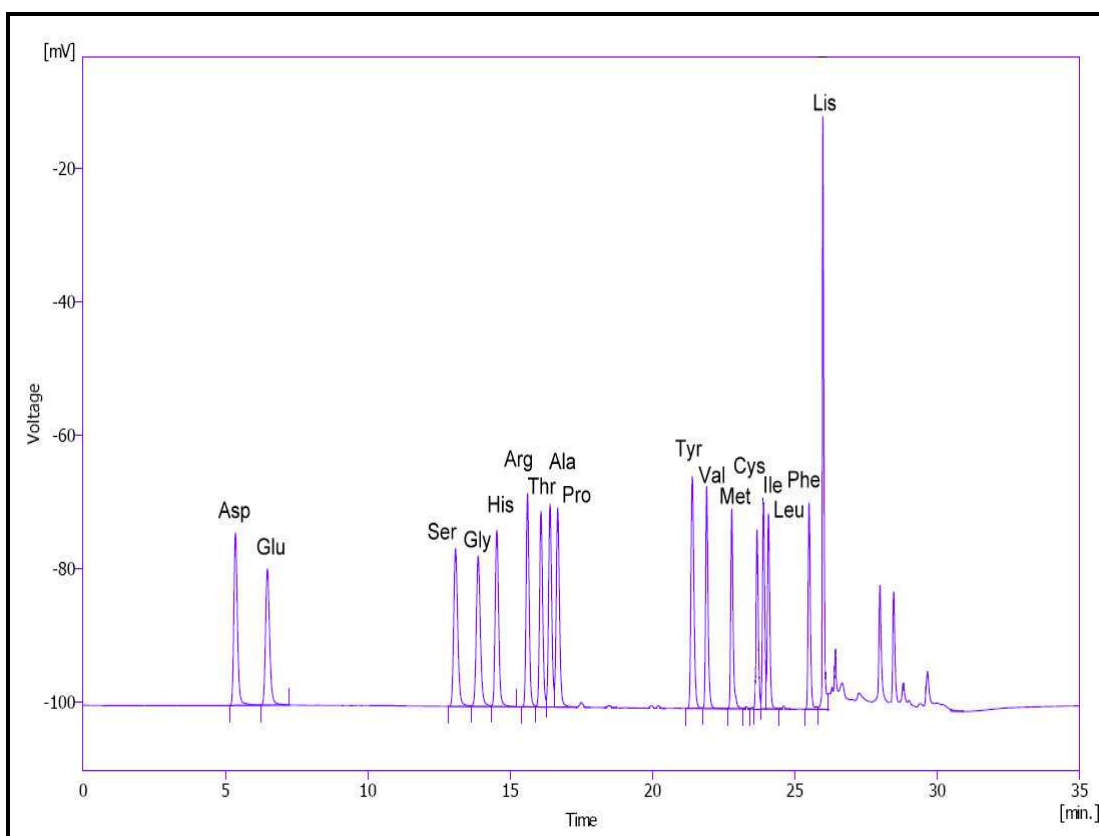


FIGURA 19 Cromatograma de patrones de PITC-aminoácidos.

Los aminoácidos esenciales para la salud humana se hacen evidentes en la semilla de linaza, estos aminoácidos esenciales no los sintetiza el cuerpo humano, es por ello que se deben obtener de la dieta.

De acuerdo a los resultados obtenidos los aminoácidos se clasificaron de acuerdo a su polaridad del grupo R, como se muestra a continuación:

4.4.1 Aminoácidos alifáticos. En la fermentación de los probióticos *L. casei* y *L. acidophilus* sometidos a medios que contienen harina de linaza entera y desgrasada se puede apreciar que durante las primeras horas de incubación hay un aumento de aminoácidos alifáticos, donde los probióticos al encontrarse en un medio que contiene los sustratos necesarios para su desarrollo, lo consumen a velocidad máxima. Posteriormente se puede ver que la concentración de aminoácidos permanece constante en el tiempo debido a que los microorganismos desarrollan un metabolismo diferente donde se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios (PISABARRO, 2003) y finalmente un descenso en la concentración como lo muestra la Figura 20.

Además se debe destacar que no presenta mayores diferencias entre los microorganismos probióticos estudiados, pero se ve claramente que al utilizar un medio que contiene harina de linaza desgrasada las concentraciones de aminoácidos son más altas que los que contienen harina de linaza entera. Esto es debido a que al encontrarse un medio libre de grasa, los probióticos consumen los carbohidratos disponibles y las proteínas que contiene la harina de linaza (BLAUT and CLAVEL, 2007).

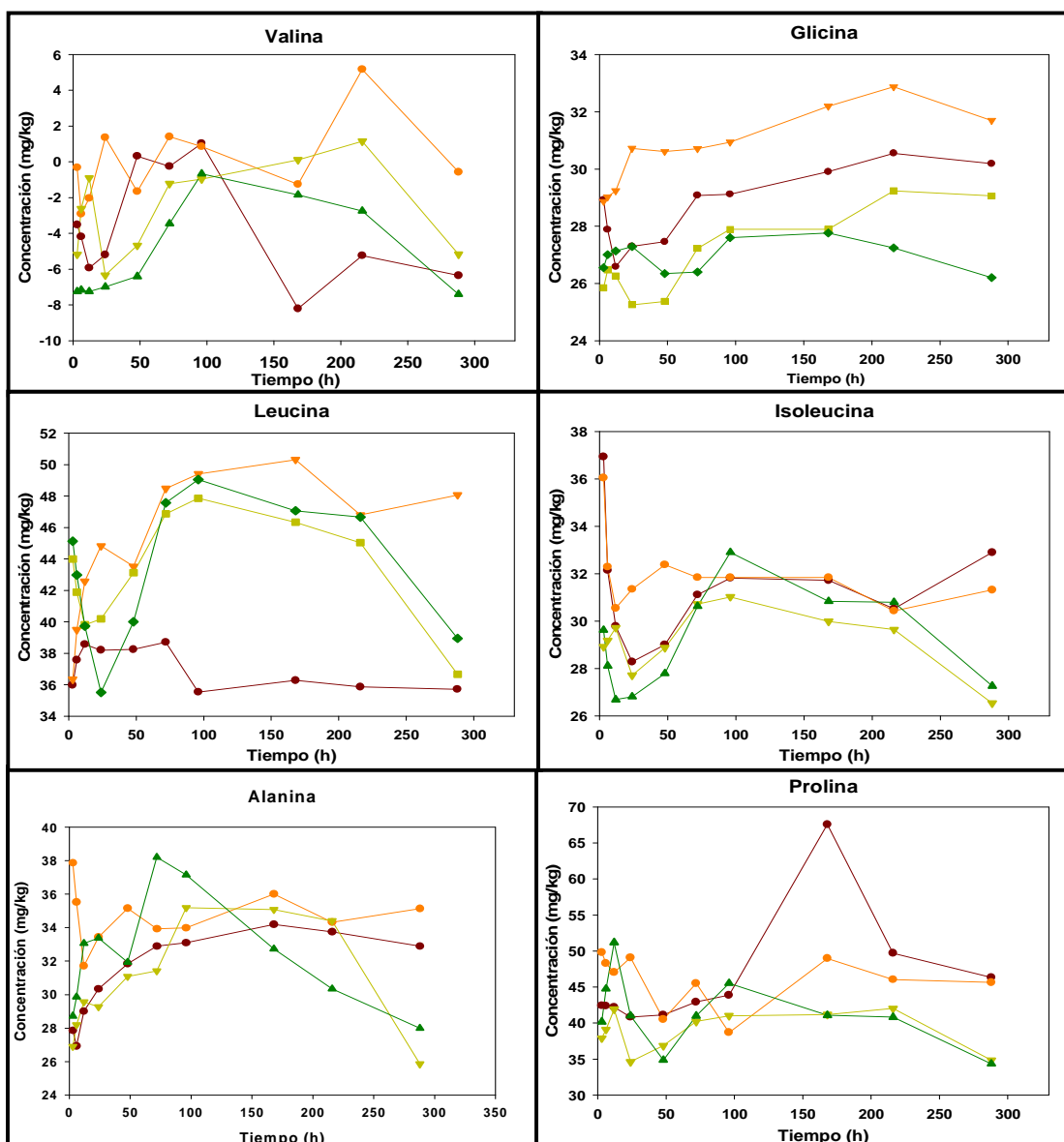


FIGURA 20 Aminoácidos alifáticos estudiados en la fermentación de los probióticos. ● *L. casei* - Harina entera; ▲ *L. casei* - Harina desgrasada; ▼ *L. acidophilus* - Harina entera; ▲ *L. acidophilus* - Harina desgrasada.

4.4.2 Aminoácidos aromáticos. En la Figura 21 se puede observar en las primeras horas de incubación un aumento en la concentración de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, donde los microorganismos adaptan su metabolismo a las condiciones del

medio y consumen los nutrientes a velocidad máxima. Sin embargo, no ocurre lo mismo en la fermentación de *L. casei* con harina entera y *L. acidophilus* con harina desgrasada. Esto puede deberse a que los microorganismos se están adecuando a las condiciones del medio. A partir de las 24 horas de incubación, la concentración de aminoácidos se mantiene constante en el tiempo. En esta fase se utilizan materiales de reserva, se descomponen parte de los ribosomas y se sintetizan enzimas. Mientras las células puedan obtener la energía necesaria por respiración de materiales de reservas o de proteínas, las bacterias continúan largo tiempo vivas (PISABARRO, 2003). Sin embargo, luego de los 9 días de incubación se ve un descenso progresivo del aminoácido fenilalanina en la fermentación de *L. acidophilus* que contienen ambas harinas. Por ende, a medida que transcurren las horas el *Lactobacillus casei*, ya sea en harina entera como desgrasada, promueve la generación de fenilalanina.

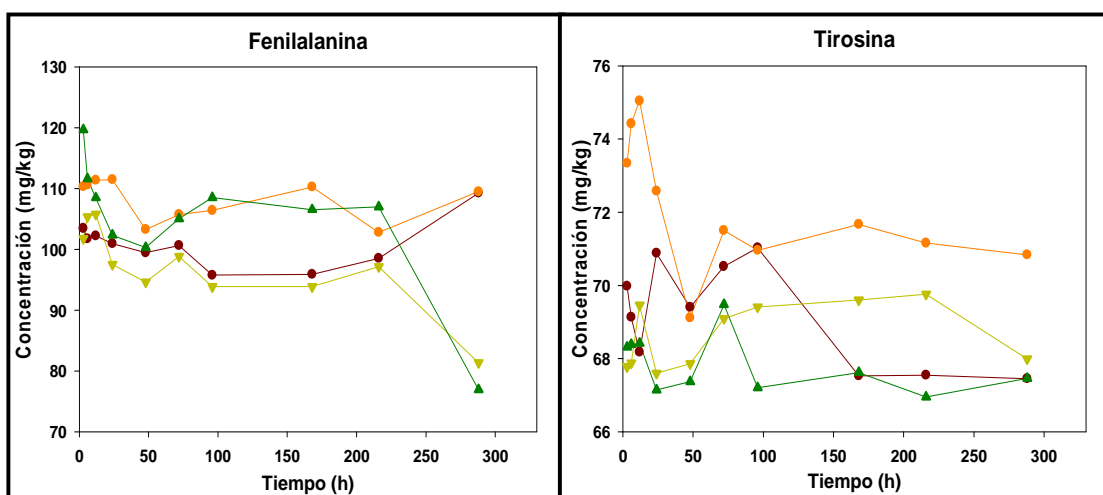


FIGURA 21 Aminoácidos aromáticos estudiados en la fermentación de los probióticos. ● *L. casei* - Harina entera; ● *L. casei* - Harina desgrasada; ▼ *L. acidophilus* - Harina entera; ▲ *L. acidophilus* - Harina desgrasada.

4.4.3 Aminoácidos azufrados. En la fermentación de los probióticos estudiados (*L. casei* y *L. acidophilus*) sometidos a medios con harina de linaza entera y desgrasada no hay presencia de cisteína. Esto es debido a que la linaza posee este aminoácido en forma limitante (FIGUEROLA *et al.*, 2008).

En la Figura 22 se puede ver que durante las primeras horas de incubación los microorganismos se adaptan a las condiciones del medio y consumen los sustratos del medio a velocidad máxima, generándose un ascenso en la concentración de metionina. Posteriormente la concentración de este aminoácido se mantiene constante a lo largo del tiempo, donde los microorganismos desarrollan un metabolismo distinto porque se produce un agotamiento de nutrientes esenciales (PISABARRO, 2003). A partir de los 7 días hay un ascenso en la concentración de metionina en la fermentación de *L. casei* con harina de linaza entera mientras que se produce un descenso progresivo en los medios con harina desgrasada donde fueron incubados *L. acidophilus* y *L. casei*, debido a que se agotan los nutrientes que ofrece el medio, la tasa de muerte se incrementa y por lo tanto el número de bacterias viables disminuye rápidamente generando que la curva de crecimiento decline (PISABARRO, 2003).

Además HALL *et al.*, (2006) señala que dentro de los aminoácidos limitantes que contiene la linaza se encuentra la metionina.

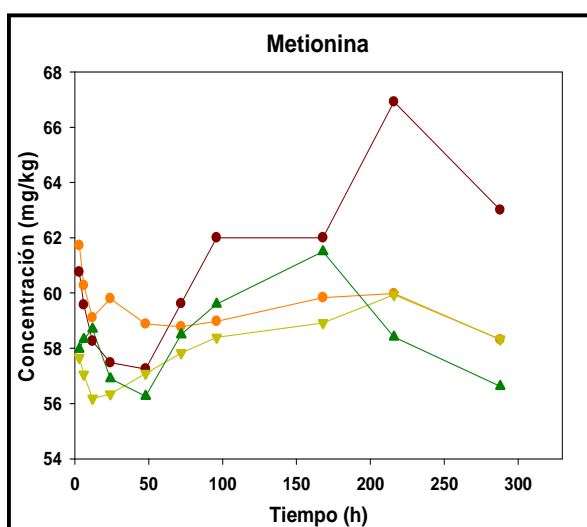


FIGURA 22 Aminoácido azufrado estudiado en la fermentación de los probióticos. ● *L. casei* - Harina entera; ● *L. casei* - Harina desgrasada; ▼ *L. acidophilus* - Harina entera; ▲ *L. acidophilus* - Harina desgrasada.

4.4.4 Aminoácidos hidrofílicos

Este grupo se puede subdividir en aminoácidos ácidos, hidroxilados y básicos.

4.4.4.1 Aminoácidos ácidos. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar en la Figura 23 un aumento en la concentración de ácido aspártico y ácido glutámico en las primeras horas de incubación donde los microorganismos adaptan su metabolismo a las condiciones del medio y consumen los nutrientes a velocidad máxima (PISABARRO, 2003). Además, la linaza es rica en ácido aspártico y ácido glutámico (HALL et al., 2006).

Posteriormente la concentración de aminoácidos se mantiene constante a lo largo del tiempo y luego se produce el descenso en la concentración porque las células viables disminuyen debido al agotamiento de nutrientes.

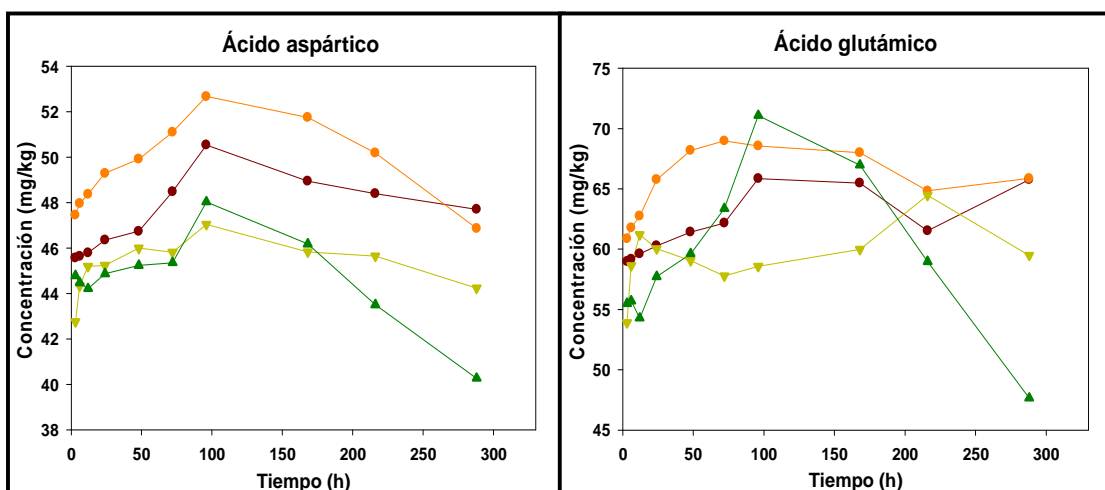


FIGURA 23 Aminoácidos ácidos estudiados en la fermentación de los probióticos. ● *L. casei* - Harina entera; ● *L. casei* - Harina desgrasada; ▼ *L. acidophilus* - Harina entera; ▲ *L. acidophilus* - Harina desgrasada.

4.4.4.2 Aminoácidos básicos. En la Figura 24 se puede observar un aumento en la concentración de aminoácidos durante las primeras horas de incubación debido a que los microorganismos consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima, luego la concentración se mantiene constante durante el tiempo de incubación por el

metabolismo que desarrollan los microorganismos al producirse un agotamiento de los nutrientes esenciales, y finalmente se incrementa la tasa de muerte, donde el número de bacterias viables disminuye rápidamente y, por lo tanto la curva de crecimiento declina (PISABARRO, 2003).

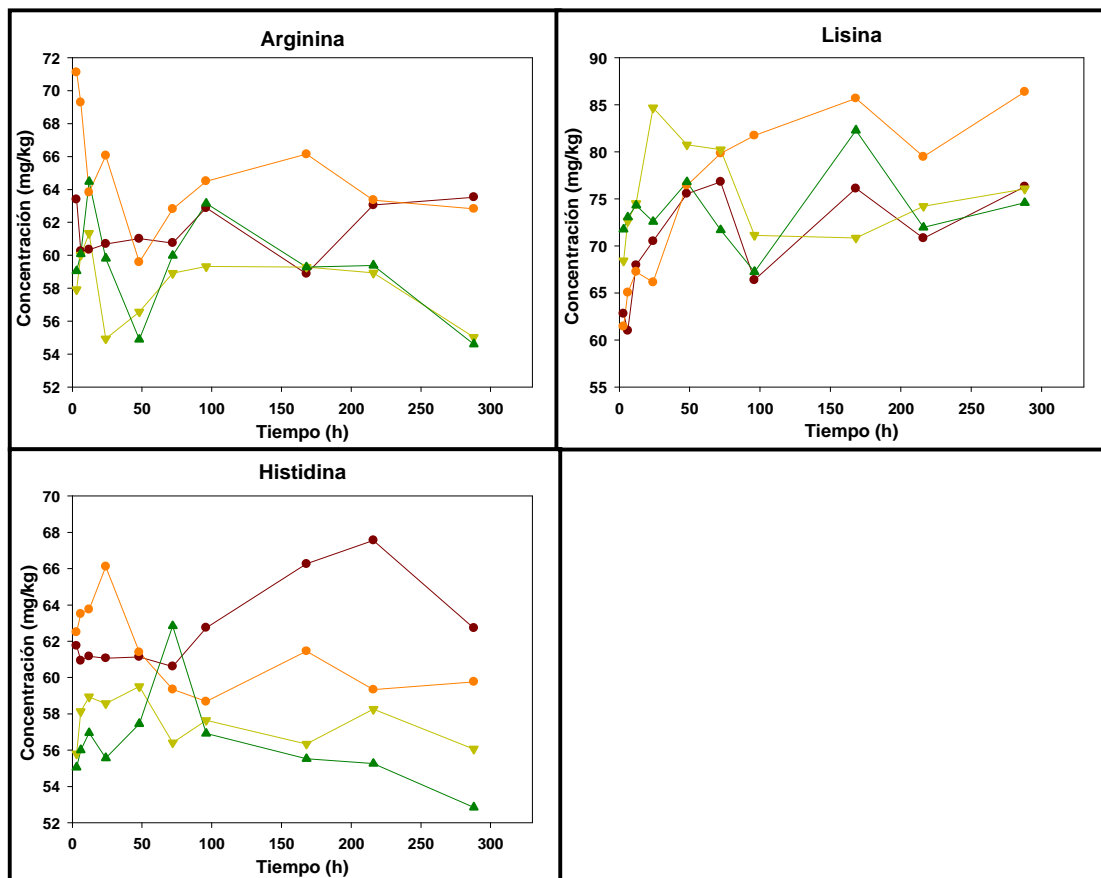


FIGURA 24 Aminoácidos básicos estudiados en la fermentación de los probióticos. ● *L. casei* - Harina entera; ● *L. casei* - Harina desgrasada; ▼ *L. acidophilus* - Harina entera; ▲ *L. acidophilus* - Harina desgrasada.

4.4.4.3 Aminoácidos hidroxilados. En la Figura 25 se puede observar un aumento en la concentración de aminoácidos en las primeras horas de incubación donde los probióticos consumen los nutrientes a velocidad máxima. Luego la curva se mantiene constante a lo largo del tiempo donde se desarrolla un metabolismo diferente y

finalmente hay un descenso de la concentración de aminoácidos donde el número de bacterias viables disminuye por el agotamiento de nutrientes. (PISABARRO, 2003)

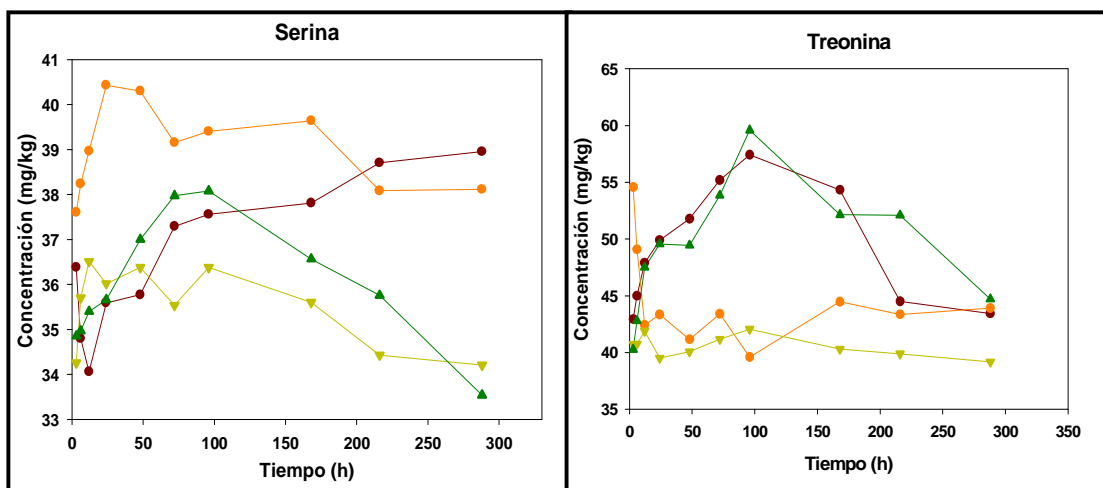


FIGURA 25 Aminoácidos hidroxilados estudiados en la fermentación de los probióticos. ● *L. casei* - Harina entera; ● *L. casei* - Harina desgrasada; ▼ *L. acidophilus* - Harina entera; ▲ *L. acidophilus* - Harina desgrasada.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se desprende que durante la fermentación de los probióticos *L. casei* y *L. acidophilus* con harina de linaza entera y desgrasada se produce la degradación de las proteínas a aminoácidos libres, lo que indicaría que la linaza podría tener sustancias proteolíticas que necesitan las bacterias lácticas para su crecimiento. Además, se puede concluir que hay mayor concentración de aminoácidos libres cuando los probióticos son incubados en un medio que contiene harina desgrasada que en un medio con harina entera, ya que al haber ausencia de grasa los microorganismos consumen los carbohidratos y proteínas que posee la linaza.

A continuación en las Figuras 26, 27, 28 y 29 se muestran de forma esquemática los resultados obtenidos de aminoácidos libres.

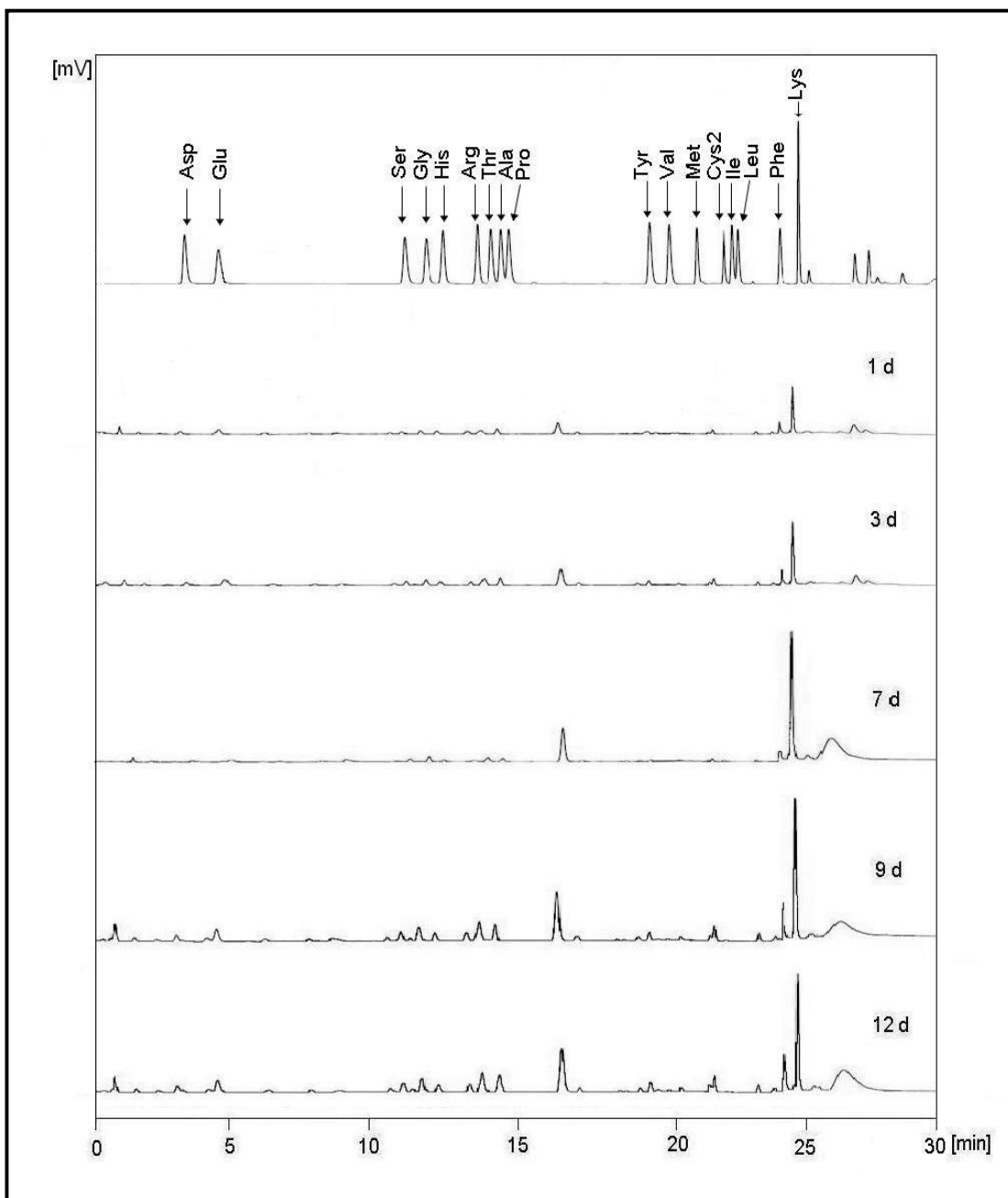


FIGURA 26 Cromatograma de la producción de aminoácidos libres en la fermentación de *L. casei* en un medio con harina entera durante 12 días de incubación.

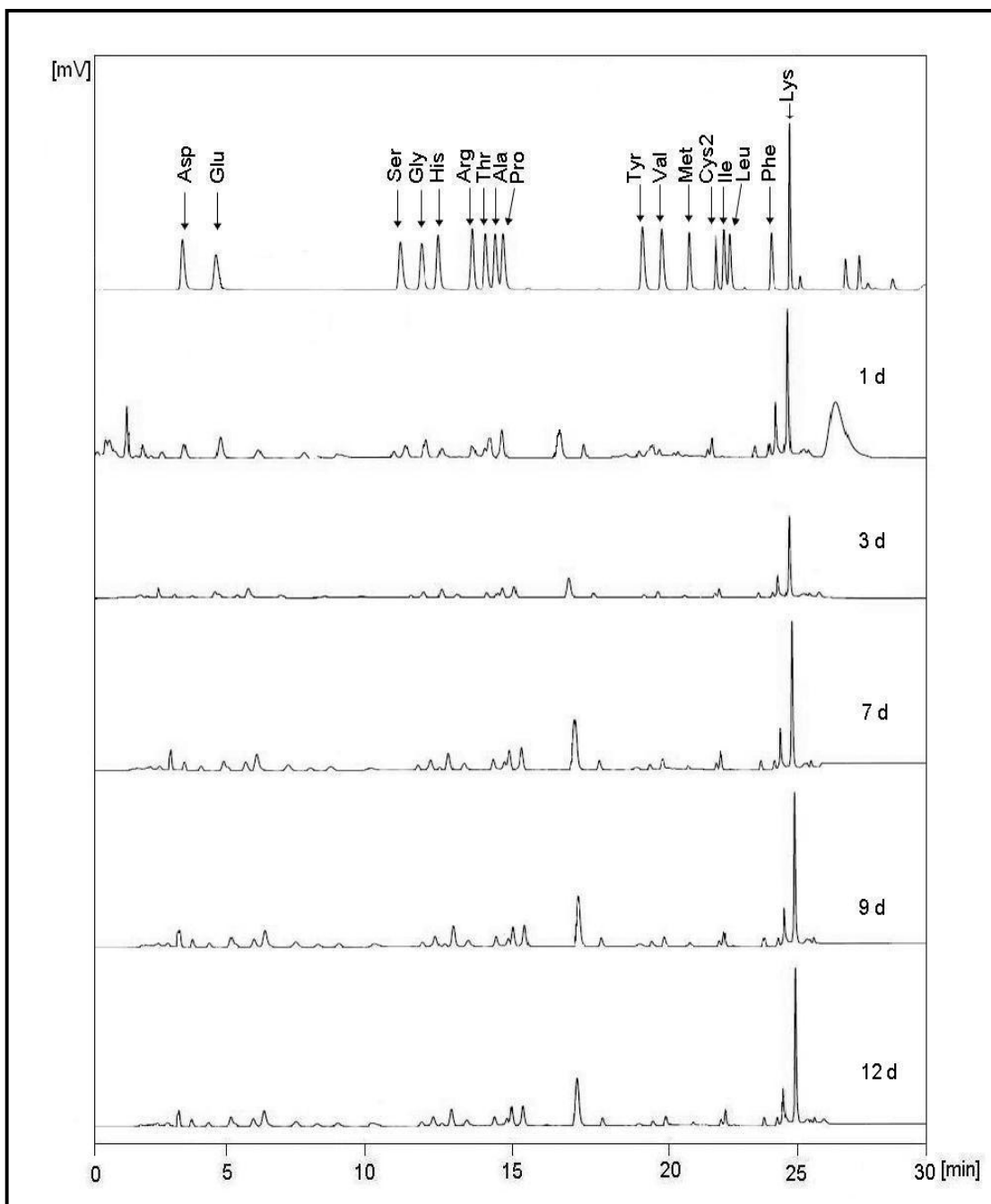


FIGURA 27 Cromatograma de la producción de aminoácidos libres en la fermentación de *L. casei* en un medio con harina desgrasada durante 12 días de incubación.

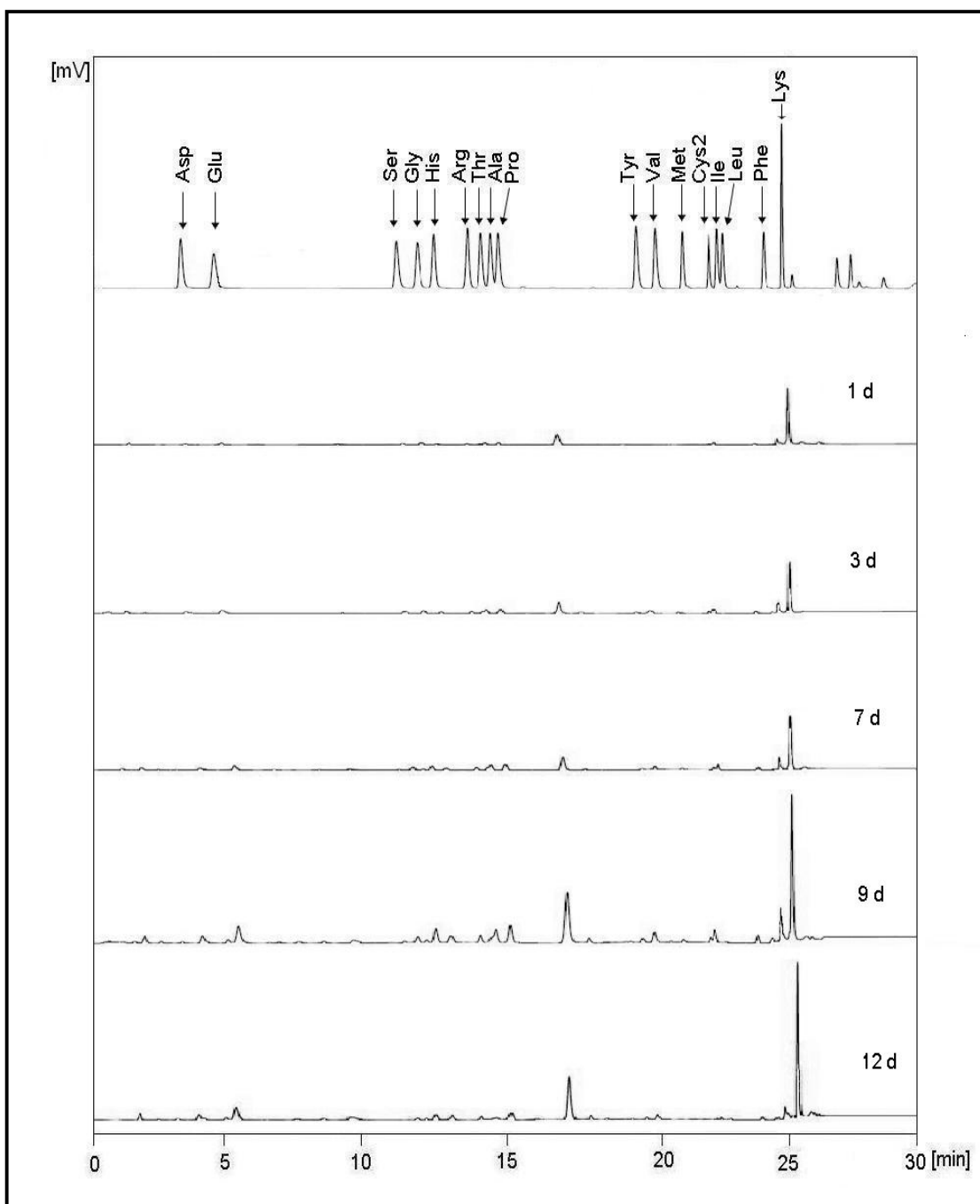


FIGURA 28 Cromatograma de la producción de aminoácidos libres en la fermentación de *L. acidophilus* en un medio con harina entera durante 12 días de incubación.

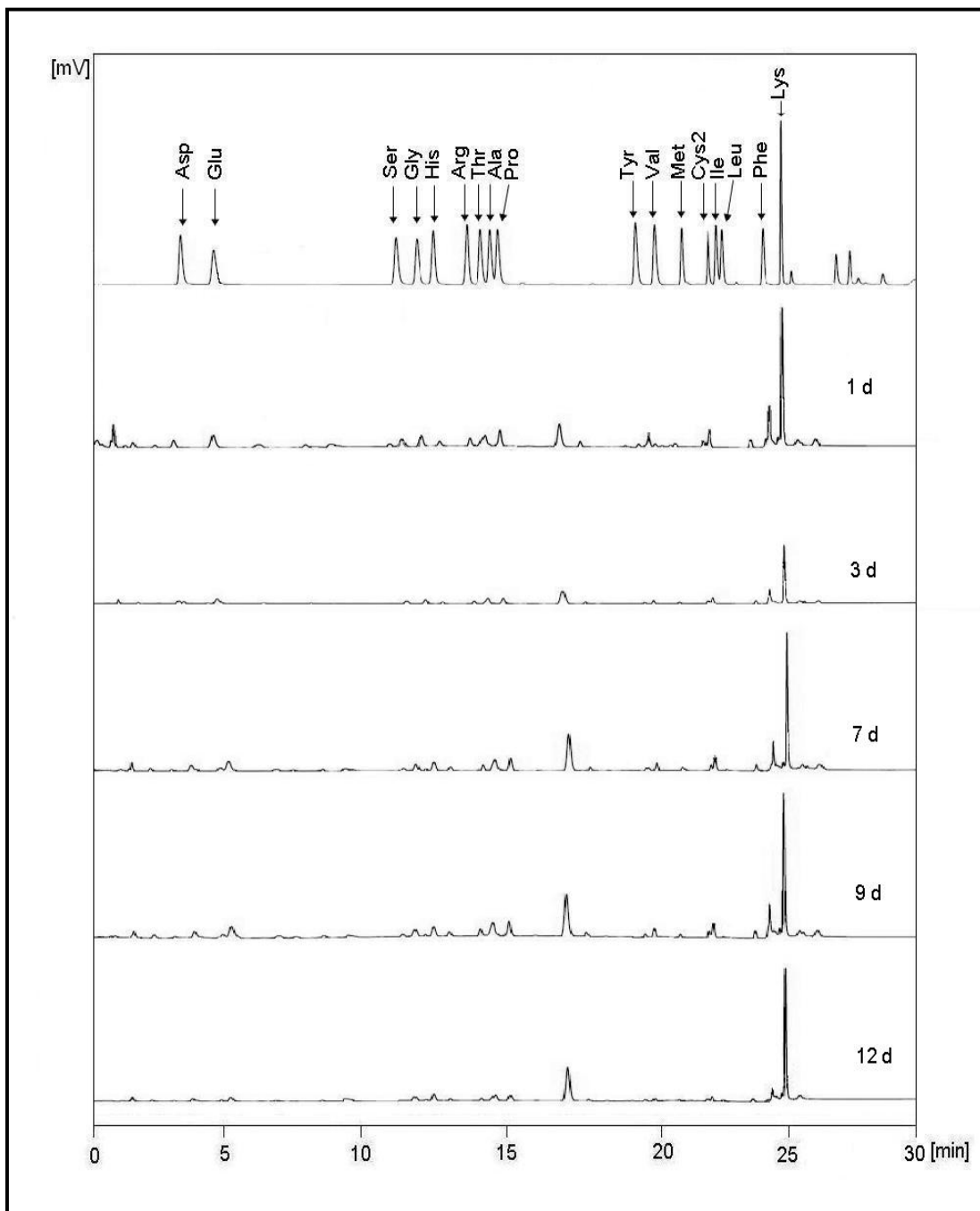


FIGURA 29 Cromatograma de la producción de aminoácidos libres en la fermentación de *L. acidophilus* en un medio con harina desgrasada durante 12 días de incubación.

5 CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que las bacterias lácticas *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* son capaces de metabolizar el secoisolariciresinol diglicósido (SDG), pero sólo el *Lactobacillus casei* es capaz de liberar el agliconas secoisolariciresinol (SECO) y generar enterodiol (ED), lignano con actividad biológica.
- Las bacterias estudiadas no generan enterolactona (EL) al encontrarse en un medio con harina de linaza entera como desgrasada, debido a que el enterodiol (ED) no es oxidado.
- El probiótico *Lactobacillus casei* es adecuado para la conversión de lignanos, lo cual hace factible la posibilidad de incluir linaza en alimentos lácticos que contengan esta bacteria.
- Durante la fermentación de las harinas de linaza entera y desgrasada con *L. casei* y *L. acidophilus* se produce la degradación de las proteínas de la linaza a aminoácidos libres.
- En la fermentación de los probióticos se aprecia mayor concentración de lignanos y aminoácidos libres en las incubaciones con harina desgrasada que con harina entera.

6 BIBLIOGRAFIA

- ADLERCREUTZ, H.; BANNWART, C.; WÄHÄLÄ, K.; MÄKELA, T.; BRUNOW, G.; HASE, T. 1993. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 44(2): 147-153.
- ANURADHA, S. y RAJESHWARI, K. 2005. Probiotics in health and disease. *J. Indian Acad. of Clin. Med.* 6(1): 67-72.
- ATKINSON, C.; LAMPE, J.; SCHOLLES, D.; CHEN, C.; WAHALA, K.; SCHWARTZ, S. 2006. Lignan and isoflavone excretion in relation to uterine fibroids: a case-control study of young to middle-aged women in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* 84(3): 587-593.
- BAEZA V., M.A. 2008. 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 Lic. Cs. Alim. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 61 p.
- BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O.; ZAMIANSAN, Z. 1992. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie* 23: 79-85
- BEGUM, A.; NICOLLE, C.; MILLA, I.; LAPIERRE, C.; NAGANO, K.; FUKUSHIMA, K.; HEINONEN, S.M.; ADLERCREUTZ, H.; REMESY, C.; SCALBERT, A. 2004. Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *J. Nutr.* 134: 120-127.
- BHATTY, R. and CHERDKIATGUMCHAI, P. 1990. Compositional analysis of laboratory-prepared and commercial samples of linseed meal and of hull isolated from flax. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 67(2): 79-84.
- BLAUT, M. and CLAVEL, T. 2007. Metabolic Diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. *J. Nutr.* 137 (3, Suppl 2): 751-755.

- BRAVO, L and SAURA-CALIXTO, F. 1998. Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *Am. J. Enol. Vitic.* 49(2): 135-141.
- BRENNAN, C. 2005. Dietary fibre, glycaemic response and diabetes. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 560-570.
- CHEN, J.; LIU, X.; SHI, Y.P.; MA, C.Y. 2007. Determination of the Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside from Flaxseed (*Linum Usitatissimum* L.) by HPLC. *J. Liq. Chromatogr Related Technol.* 30: 533- 544
- CLAVEL, T.; HENDERSON, G.; ALPERT, C.; PHILIPPE, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; DORÉ, J.; BLAUT, M. 2005. Intestinal bacterial communities that produce active estrogen-like compounds enterodiol and enterolactone in humans. *Applied and environmental microbiology.* 71(10): 6077-6085.
- CURRY, B. y CROW, V. 2002. *Lactobacillus casei* Group. In: Roginski, H.; Fuquay, J.N.; Fox P.F. *Encyclopedia of Dairy Sciences.* Elsevier, Londres. pp:1488-1493.
- DANONE WORLD NEWSLETTER. 1995. *Lactobacillus casei.* (On line). <<http://www.danonevitapole.com>>. (Agosto 2010)
- DAUN, J. y DECLERCQ, D. 1994. Sixty years of Canadian flaxseed quality surveys at the Grain Research Laboratory. *Proc. Flax Inst.* 55: 192-200.
- DAUN, J.; BARTHET, V.; CHORNICK, T.; DUGUID, S. 2003. Structure, composition, and variety development of faxseed. In: Thompson, L.U.; Cunanne, S.C. (eds.). *Flaxseed in Human Nutrition.* 2nd ed. Champaign, Illinois. pp:1-40.
- DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, E.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O'HALLORAN S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; O'SULLIVAN, G.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Suppl.): 386-392.
- EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE (EBI), 2005, "Bacteria Genomes—*Lactobacillus acidophilus*", www.ebi.ac.uk. (Noviembre 2010)

- FAO y OMS. 2006. Probióticos en los alimentos. Roma, Italia. 49 p.
- FIGUEROLA, F.; MUÑOZ, O. y ESTÉVEZ, A. M. 2008. La linaza como fuente de compuestos bioactivos para la elaboración de alimentos. *Agro Sur* 36 (2):49-58.
- FRANCO, O.; BURGER, H.; LEBRUN, C.; PEETERS, P.; LAMBERTS, S.; GROBBEE, D.; VAN DER SCHOUW, Y. 2005. Higher dietary intake of lignans is associated with better cognitive performance in postmenopausal women. *J. Nutr.* 135(5): 1190-1195.
- GARRIDO, A. y TEIJON, J.M. 2006. *Fundamentos de Bioquímica Estructural*. 2da edición. Madrid, Tébar. 444 p.
- GEE, J.; DUPONT, M.; RHODES, M.; JOHNSON, I. 1998. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free radical biology and medicine*. 25(1): 19-25.
- GIBSON, G. and FULLER R. 2000. Aspect of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying Probiotics and Prebiotics for human use. *J. Nutr.* 130(Suppl): 391-395.
- GONZÁLEZ, B.; TREVIÑO, M.; JIMÉNEZ, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN* 4(2): 99-106.
- GOPAL P. 2002. *Lactobacillus acidophilus*. In: Roginski, H.; Fuquay, J and Fox, P. *Encyclopedia of dairy Science*. Elsevier. Londres. pp:1485-1487.
- HALL, C.; TULBEK, M.; XU, Y. 2006. Flaxseed. *Advances in food and nutrition research* vol 51, 97pp.
- HEDELIN, M.; KLINT, Á.; CHANG, E.; BELLOCO, R.; JOHANSSON, J.; ANDERSON, S.; HEINONEN, S.; ADLERCREUTZ, H.; ADAMI, H.; GRÖNBERG, H.; BÅLTER, K. 2006. Dietary phytoestrogen, serum enterolactone and risk of prostate cancer: the Cancer Prostate Sweden Study (Sweden). *Cancer Causes Control* 17(2): 169-180.

- HU, C.; YUAN, Y.; KITTS, D. 2007. Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. *Food and chemical toxicology*. 45(11): 2219-2227.
- KITTS, D.; YUAN, Y.; WIJEWICKREME, A.; THOMPSON, L. 1999. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Mol. Cell. Biochem*. 202:91-100
- NAIDU, A.; BIBLACK, W.; CLEMENS, R. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Revs. Food Sci. & Nutr*. 39: 13-126.
- KURMAN, J. y RASIC, J. 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. In: RK Robinson, editor. *Therapeutic properties of fermented milks*. Elsevier, Londres: Applied Food Sciences. pp:17-158.
- LAMPE, J. 2006. Assessing exposure to lignans and their metabolites in humans. *J. AOAC Int*. 89(4): 1174-1181.
- LEE, Y.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. 1999. *Handbook of probiotic*. John Wiley & sons, Inc. New York, USA. 211 p.
- LIONG, M. and SHAH, N. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *J. Dairy Sci*. 88(1): 55-66
- MAZZA, G. 2000. *Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesado*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 457 p.
- MEAGHER, L.; BEECHER, G.; FLANAGAN, V.; LI, B. 1999. Isolation and characterization of the lignans. Isolariciresinol and Pinoresinol in Flaxseed Meal. *J. Agric. Food Chem*. 47(8): 3173–3180.
- METZLER, M. 2003. Oxidative metabolism of lignans In: Thompson, L.U.; Cunnane, C.S. (ed.) *Flaxseed in Human Nutrition*. 2nd edn., Champaign, Illinois. AOCS Press. pp. 117-125.

- MORRIS, D 2003. "Linaza - una recopilación sobre sus efectos en la salud y nutrición". Flax council of Canada. <<http://www.flaxcouncil.ca>>. (Agosto 2010)
- OOMAH, B. D. 2001. Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81(9): 889–894.
- OUWEHAND, A.; BIANCHI SALVADORI, B.; FONDEN, R.; MOGENSEN, G.; SALMINEN S. 2003. Health effects of probiotics and culture - containing dairy products in humans. *Bulletin IDF FIL*. 380: 4-19.
- PISABARRO A. 2003. *Microbiología Clínica*. Departamento de Producción Agraria. Universidad de Navarra. Pamplona. España. 142 p.
- PUENTES, P.; IVENS, S.A. 2004. *Introducción a la cromatografía de líquidos de alto performance*. 77 p.
- RAJESHA, J.; MURTHY, K.; KUMAR, M.; MADHUSUDHAN, B.; RAVISHANKAR, G. 2006. Antioxidant potentials of flaxseed in vivo model. *J. Agric. Food Chem*. 54(11): 3794-3799.
- REID, G.; JASS, J.; SEBULSKY, M.; MCCORMICK, J. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol Rev*. 16(4): 658-672.
- ROBERFROID, M. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional food. *American J. Clin. Nutr*. 71:1682-1687.
- ROBBINS, R. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem*. 51(10): 2866-2887.
- ROLFE, R. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr*. 130(2): 396-402.
- ROSADO, J. y ONDARZA, M. 2003. Prebióticos y probióticos: efectos e implicaciones en la fisiología de la nutrición.

- ROWLAND, I. and TANAKA, R. 1993. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *J. Appl. Bacteriol.* 74(6): 667-674.
- RUBILAR, M.; GUTIERREZ, C.; VERDUGO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J. 2010. Flaxseed as a source of functional ingredients. *J. soil sci. plant nutr.* 10(3): 373 – 377.
- SALMINEN, S. y OUWEHAND, A. 2002. Probiotics, applications in dairy products. In: Roginski, H.; Fuquay, J. and Fox, P. *Encyclopedia of dairy Science*. Elsevier, Londres. pp: 2315-2322.
- SAMONA, A. and ROBINSON, R. 1991. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *J. Soc. Dairy Technol.* 44:64-66.
- SAMPATH, H. and NTAMBI, JM. 2004. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr. Rev.* 62:333-339.
- SANZ, Y.; COLLADO, M.; DALMAU, J. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica Española.* 61(9):476-482.
- SCHREZENMEIR, J. and M. DE VRESE. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics - approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2): 361-364.
- SETCHELL, K.; LAWSON, A.; BORRIELLO, A.; ADLERCREUTZ, H.; AXELSON, M. 1982. Formation of lignans by intestinal microflora. In: Malt, R.; Williamson, R. (eds), *Falk Symposium 31, Colonic Carcinogenesis*. MTP Press Ltd., Lancaster. 93-97 p.
- SKOOG, DOUGLAS A. 2001. *Principios de Análisis Instrumental*. 5a. Ed. Madrid: McGraw-Hill. 1028 p.
- TANAKA, R. y SAKO, T. 2002. Prebiotics. In: Roginski, H.; Fuquay, J.N.; Fox P.F. *Encyclopedia Of Dairy Sciences*. Elsevier, Londres. pp: 2256-2275

- TOBOREK, M.; LEE, Y.; GARRIDO, R.; KAISER, S.; HENNIG, B. 2002. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *Am. J. Clin. Nutr.* 75(1): 119-125.
- TOUILLAUD, M.; THIÉBAUT, A.; FOURNIER, A.; NIRAVONG, M.; BOUTRON-RUAULT, M.; CLAVEL-CHAPELON, F. 2007. Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status. *J. Natl. Cancer Inst.* 99(6): 475-486.
- THOMPSON, LU.; ROBB, P.; SERRAINO, M.; CHEUNG, F. 1991. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr Cancer.* 16(1): 43-52.
- THOMPSON, L.U.; BOUCHER, B.A.; LIU, Z. 2006. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr. Cancer* 54:184-201.
- WANG, L. 2002. Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *J. Chromatogr. B.* 777:289-309.
- WHITE, J.A.; HART, R.J. and FRY J.C. 1986. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry / Journal of Clinical Laboratory Automation* 8(4): 170 – 177.
- YOUNG, R. and HUFFMANS, S. 2003. Probiotic use in children. *J. Pediatr. Health Care.* 17:277-283.
- ZIMMERMAN, R.; BAUERMAN, U.; MORALES, F. 2006. Effects of growing site and nitrogen fertilization on biomass production and lignan content of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *J. Sci. Food Agr.* 86(3): 415-419.

ANEXO 1

Modo de empleo del caldo de Man, Rogosa y Sharpe

Composición:

Ingredientes	Concentración (g/L)
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	8
Extracto de Levadura	4
D(+)-glucosa	20
Hidrogenofosfato dipotásico	2
Tween 80	1
Hidrógeno-citrato diamónico	2
Acetato sódico	5
Sulfato de magnésico	0,2
Sulfato de manganeso	0,04

Preparación:

Disolver 52,2 g en 1 litro de agua desmineralizada; tratar en autoclave 15 minutos a 121°C.

ANEXO 2

Método del recuento de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*

Medio de cultivo: MRS IM + Glucosa

Composición:

Ingredientes	Concentración (g/L)
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	10
Extracto de Levadura	4
D(+)-glucosa	20
Dipotasio hidrogenofosfato	2
Tween 80	1
Diamonio hidrogenocitrato	2
Sodio acetato	5
Magnesio sulfato	0,2
Manganeso sulfato	0,04
Agar- agar	14

Preparación:

De acuerdo a las instrucciones del envase 68,2 g de agar MRS se disolvieron con agua desmineralizada y se aforó a un litro, se homogeneizó la mezcla calentando en

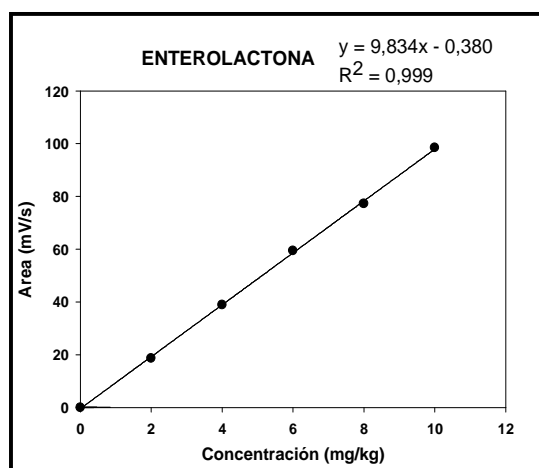
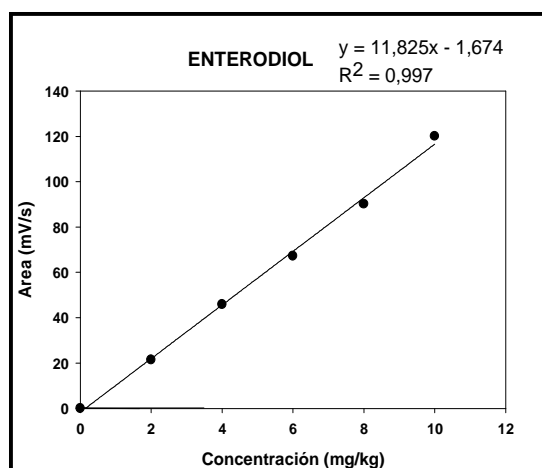
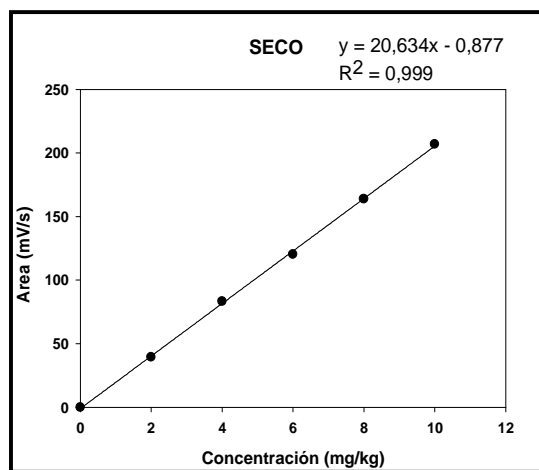
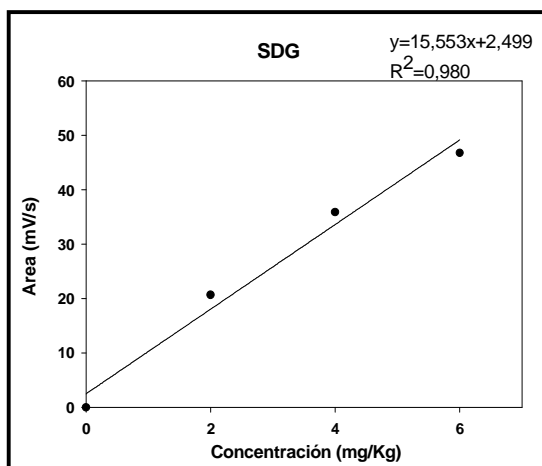
un baño de agua hirviendo; luego se pasaron 300 ml aproximadamente a matraces Erlenmeyer, que posteriormente se esterilizan a 121°C durante 15 minutos.

Luego de ser enfriados en un baño María a 45°C, en una campana de flujo laminar se prepararon placas Petri, con 30 ml aproximadamente de agar MRS, las placas fueron refrigeradas para los análisis posteriores.

Anexo 2.1 Preparación de agua peptonada. Peptona bacteriológica usada como medio de dilución fue preparada al 0,1% (un gramo de proteasa peptona por litro de agua destilada). El medio de dilución fue puesto en tubos de tapa rosca, adicionando alícuotas de 9,9 y 9 ml. Luego fueron esterilizados en una autoclave de 121°C por 15 minutos. Los tubos fueron guardados a temperatura ambiente para los análisis posteriores.

ANEXO 3

Curva de calibración de lignanos



ANEXO 4

Curva de calibración aminoácidos libres

