

Efecto prebiótico de la fibra y quitina de *Acheta domesticus* sobre *Lactobacillus bulgaricus*

García-Pérez Alejandro Daniel, Muñoz-Morales Leslie Yareli, Olmos-García Ricardo Ernesto, Pardo-Ríos Sandra Guadalupe, Pérez-Lima Carlos Enrique, Molina-González María Graciela.

Laboratorio de METODOLOGÍA de Científica II, Carrera de Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala, Tlalneantla, Estado de México, CP 54090.

leslie_muoz16@hotmail.com

Fecha de aceptación: 12 de agosto de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Acheta domesticus forma parte de la dieta de diversos animales. Además del aporte proteínico, provee de fibra como la quitina, que al no ser digeridas facilitan la digestión. A las moléculas de los alimentos que no son digeribles se les denomina prebióticos, éstas mejoran la proliferación de bacterias ácido lácticas, y contribuyen a la salud del huésped. Se evaluó el efecto prebiótico de la fibra y quitina de *Acheta domesticus* sobre *Lactobacillus bulgaricus*. La bacteria se creció en caldo MRS suplementado con 43 y 175 mg de fibra y quitina (65 y 130 mg), respectivamente, obtenidos de *Acheta domesticus*, y quitosano (1 y 2 mg). Los cultivos se incubaron a 37°C durante 10h. Las tres macromoléculas promovieron la proliferación bacteriana, incrementaron el contenido de ácido láctico y peróxido de hidrógeno, con una disminución en el pH. Los resultados mostraron que la quitina y fibra de *A. domesticus* tuvieron efecto prebiótico similar al del quitosano sobre *L. bulgaricus*.

Palabras Clave: *Acheta domesticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, quitina, fibra cruda, probióticos, prebióticos.

ABSTRACT

Acheta domesticus is part of the diet of different animals. Besides protein intake, it provides them with fiber such as chitin, which eases digestion when they are not digested. We call probiotics to those food's molecules that aren't digestible; these ones improve the proliferation of lactic acid bacteria, contributing to the host health. We evaluated the probiotic effect of fiber and chitin of *Acheta domesticus* upon *Lactobacillus bulgaricus*. The bacteria grew within MRS broth supplemented with 43 and 175 mg of fiber and chitin (65 and 130 mg), respectively, obtained from *A. domesticus* and chitosan (1.25 and 2.5 mg). Broths were incubated to 37°C during 10 hours. The three macromolecules promoted the bacterial proliferation; they increased the acid lactic content and hydrogen peroxide with a decrease in pH. The results showed that chitin and fiber of *A. domesticus* had a probiotic effect that was similar to that from the chitosan upon *L. bulgaricus*.

Key Words: *Achaeta domesticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, chitin, crude fiber, probiotic, prebiotic.

INTRODUCCIÓN

Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles. Se caracterizan por ser moléculas de gran tamaño que no pueden ser digeridas por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto alcanzando el intestino grueso, donde son degradados por la microflora bacteriana, principalmente por *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*. De esta forma, producen una biomasa bacteriana saludable, productos de fermentación con actividad bactericida y un pH óptimo, lo cual contribuye a la salud del hospedador (Batdor *et al.*, 2007; Olagnero *et al.*, 2007; Ortiz, 2010; Onumpai *et al.*, 2011; De Gregorio *et al.*, 2014).

Se han descrito diversos productos prebióticos que pueden dar un valor agregado a los alimentos, entre ellos, inulina, fructoligosacáridos, galactosacáridos, lactulosa y lactilol. Los prebióticos más estudiados de origen vegetal son la inulina y la oligofructosa, clasificadas como fibra dietética (Sastre, 2003; Costabile *et al.*, 2015; Bindels *et al.*, 2015). Recientemente ha cobrado importancia el estudio del efecto prebiótico de oligosacáridos obtenidos del quitosano (Fernández *et al.*, 2012; Geurts *et al.*, 2014; Patti *et al.*, 2015). El quitosano y quitina son polisacáridos que forman parte del exoesqueleto de crustáceos e insectos y de la membrana celular de ciertos hongos, su función biológica principal es estructural.

El quitosano, nombre dado a la quitina desacetilada, es biodegradable y no tóxico (Bautista *et al.*, 2005; Escudero *et al.*, 2006). A la quitina que no es digerible se le considera fibra cruda. Debido a las características de ambas moléculas, se convierten en posibles candidatos a presentar efecto prebiótico. Enzimas quitosanasas y quitinasas están presentes en diversas especies bacterianas, se ha observado que convierten el quitosano y la quitina en sustancias que promueven el crecimiento de *Bifidobacterias* y especies del género *Lactobacillus*, además de inhibir bacterias patógenas Gram positivas y negativas (Batdor *et al.*, 2007; Onumpai *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2012; De Gregorio *et al.*, 2014).

Las investigaciones sobre el uso de quitina y quitosano como prebióticos son controversiales. En algunos se menciona que promueven el crecimiento de bacterias ácido lácticas o bien, la protección de las mismas por encapsulamiento con quitosano y/o alginatos. Otros desestiman su función como prebiótico (Chavarri *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2012; Halder *et al.*, 2013; Shinha *et al.*, 2014). Los estudios en cuanto a la quitina son aún más limitados. Dentro de los pocos reportes que se encuentran disponibles sobre fibra y quitosano de origen insectario en relación con la digestión, está el reportado por Prinz *et al.* (2003) quienes hicieron una pequeña incisión en la quitina del exoesqueleto de los insectos y larvas de *Acheta domesticus*, procedimiento que ayuda en la digestión cuando son utilizados como fuente de alimento, debido a que permite la entrada de líquidos digestivos y aumenta la velocidad de la digestión y captación de energía en los mamíferos insectívoros.

Sumado a lo anterior, el uso de insectos como alimento es una costumbre ancestral que hasta la fecha se mantiene de manera regional. El uso de *Acheta domesticus*, también conocido como grillos domésticos, es apreciado por su alto valor proteínico (66%), bajo contenido de quitina y 3.1% fibra, atributos para considerarlo como un posible prebiótico. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto prebiótico de fibra y quitina de *Achaeta domesticus* sobre *Lactobacillus bulgaricus*.

METODOLOGÍA

Obtención de grillos y *Lactobacillus bulgaricus*

Se compraron grillos de la especie *Acheta domesticus* en la tienda de mascotas Viveros del Valle, Tlalnepantla, Edo de México. *Lactobacillus bulgaricus* fue donado por el Laboratorio de Bacteriología de la carrera de Biología.

Condiciones de crecimiento y mantenimiento de *Lactobacillus bulgaricus*

Se resembró *Lactobacillus bulgaricus* en medio Mann Rogosa y Sharpe(MRS) mediante la técnica de estría cruzada. La bacteria fue crecida a 37°C durante 24h y mantenida a 4°C hasta su uso. Cultivos de 24 h fueron utilizados para el ensayo experimental.

Obtención de quitina y fibra de *Acheta domesticus*

Los grillos fueron colocados en un frasco y se anestesiaron con cloroformo hasta causar la muerte. Posteriormente se secaron a 50°C por 24h. Los grillos se pulverizaron en un mortero de porcelana. Estos fueron desengrasados mediante el método soxhelt. La muestra desengrasada se pesó y proceso por separado para obtención de quitina y fibra.

Obtención de quitina

A partir de los grillos secos, molidos y desengrasados se obtuvo la quitina de acuerdo a la metodología descrita por Escobar en el 2013, consistió en tres etapas: desproteinización, desmineralización y purificación.

Fibra cruda

La obtención de la fibra de *Acheta domesticus* fue realizada bajo la metodología descrita por García-Vela en 2005, un proceso de ácido-álcali. La muestra se sumergió en H₂SO₄ al 1.25% hasta ebullición, por 30 min. Permaneció a temperatura ambiente y filtrada al vacío. La fibra se obtuvo con NaOH al 1.25% a 60 °C durante 30 min, después de filtración al vacío y de neutralizar el residuo con agua desionizada, la muestra fue llevada al horno a 60 °C por 30 min.

Preparación del inóculo de *Lactobacillus bulgaricus*

Una colonia de *L. bulgaricus* de un cultivo de 24 h se inoculó en 20 mL de caldo MRS por duplicado, y se mantuvo en baño con agitación constante durante 24 h. Este cultivo sirvió para inocular tubos con caldo MRS con los diferentes tratamientos.

Ensayo prebiótico de quitina y fibra de *Acheta domesticus*

Se utilizaron 18 tubos de ensayo cada uno conteniendo 20 mL de caldo MRS y se formaron siete grupos: 1) 43 mg de fibra, 2) 175 mg de fibra, 3) 65 mg 4) 130 mg de quitina de *A. domesticus* respectivamente, quitosano a 5) 1 mg 6) 2.5 mg, un último grupo 7) caldo MRS libre de prebiótico. Los tubos que contenían los tratamientos fueron inoculados al 10% v/v con cultivo de *Lactobacillus bulgaricus* previamente preparado. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C durante 10 h con agitación continua. Se tomaron alícuotas de 10 mL en intervalos de 1, 2, 4 y 10 h para la evaluación de las variables.

a) Proliferación bacteriana

Se midió la proliferación de *L. bulgaricus* por medio de densidad óptica a 680 nm en un espectrofotómetro de luz visible Spectronic 20.

b) Fermentación de fibra cruda y quitina

Se evaluó el cambio de pH del medio de cultivo durante el experimento, (1, 2, 4 y 10h), con un potenciómetro digital Hanna Instrument.

c) Determinación de productos de la fermentación

Se determinó el contenido de ácido láctico y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por titulación con NaOH 1N utilizando fenolftaleína como indicador (NTC 4978 de 2001; Vinasco *et al.* En 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proliferación de *Lactobacillus bulgaricus* en presencia de fibra y quitina de *Acheta domesticus*

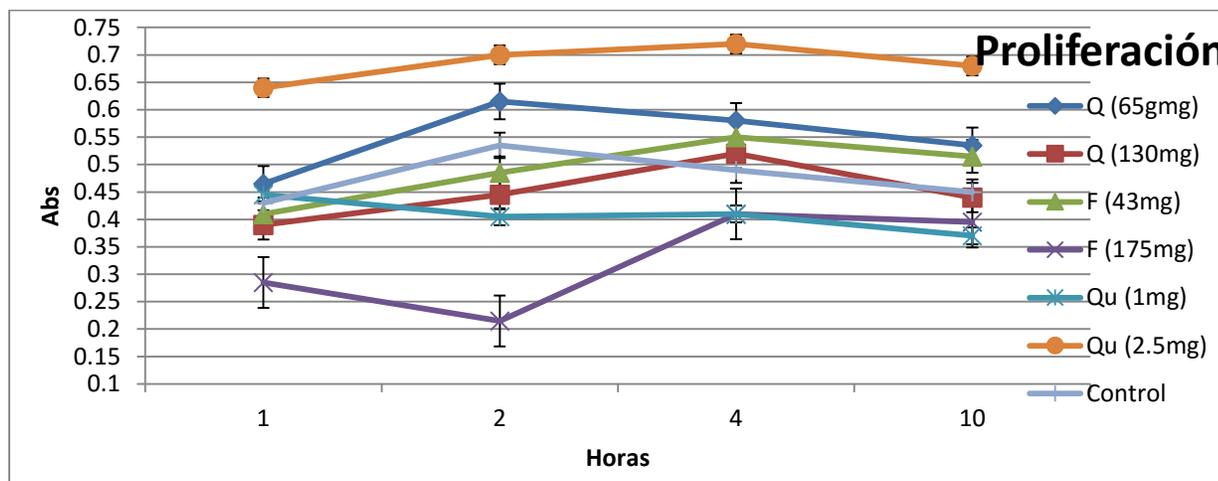


Figura 1. Efecto de quitina (Q) y fibra (F) de *Acheta domesticus*, y quitosano (QU) adicionados al medio MRS en la proliferación de *Lactobacillus bulgaricus* a diferentes tiempos. Los resultados son la media de tres repeticiones $P < 0.05$

La actividad prebiótica se evaluó en *Lactobacillus bulgaricus*, mediante diversos parámetros: proliferación bacteriana y sus productos (ácido láctico y peróxido de hidrógeno) y acidificación del medio. Se pudieron observar diferentes efectos de los parámetros estudiados (Figuras 1-4).

En general, el medio suplementado con quitina en la concentración de 65 mg promovió el mejor crecimiento bacteriano, seguido por quitosano (2.5 mg). La fibra con concentración de 175 mg, fue el tratamiento con la menor proliferación de la bacteria. No hubo diferencias significativas en cuanto a concentraciones en los distintos tratamientos pero sí entre las fuentes de hidratos de carbono (quitina y fibra), esto de acuerdo con una ANOVA de dos factores y una prueba de Tukey $P (0.05)$ (Figura 1).

Para que un ingrediente o alimento pueda considerarse como prebiótico debe cumplir una serie de requisitos entre los que se encuentran; ser fermentado selectivamente por bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal y tener la capacidad de inducir efectos fisiológicos benéficos para la salud. Los carbohidratos no digeribles son de dos tipos, los colónicos (fibra alimentaria) y prebióticos. Estos últimos estimulan el crecimiento selectivo de especies bacterias muy particulares, Bifidobacterias y Lactobacilos. Los resultados obtenidos de proliferación de *L. bulgaricus* en presencia de fibra y quitina del grillo, mostraron el comportamiento típico de crecimiento bacteriano en medio sintético (Figura 1); aumento durante las primeras horas alcanzando su punto máximo entre las 4 y 8 h de fermentación, comenzando su disminución a las 10h y finalmente la muerte (Niño y Torres, 2010).

La estimulación del crecimiento de la bacteria en presencia de quitosano (2.5 mg), quitina (75 mg) y fibra (43 mg) fue evidentemente superior que los cultivos que solo crecieron en el medio sintético MRS. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Fernández *et al.*, (2012), quienes reportan que los quitosanos no favorecieron el crecimiento de *L. acidophilus*, ésta diferencia puede deberse a diversos aspectos, entre ellos, las altas concentraciones que utilizaron de quitosano (10, 100 y 100 mg/L) y su origen, la técnica de monitoreo del crecimiento y la especie de bacteria prebiótica. El efecto prebiótico de quitosano y en específico de la quitina y fibra de *A. domesticus*, ha sido poco estudiada y

controversial, el presente trabajo hace una aportación importante sobre el efecto prebiótico de los dos hidratos de carbono probados sobre *L. bulgaricus*.

Cambios de pH durante la fermentación

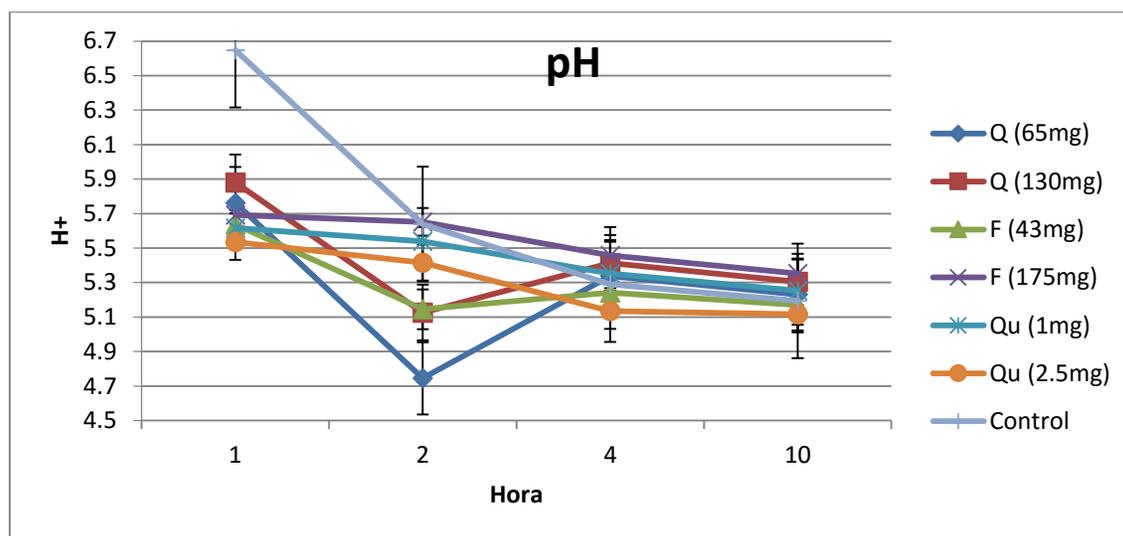


Figura 2. Cambios de pH en el medio MRS suplementado con quitina (Q) y fibra (F) *Acheta domesticus*, quitosano (Qu) y testigo, durante la fermentación de *Lactobacillus bulgaricus* P (0.05).

Con respecto al pH, en la Figura 2 puede observarse que el mayor descenso lo presentó el medio de cultivo que tenía como sustrato quitina (65 mg), seguido por el de fibra (43 mg). En el cultivo con fibra (175 mg) no se observaron cambios en el pH. De acuerdo a los estadísticos obtenidos P (0.05) no hubo diferencia significativa.

Los resultados obtenidos de los valores de pH muestran la acidificación del medio en el transcurso de la fermentación, como era lo esperado. Esto evidencia, la producción de ciertos compuestos ácidos, como pueden ser ácido láctico y ácido acético, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la concentración de ácido láctico (Figura 2). Los valores de pH registrados en el cultivo de *L. bulgaricus*, estuvieron en promedio de 5 lo que coincide con lo descrito por Rondón-Huerta *et al.*, en 2011, señalan que el rango óptimo de pH para el crecimiento de la bacteria debe ser de 5-6.

Por otra parte, cabe señalar que el no observarse diferencias en el pH de las fermentaciones en relación al crecimiento de *L. bulgaricus* desarrollada en caldo MRS suplementado con quitosano, quitina y fibra, respectivamente, explica el aumento en la proliferación bacteriana y se confirma el efecto prebiótico, pues a valores de pH 5, el crecimiento se inhibe, de acuerdo con lo reportado por Jakimec *et al.* (2001). El valor de pH está íntimamente relacionado con la producción de ácidos orgánicos, lo que se refleja en el de contenido ácido láctico como se verá más adelante.

Otro parámetro importante durante la fermentación de fibra, quitina y quitosano es el descenso del pH en el medio de crecimiento como consecuencia de la producción de ácidos orgánicos de cadena corta. Las concentraciones de ácido láctico y peróxido de hidrógeno se muestran en las figuras 3 y 4 respectivamente.

Producción de ácido láctico por *L. bulgaricus*

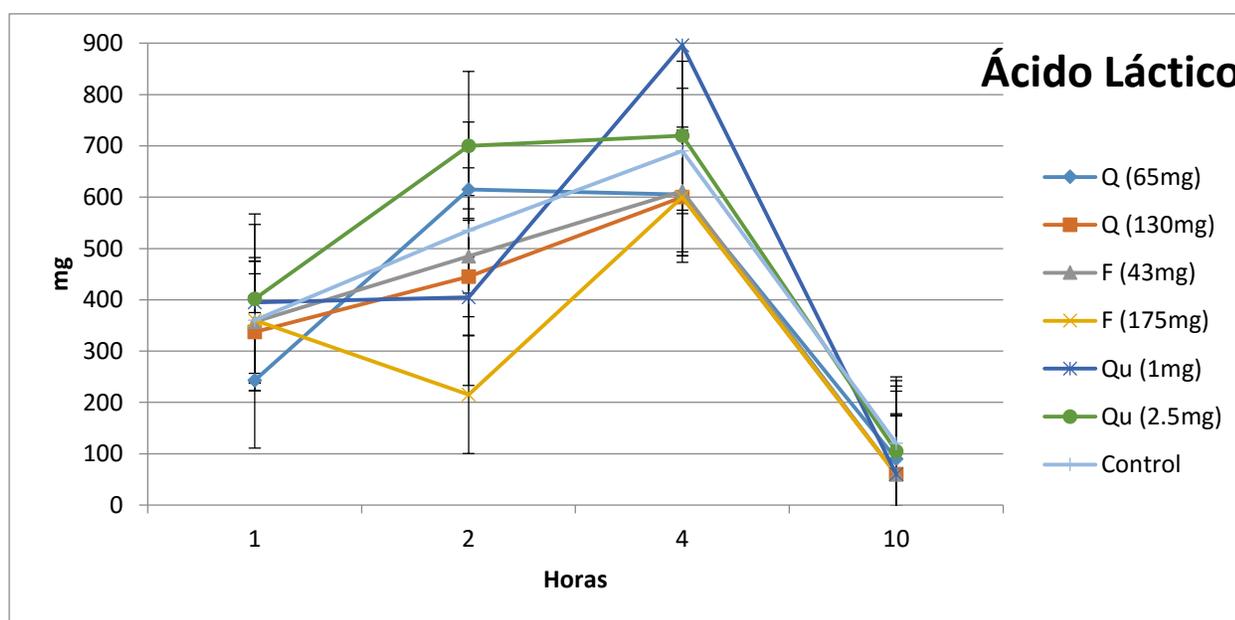


Figura 3. Efecto de quitina (Q) y fibra (F) de *Acheta domesticus*, quitosano (Qu) y testigo en la producción de ácido láctico con respecto al tiempo por *Lactobacillus bulgaricus*. $P (0.05)$.

Los cultivos a los que se les adicionó 65 mg de quitina, produjeron a las 4h la mayor concentración de ácido láctico (Figura 3), *L. bulgaricus* en presencia de fibra (175 mg) mostró una producción menor. Todos cultivos a las 10 h presentaron la menor concentración del ácido. La producción de ácido láctico es inversamente proporcional a los valores de pH, a medida que concentración de ácido láctico incrementa, el valor de pH disminuye, a las 10 h de fermentación el ácido láctico disminuyó abruptamente, no así el pH, hecho que no se explica.

Las concentraciones de ácido láctico en g, son mayores a los obtenidos por Ruiz y Ramírez en 2009 para *L. bulgaricus*, lo que reafirma el carácter prebiótico de los carbohidratos ensayados, es justo decir que los autores utilizaron como sustrato leche pasteurizada y un menor inóculo bacteriano.

La acumulación de ácidos orgánicos producidos por bacterias ácido lácticas, reduce el pH del medio con un efecto inhibitorio de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de un valor de pH relativamente bajo a diferencia de otros grupos microbianos con metabolismo respiratorio, pues poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía (Urrego *et al.*, 2005; Vázquez *et al.*, 2009). Sería interesante evaluar el efecto bactericida de los productos de fermentación de *L. bulgaricus* desarrollada con quitina y fibra cruda de *A. domesticus*, principalmente de quitina que es un campo fértil.

De las escasas investigaciones sobre el efecto bactericida de quitina está el realizado por Abdel-Raham *et al.*, (2015), quienes reportan el aumento de la actividad antibacteriana en *Escherichia coli* con relación a la concentración de quitina, sin embargo la velocidad de reducción es muy baja. Los autores mencionan, que el efecto bactericida está ligado a la pureza de la molécula, entre más grupos aminos menor actividad. Ésta característica no se evaluó en el presente estudio, aunque al desproteínizar la muestra, se destruyen los enlaces químicos covalentes entre los complejos proteína-quitina. El

tratamiento alcalino con hidróxido de sodio permite eliminar proteínas, lípidos y pigmentos. Es importante considerar la pureza de las biomoléculas, puesto que influyen en las propiedades del producto.

Producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por *L. bulgaricus*

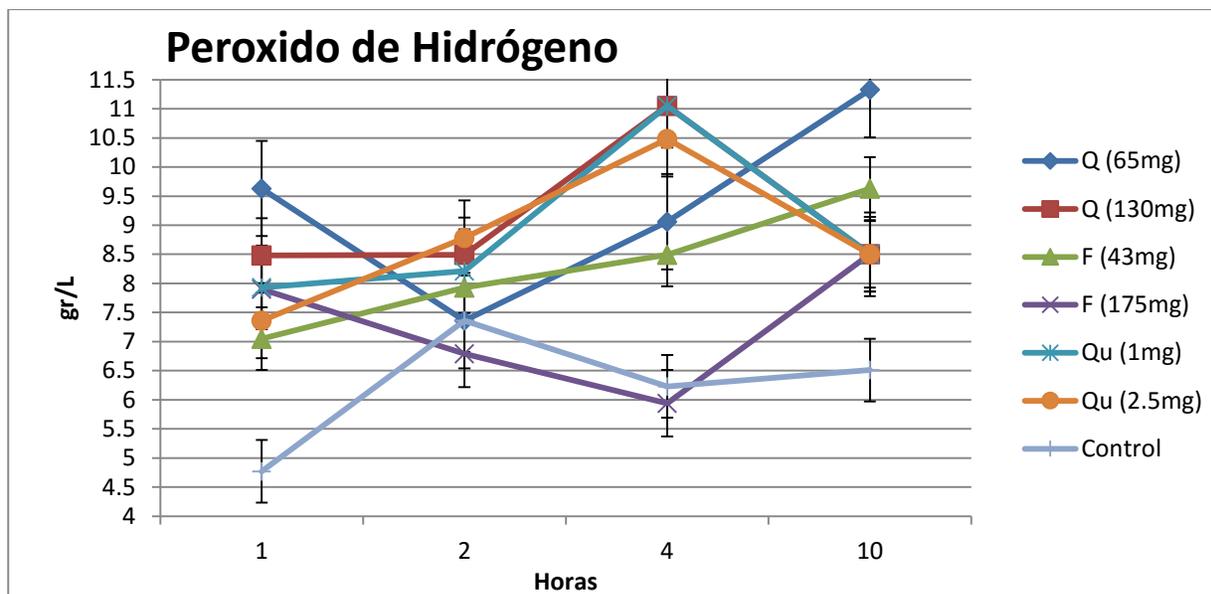


Figura 4. Efecto de quitina (Q), fibra (F) de *Acheta domestica* y quitosano (QU) en la producción de H_2O_2 en *Lactobacillus bulgaricus* a diferentes tiempos P (0.05).

Las Bifidobacterias y Lactobacilos producen compuestos orgánicos como mecanismo para inhibir microorganismos patógenos, como aniones superóxido, radicales libres y peróxido (H_2O_2) debido a su carácter fuertemente oxidante es un agente antimicrobiano. El efecto inhibitorio de microorganismos patógenos por H_2O_2 , producido por bacterias probióticas ha sido comprobado (Straus *et al.*, 2002; Pérez-Leonard, 2007). Los resultados en la Fig. 4 muestran un incremento de H_2O_2 a las diferentes horas de fermentación de *L. bulgaricus* en presencia de las dos concentraciones de quitina y fibra en la concentración más baja, observándose un comportamiento lineal en la producción de H_2O_2 . Con base en el análisis estadístico, solo existen diferencias significativas entre concentraciones, siendo quitina a la concentración 65 mg, la que promueve una mayor producción H_2O_2 .

La fibra y quitina de *A. domestica* promovieron una mayor producción de H_2O_2 en comparación con quitina. Resulta lógico pensar que, a mayor producción de H_2O_2 se presentará un incremento en la proliferación de *L. bulgaricus*, relación que no se cumplió con los datos obtenidos (Figura 1 y 2). La acumulación del H_2O_2 en los medios de cultivo, se debe a que las bacterias ácido lácticas, en general no poseen la enzima catalasa (Requena *et al.*, 1995), lo que ocasiona la saturación del medio con H_2O_2 y por tanto un efecto bacteriostático o bactericida, a este efecto "auto-inhibitorio" El estudio de producción y efecto inhibitorio de este ácido es todavía el menos estudiado de todos los productos metabólicos de las bacterias ácido lácticas. Se puede observar que la producción del peróxido de oxígeno fue alto y seguía en aumento a las 10h, por lo que el estudiar la producción con un mayor tiempo de fermentación sería importante, así como evaluar el efecto inhibitorio en bacterias patógenas.

CONCLUSIONES

El presente trabajo es el primer intento en México de investigar las propiedades prebióticas de quitina y fibra de *Acheta domesticus* o grillo domesticus. La quitina y fibra de *A. domesticus* tuvieron un efecto similar al del quitosano sobre *Lactobacillus bulgaricus*, promoviendo la proliferación, disminución de pH, el incremento de ácido láctico y H₂O₂. La quitina a 65 mg presentó un mayor efecto prebiótico. Con los resultados obtenidos se demuestra el efecto prebiótico de quitina y fibra cruda de *A. domesticus* sobre *L. bulgaricus*, bajo las condiciones aquí estudiadas.

AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestro agradecimiento al maestro en ciencias de la comunicación Erick B. Suaste Molina por la revisión del escrito. Al Dr. Víctor Salazar por la asesoría en el análisis estadístico.

REFERENCIAS

- Alvarez-Olmos M., Oberhelman, R. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32: 1567–1576.
- Amores R., Calvo A., Maestre J., Martínez-Hernández D. (2004). Revisión Probióticos. *Rev Esp Quimioterap*, 17: 131–139.
- Angelo M. P., Katsiki N., Dragana N., Khalid Al-Rasadi, Rizzo M. (2015). Nutraceuticals in Lipid-Lowering Treatment: A Narrative Review on the Role of Chitosan. *Angiology*, 66: 416-421.
- Batdorj B., Trinetta V., Dalgalarondo M., Prévost H., Dousset X., Ivanova I., Haertlé T, Chobert JM.(2007). Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens: *J Appl Microbiol*, 103: 584-93.
- Bindels L. B., Neyrinck A. M., Salazar N., Taminiau B., Druart C., Muccioli G. G., François E., Blecker ., Richel A, Daube G., Mahillon J., de Los Reyes-Gavilán C.G., Cani P. D., Delzenne N. M. (2015), Non Digestible Oligosaccharides Modulate the Gut Microbiota to Control the Development of Leukemia and Associated Ca.chexia in Mice. *PLoS One*, 10: 1-16.
- CorzoJ N., Alonso L., Azpiroz F., Calvo M. A., Cirici M., Leis R., Lombó F., Mateos I., Plou F. J., Ruas P., Rúperez P., Redondo A., Sanz M. L. y A. Clemen. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutr Hosp*, 31: 99-118.
- Costabile A., Walton G. E., Tzortzis G., Vulevic J., Charalampopoulos D., Gibson G. R. (2015).Development of a bread delivery vehicle for dietary prebiotics to enhance food functionality targeted at those with metabolic syndrome. *Gut Microbes*. 22: 4-9.
- De Gregorio PR, Juárez Tomás MS, Leccese T MC, Nader-Macías ME. (2014). In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. *J Med Microbiol*, 63: 685-96.
- Escobar D., Ossa C., Quintana M., Ospina W. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica*, 18: 260-266.
- García-Vera W., Pezo C. D., San-Martín H. F. (2005). Manual Técnico Alpaquero. Imprenta Amauta, p. 9.0

- Geurts L., Neyrinck A.M, Delzenne N.M, Knauf C., Cani P.D. (2014). Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Beneficial Microbes*, 5: 3-17.
- Gortari M. C., Hours R. A. (2013). Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16: 1-18.
- Guarner F., Requena T. (2010). Consensus Statements from the Workshop “Probiotic and health: Scientific evidence”. *Nutrición hospitalaria*, 25: 700-704.
- Jakymec M, Morán H, Paéz G, Ferrer J.R, Mármol Z, y Ramones E. (2001). Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. *Revista científica FCV-LUZ*, 11: 53-59.
- Koga R, García F, Carcelén F, Arbaiza T. (1999). Valor Nutricional del *Gryllus peruviansis* (orthoptera: grillidae). *Rev Inves Vet Perú*, 10: 92-94.
- Onumpai C, Kolda S, Bonnin E, Rastall RA. (2011). Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures. *Appl Environ Microbiol*, 77: 5747-54.
- Ortiz U. (2010). Propiedades físicas, mecánicas, y Bioensayo con *Sitophilus oryzae* de películas comestibles de almidón con probióticos, prebióticos y omega. Tesis de licenciatura, Universidad Central de Venezuela Facultad de Ciencias Escuela de Biología.
- Pérez J. (2008). Alimentos no convencionales resumen. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores Zaragoza.
- Pérez-Leonard H. (2007). Lactobacillus Probióticos: Sustancias Naturales Bioactivas para la Prevención de Infecciones Urogenitales. *Biotecnología*, 10: 6-13.
- Ramos-Comenzana A., Monteoliva S., Nader M. (2012). Probióticos y salud. 1ª Ed. Ediciones Díaz de Santos. Madrid.
- Ramos-Elorduy J., Pino M., Cuevas S. (1998). Insectos comestibles del estado de México y determinación de su valor nutritivo. Anales Del Instituto de Biología Universidad Autónoma de México, Serie Zoología.
- Rasha M. Abdel Rahmana, Radim Hrdinaa, A.M. Abdel-Mohsenb, Moustafa M.G. Foudac,e, A.Y. Solimand, F.K. Mohamedd, Kazi Mohsinf, Tiago Dinis Pintog. (2015). Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. *In J Biol Macromol*, 80: 107-120.
- Reig A., Anesto J. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Rev Cub Al Nut*, 16: 63-68.
- Rendón-Huerta J. A., Juárez-Flores B. I., Pinos-Rodríguez J. M., Aguirre-Rivera J. R., Delgado-Portales R. E. (2011). Effects of different kind of fructans on in vitro growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis*. *A J Microbiol Res*, 52706-2710.
- Requenat T., Pelaez C. (1995). Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Rev Esp Cienc Tecnol AI*, 35 (1): 19-44.
- Rochat T1, Gratadoux JJ, Gruss A, Corthier G, Maguin E, Langella P, van de Guchte M. (2006). Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. *Appl Environ Microbiol*, 72(8):5143-9.
- Salazar B., Oi Montoya. (2009). “Importancia de Los Probióticos Y Prebióticos En La Salud Humana”. *Vitae*, 10: 20-26.

Sastre G. A. (2003). Fibra y prebióticos: conceptos y perspectivas. *Gastroenterol Hepatol*, 26: 6-12.

Strus M, Malinowska, Heczko PB. (2002). In vitro antagonistic effect of *Lactobacillus* on organisms associated with bacterial vaginosis. *J. Reprod. Med*, 47: 41-46.

Urrego M., Cadavid L. (2005). Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y reológica, de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte de carne de res (Huevo de Solomo). Trabajo de grado Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín – Colombia.

Vinasco J. A., Jaramillo D. B., Betancourt R. (2007). Valoraciones Redox: Permanganometría. Recuperado el 27 de Junio del 2015, de <http://es.scribd.com/doc/504241/informe-permanganometria#scribd>