



Instituto Politécnico Nacional

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.

REPORTE FINAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Producción de probióticos y bacteriocinas a partir de desechos agrícolas.

CLAVE SIP: 20060648

PROYECTO FINANCIADO POR:
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL IPN

	PARTICIPANTES
Director de Proyecto	Dr. Alejandro Olmos Dichara
Investigador participante	M. en C. Manuel Muñoz Aguilar
Investigador participante	Dr. Enrique Durán Páramo
Investigador participante	Dr. Carlos Vázquez Salinas
Investigador participante	Dra. Margarita Salazar González
Investigador participante	M. en C. Elsa Irma Quiñones Ramírez
Alumno proyecto terminal	Oscar Cabrera Ordoñez

Enero, 2007

RESUMEN

A partir de muestras de diferentes tipos de hortalizas (col, coliflor, brócoli, alcachofa y col de bruselas) obtenidos de la Central de Abastos de Iztapalapa, se realizó el aislamiento de BAL. Se obtuvieron 141 cepas, de las cuales sólo 46 mostraban las características morfológicas y bioquímicas de las bacterias lácticas que son: Oxidasa (negativa), catalasa (negativa), tinción de Gram (positiva), glucosa (positiva) y movilidad (negativa). De estas 46 cepas, mediante la prueba de pocitos, se obtuvieron 19 cepas que inhibieron por lo menos a una de las bacterias testigos patógenas (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*), de las cuales, sólo 3 producen una sustancia que actúa como bacteriocina e inhibe a la mayoría de las bacterias patógenas.

INTRODUCCIÓN

La flora intestinal es una comunidad interactiva de organismos con funciones específicas para mantener el estado de salud. Las principales funciones de la flora intestinal son: limitar el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos en el intestino e interactuar con substratos no absorbidos de la dieta. Sin embargo, la flora intestinal es vulnerable a determinadas condiciones (1).

Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero. Una vez que los probióticos son ingeridos ocurren cambios en la microflora intestinal que repercuten positivamente en el estado de salud del consumidor (1).

Para que un probiótico sea ideal debe sobrevivir al tracto gastrointestinal. Llegando intacto al intestino se aloja allí para lo que necesita tener la propiedad de adherencia al epitelio para poder colonizarse y así aumentar la acidez, lo que impide que se desarrollen bacterias que provocan enfermedad y por sobre todas las cosas, debe ser inocuo (2). En la mayoría, los probióticos son bacterias ácido lácticas, que constituyen un importante porcentaje de la flora autóctona del intestino humano (1).

En 1989 Fuller define de esta manera el término probiótico: "Complemento alimenticio a base de microorganismos vivos y vitales que produce efectos beneficiosos sobre el organismo animal, mejorando el equilibrio microbiano intestinal" (2).

Algunos efectos investigados de los Probióticos son los siguientes:

- Producción y aumento en la biodisponibilidad de vitaminas B1 - B2 - B6 – B12, niacina, biotina, ácidofólico, ácido pantoténico.
- Mayor biodisponibilidad de minerales como el calcio, hierro, cobre, zinc, y magnesio en alimentos con adición de probióticos.
- A través de diferentes mecanismos presentan actividad antimicrobiana.

- Efectos hipocolesterolémicos.
- Se ha observado en estudios realizados en animales, una inhibición en el crecimiento tumoral, o una eliminación total, y la hipótesis plantea que esto se da porque hay acciones sobre el sistema inmune.
- La producción de ácidos que provocan los Probióticos estimulan el peristaltismo intestinal reduciendo el tiempo de tránsito de las heces, por lo tanto se consideran útiles para la profilaxis y tratamiento de disturbios intestinales (3).

Entre las bacterias probióticas mas utilizadas para el consumo humano se encuentran las llamadas bacterias ácido lácticas (BAL), que incluyen a las siguientes: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei* spp *rhannosus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis* spp *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre otros (5).

Algunos ejemplos de Alimentos Funcionales que se pueden encontrar en el mercado son:

- Yogurt Yogurísimo con Probio 2
- Yogurt La Serenísima con GG
- Queso Ilolay Vita
- Leche fermentada Yakult

Recordemos que dichos productos son algunos, entre otros, de los que equilibran la flora intestinal, protegiéndola de bacterias nocivas y de toxinas, como así también, refuerzan las defensas naturales (4).

Características de las bacterias probióticas:

Las especies y las bacterias que se pueden utilizar en medicina clínica como probióticos se seleccionan en base a una serie de requisitos que éstas deben poseer. Encontrar microorganismos verdaderamente activos, vitales y eficaces lleva muchos años de investigación; con el fin de encontrar bacterias cada vez más seguras y eficaces.

En particular hay que considerar:

- La seguridad biológica: no deben causar infecciones de órganos o de sistemas;
- La capacidad de ser toleradas por el sistema inmunitario del organismo huésped, y, por lo tanto, deben ser preferiblemente de proveniencia intestinal;
- La capacidad de resistir la acción de los ácidos gástricos y de las sales biliares para llegar vivas en grandes cantidades al intestino;
- La capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal y de colonizar el segmento gastrointestinal;
- La sinergia con la microflora endógena normal;

- El efecto barrera: este término define la capacidad de producir sustancias que tengan una acción trófica sobre el epitelio de la mucosa intestinal;
- La capacidad de potenciar las defensas inmunitarias del huésped.

Bacteriocinas

Los microorganismos poseen distintas formas para competir en su ambiente, una de ellas es la producción de sustancias antagónicas. Entre estas se incluyen antibióticos clásicos, algunos productos del metabolismo, agentes líticos, numerosos tipos de exotoxinas proteicas y bacteriocinas. La diversidad de estas sustancias inhibitorias es muy grande y muchas bacteriocinas han sido identificadas. No obstante, los orígenes evolutivos y la función que desempeñan en la mediación de las interacciones microbianas son aun poco conocidos.

Las bacteriocinas son definidas como proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora. En la naturaleza existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias. Se piensa que el 99% de todas las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas (5).

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios.

Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina, y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos (1).

La producción de algunas bacteriocinas puede ser favorecida bajo ciertas condiciones de crecimiento. Por ejemplo las condiciones de cultivo, como son la temperatura, el pH y el tiempo de incubación, influyen fuertemente en la producción de bacteriocinas activas. Las condiciones óptimas de producción deben ser determinadas para cada organismo productor. La composición del medio de crecimiento también afecta grandemente a la producción de bacteriocinas (8).

Clasificación de las bacteriocinas.

Clasificación propuesta por Ness en 1996 en base a las características bioquímicas y genéticas:

Clase I.- Lantibióticos.- Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, β -metil-lantionina y

dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción.

Clase II.- No lantibióticos.- Son bacteriocinas de peso molecular variable, que contienen aminoácidos regulares. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

- Clase IIa.- Son péptidos activos contra *Listeria*.
- Clase IIb.- Son formadores de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana.
- Clase IIc.- péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. Se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III.- Son péptidos grandes mayores de 30 kDa, en esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B (1).

Modo de acción

Es posible que las clases I y II de las bacteriocinas compartan mecanismos de acción semejantes. Los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual esta influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos. La fuerza motriz de protones juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular (1).

Aplicación de bacteriocinas:

Aplicaciones en alimentos.

Las BAL han sido usadas por siglos para comidas fermentadas, ellas son generalmente consideradas como seguras por la FDA (Food and Drug Administration) de USA. Esto permite su uso en la fermentación de alimentos sin una aprobación adicional. La nisina fue la primer bacteriocina en ser aislada y aprobada para ser usada en alimentos, específicamente para prevenir el brote de esporas de *Clostridium botulinum* en quesos distribuidos en Inglaterra (7).

Las bacteriocinas también han sido usadas en carne curada, leche, queso y pasta de soya. Se ha desarrollado gelatina de pediodicina, una bacteriocina de clase IIa hecha por bacterias productoras de ácido láctico, que protegen a los hot-dogs de la contaminación bacteriana. Otro ejemplo de una bacteriocina que podría usarse en la industria alimenticia es la piscicolina, una bacteriocina de otra bacteria productora de

ácido láctico. La piscicolina ya ha sido patentada y pronto será usada en productos de carne y para lavar ensaladas verdes (8).

Aplicaciones biomédicas.

Aunque en la medicina veterinaria se han usado tradicionalmente los antibióticos para el tratamiento profiláctico y terapéutico, las bacteriocinas ofrecen un tratamiento alternativo que puede tener algunas ventajas.

La idea de usar bacteriocinas en el área de veterinaria surgió en los años 40's. Desde entonces la nisina fue evaluada como una alternativa en el tratamiento de mastitis. Ha sido demostrado recientemente que la nisina es inhibitoria de los principales patógenos Gram-positivos involucrados en la mastitis como cepas de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* (8).

JUSTIFICACIÓN

Ya que la cantidad de desechos orgánicos en la central de abastos es demasiada se desea utilizar algunos de estos desechos (col y coliflor) para la obtención de algunos microorganismos que serán aislados e identificados para ver cuales podrán ser utilizados como probióticos y productores de bacteriocinas.

Se desea la obtención de probióticos ya que producen beneficios al hospedero, ya que estos microorganismos son parte de la flora intestinal, lo que produce cierta influencia positiva hacia la salud; por ello estos microorganismos son empleados tanto en la industria alimenticia como en la farmacéutica.

El uso de las bacteriocinas en la industria alimenticia como conservadores biológicos es de gran importancia, así como su uso en el sector salud para el tratamiento de infecciones urinarias, vaginales y diarreicas.

OBJETIVO GENERAL:

Aislar y seleccionar de bacterias lácticas a partir de desechos agrícolas para la producción de probióticos y bacteriocinas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Evaluar las poblaciones microbianas presentes en los desechos de col y coliflor.
- Aislar e identificar de las bacterias lácticas aisladas.
- Evaluar la actividad inhibitoria de sustancias producidas por las bacterias lácticas sobre cepas conocidas.
- Producir biomasa mediante cultivo en lote.

DESARROLLO:



Determinación de Actividad antimicrobiana



Producción de biomasa y bacteriocina



MATERIALES Y MÉTODOS

Las hortalizas para el aislamiento de las bacterias lácticas, fueron recolectadas en la Central de Abastos ubicada en Iztapalapa, se transportaron las muestras por separado en bolsas de polietileno y se transportó al laboratorio para su procesamiento.

Tabla 1. Muestras analizadas y procesadas para el aislamiento de Bacterias Lácticas.

MUESTRAS ANALIZADAS	
TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE MUESTRAS
Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>)	6
Brócoli (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)	6
Col (<i>Brassica oleracea</i> var <i>viridis</i> .)	6
Col de Brucela (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>)	6
Coliflor (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>)	6

Tabla 2. Cepas testigos que se utilizarón en el desarrollo de la metodología.

Cepas Testigo
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728
<i>Candida albicans</i> ATCC 1031
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314

AISLAMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS A PARTIR DE HORTALIZAS.

1. Se pesaron 50 gramos de la muestra.
2. Se lavaron por frotación con 450 mL de agua peptonada amortiguada para tener la dilución 10^{-1} .
3. Se realizaron las diluciones decimales hasta 10^{-3} .
4. Se inocularon con 0.1 mL de cada dilución y se sembraron por dispersión en superficie en medio APN (Agar actidiona-polimixina).
5. Dejamos absorber el inóculo en el medio de cultivo el cual se incubo a 30°C por 72 horas en atmósfera parcial (CO_2 , 5%).
6. Se seleccionaron colonias de morfología diferente y se resembraron en agar MRS (Man-Rogosa-Sharpe).
7. Se incubaron a 37°C durante 24 h en atmósfera parcial (CO_2 , 5%).

Las colonias obtenidas como presuntivas se les hizo catalasa, oxidasa y tinción de Gram, la identificación de las bacterias ácido láctica se hizo mediante las pruebas bioquímicas convencionales.

IDENTIFICACIÓN

1. Cada una de las colonias que tuvieron morfología colonial característica se sembraron en placas con agar MRS y se incubaron a 37°C por 24 horas, en atmósfera parcial (CO₂, 5%).
2. Se sembraron bioquímicas que nos ayudaron a identificar a dichas Bacterias Lácticas (Tinción de Gram, oxidasa catalasa, indol, movilidad, of, bilis, esculina) (10).
3. Después se les realizara la identificación mediante la Galería API 50 CHL.

INHIBICIÓN ANTAGÓNICA

Tabla 3. Cepas testigos que se utilizaron para la inhibición.

Cepas Testigo
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728
<i>Candida albicans</i> ATCC 1031
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC

Esta es una técnica que se utilizará para elegir a las cepas que se hará la técnica de producción de bacteriocinas en medio líquido:

1. Se inoculó 1ml de una suspensión de las cepas ATCC mencionadas en la tabla 3, en un tubo de agar MRS fundido y conservado aproximadamente a 45°C, homogenizar.
2. Dicha mezcla se vació en cajas de petri estéril, se rotó para extender y se dejó solidificar.
3. Después se sembró una estría delgada de cada una de las cepas de BAL a probar.
4. El tiempo de incubación fue a 37°C durante 24 hrs en tensión de CO₂ (5%).
5. Se observó el crecimiento de cada una de las cepas, así como la inhibición que presentó.

ESPECTRO ANTIMICROBIANO

1) Producción de bacteriocinas en medio líquido

1. Cada una de las cepas de bacterias lácticas se inocularon al 2% en tubos de caldo MRS.
2. Se incubó a 37° C Durante 24 h en una atmósfera parcial de CO₂
3. Se centrifugaron los cultivos a 3500 rpm por 5 min.
4. El sobrenadante se recolectó en viales estériles
5. Se les ajustó el pH a 7 con NaOH 0.1 N.
6. Se esterilizaron mediante una jeringa acoplada a un porta filtros equipado con una membrana de nitrocelulosa estéril con poro de 0.45 µm.

7. Se recolectaron los filtrados en viales estériles.

RETO ANTIMICROBIANO

TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN POCILLOS

Se emplearon cepas testigos (ver tabla 3). Las cuales fueron cultivadas en matraces con 150 ml de caldo BHI a 37° C por 24 h.

1. En cajas Petri se vaciaron 20 ml de agar Mueller-Hinton para formar la base y se dejó solidificar.
2. En tubos con 10 ml de agar blando, fundido y mantenido a 45° C se adicionó la cepa testigo a probar ajustando su concentración bacteriana a 3×10^8 UFC/ml.
3. Se mezcló y vació el contenido de los tubos sobre las placas, dejándose solidificar.
4. Se colocaron las torres de acero inoxidable en cada caja de petri.
5. Se adicionaron 200 µl de cada uno de los sobrenadantes crudos y neutralizados obtenidos en el inciso " 1) " .
6. Se incubó a 37° C. Durante 24 h en una atmósfera parcial (CO₂, 5%).
7. Se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de cada una de las cepas testigo.

RESULTADOS

Se analizaron 30 muestras de las cuales se lograron aislar 141 cepas, solo 46 muestran características de las bacterias lácticas: catalasa(-), oxidasa(-), tinción de Gram(+), movilidad(-), indol(-), fermentación(+), hidrólisis de esculina(+) y tolerancia a bilis(+); para obtener los resultados presentados en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados obtenidos para el aislamiento de BAL, para cada uno de los alimentos procesados.

MUESTRAS		AISLADOS
MUESTRA	ANALIZADAS	CEPAS OBTENIDAS
Alcachofa	6	10
Brócoli	6	13
Col	6	1
Col de Brusela	6	12
Coliflor	6	10
TOTAL	30	46

Posteriormente a estas cepas se les realizo una inhibición antagónica con las cepas testigos (ver tabla 3) trayendo como resultado la siguiente tabla (tabla 5).

Tabla 5. Cepas que inhibieron a las cepas testigos por antagonismo.

Inhibición antagónica					
Muestra	cepas obtenidas	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Alcachofa	10	1	0	2	3
Brócoli	13	1	0	2	5
Col	1	0	0	0	0
Col de Brucella	12	2	2	1	2
Coliflor	10	2	1	3	4
Total	46	6	3	8	14

A estas cepas que inhibieron por antagonismo se les realizo la técnica de pocillos para ver si existía inhibición por producción de algún metabolito extracelular (posible bacteriocina) contra los mismos microorganismos (ver tabla 3), y se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 6. Cepas que inhibieron a las cepas testigos por posible bacteriocina.

Inhibición por posible Bacteriocina				
Muestra	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Alcachofa	1	0	1	1
Brócoli	1	0	1	2
Col	0	0	0	0
Col de Brusela	2	1	0	1
Coliflor	2	0	0	1
Total	6	1	2	5

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente el gran interés de las BAL como parte de los microorganismos conocidos como probióticos ha sido muy importante en los últimos años, ya que estos microorganismos vivos al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero (Schrezenmeir & Vrese. 2001). Las BAL han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos ya que, se encuentran en productos como leches fermentadas, yogurt, jocoque, quesos madurados, productos cárnicos y en algunas hortalizas. En general puede afirmarse que las bacterias lácticas son muy exigentes en cuanto a la nutrición se refiere. Todas fermentan la glucosa, algunas no fermentan la sacarosa, otras no atacan la lactosa, las pentosas o las dextrinas (9).

Se trabajaron con un total de 30 muestras, aislándose BAL en todas ellas.

En total, se obtuvieron 141 cepas, de las cuales solo 46 mostraban las características morfológicas y bioquímicas de las bacterias lácticas que son: Oxidasa (negativa), catalasa (negativa), tinción de Gram (positiva), glucosa (positiva) y movilidad (negativa). Las bacterias lácticas obtenidas de cada una de las fuentes fueron las siguientes (%): Alcachofa 21,7%, col 2,2%, coliflor 21,7%, brócoli 28,3% y col de Brusela 26,1%.

Se encontró que el brócoli es la mejor fuente de aislamiento para las BAL ya que en esta hortaliza se pudieron aislar la mayor cantidad de cepas que corresponden a las características de las BAL, mientras que en la col se creía que se obtendría una gran cantidad de BAL ya que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de estos microorganismos así como proporciona cierta condición de anaerobiosis, propiciando el crecimiento de las BAL, pero la col proporciono la menor cantidad de BAL, suponemos que esto es porque la hortaliza contiene hojas que la envuelven propiciando una protección para esta hortaliza impidiendo que los microorganismos puedan infectarla.

Como se puede ver en la tabla 5 y 6 se pusieron a diferentes cepas testigos, para ver si nuestras BAL así como su bacteriocina podrían inhibirlas, por lo que se pudo observar que 6 cepas inhibieron a *Listeria monocytogenes* de las cuales las 6 producen una bacteriocina que inhiben a esta cepa testigo, en el caso de *Candida albicans* se obtuvo que solo 3 cepas la inhibían, de las cuales 2 la inhibieron por competencia (antagonismo) ya que solo una de estas 3 cepas produce una bacteriocina eficaz contra *Candida albicans*, mientras que con *Staphylococcus aureus* se obtuvieron 8 cepas que la inhibieron, de las cuales solo 2 la inhibieron por que producían una bacteriocina que era eficaz contra este microorganismos, mientras que las otras 6 la inhibieron por antagonismo. Con *Escherichia coli* se obtuvieron que 14 cepas la pudieron inhibir, de las cuales 9 eran por antagonismo y las otras 5 producían una bacteriocina eficaz contra esta cepa testigo.

Se obtuvieron 19 cepas que inhibieron por lo menos a una de las bacterias testigos, de las cuales solo 9 producen una sustancia que actúa como bacteriocina. A demás se encontró que la cepa que produce a la presunta bacteriocina con mayor eficacia es obtenida de alcachofa, pero la hortaliza que sirve como fuente de aislamiento de BAL que pueden inhibir ya sea por antagonismo o por la producción de bacteriocina es la Coliflor siguiéndole el Brócoli, pero se obtuvo que la mayor cantidad de cepas que producían bacteriocina provienen de Brócoli y de Col de Brucella.

CONCLUSIONES

Las hortalizas son:

- Un ambiente adecuado para el crecimiento de muchos microorganismos.
- Una gran fuente de aislamiento de las BAL.
- La hortaliza que podría emplearse para la formulación de un medio es el Brócoli.
- La cepa que produce a la bacteriocina con mayor eficacia es obtenida de alcachofa.
- Las BAL serán empleadas para la producción de biomasa y bacteriocinas.
- Las BAL son de interés biotecnológico, alimenticio y farmacéutico.

IMPACTO

En el presente estudio se realizó el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de desechos agrícolas de hortalizas. Las cepas aisladas presentan un uso potencial para la industria agroalimentaria y del sector salud, debido a la producción de bacteriocinas y ácido láctico. Asimismo, se le da un valor agregado a estos desechos agrícolas, ya que pueden ser utilizados para la producción de probióticos.]

BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Edelia G. M., Marivel G. T., Zacarias J. S., BACTERIOCINAS DE PROBIÓTICOS, Revista Salud Publica y Nutricion. Revista en línea: <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>.
- 2) Portal de alimentos, Alimentos funcionales, Copyright 2004 - 2006. Buenos Aires – Argentina, En línea: <http://www.portalalimentos.com.ar/salud/funcionales.php>.
- 3) Cagigas Reig AL. (2002). Prebióticos y probióticos: una relación beneficiosa. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 16(1):63-8.
- 4) Nutrar el portal de la alimentación. Revista en línea <http://www.nutrar.com/detalle.asp?ID=569>.
- 5) Farnworth ER. (2001). Probiotics and prebiotics. En Handbook of Nutraceutical and functional foods. Ed. CRC Press. USA.
- 6) Casapsia; Las bacterias probióticas, Revista en línea: <http://www.casapia.com/Paginacast/Paginas/Paginasdemenus/MenudeInformaciones/ComplementosNutricionales/LosProbioticos.htm>.
- 7) Roos, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twommey, W. J. Meaney, y C. Hill. (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins.
- 8) Jesús Muñoz-Rojas, Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano, Programa de Ecología Molecular y Microbiana,.
- 9) Li, H; O'Sullivan D.J., (2002). *Heterologous expression of the Lactococcus lactis Bacteriocin, Nisin, in a dairy Enterococcus strain.* *App. Environ. Microbiol.* 68: 3392-3400.