



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**

**“Obtención de un hidrolizado de proteínas de lactosuero
adicionado con un probiótico selenizado: capacidad antioxidante
y grado de proteólisis”**

TESIS

**Que para obtener el título de:
Químico en Alimentos**

Presenta:

Coral García Mora

Director:

Dr. Luis Guillermo González Olivares



Mineral de la Reforma, Hidalgo; Agosto de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Dirección
 Dean

Mineral de la Reforma, Hgo., a 4 de julio de 2018

Número de control: ICBI-D/621/2018
 Asunto: Autorización de impresión.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de Licenciatura en Química en Alimentos **Coral García Mora**, quien presenta el trabajo de titulación **“Obtención de un hidrolizado de proteínas de lactosuero adicionado con un probiótico selenizado: capacidad antioxidante y grado de proteólisis”** después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

- PRESIDENTE: Dra. Elizabeth Contreras López
- PRIMER VOCAL: Dr. Luis Guillermo González Olivares
- SEGUNDO VOCAL: Dra. Araceli Castañeda Ovando
- TERCER VOCAL: Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz
- SECRETARIO: Dra. Judith Jaimez Ordaz
- PRIMER SUPLENTE: M. en Q. Juan Francisco Flores Aguilar
- SEGUNDO SUPLENTE: M. en Q. Emmanuel Pérez Escalante

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”

Dr. Oscar Rodolfo Suárez Castillo
 Director del ICBI



ORSC/SEPC



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



El trabajo de investigación presentado en esta tesis se realizó en el laboratorio de Biotecnología I del Área Académica de Química, perteneciente al Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.





Los resultados de esta investigación fueron presentados en la modalidad de cartel en el XX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos y V congreso Internacional sobre Innovación y Tendencias en Procesamiento de alimentos. Llevado a cabo del día 23 al 25 de mayo del 2018 en el Auditorio Dr. Reyes Tamez Guerra de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.



AGRADECIMIENTOS

Primero Dios por darme fuerzas, fe y enormes bendiciones siempre, porque sin ti a lo largo de mi vida mi camino no hubiera sido el mismo.

A mis hermosos padres Noé y Norma que me han apoyado sin condición en cada una de mis decisiones y han sabido guiarme hasta donde el día de hoy he llegado. Sus valiosos consejos, la educación y los valores que me han inculcado, hacen que día a día intente ser una mejor persona y que haya logrado llegar hasta este punto en mi vida. Gracias por toda la confianza que han puesto en mí, espero no haberles fallado tanto. Mami eres el ser que día a día me da el aliento para levantarme, mi motivación, mi razón de existir. Te amo.

Hermanito, hemos pasado muchas cosas difíciles juntos y a pesar de todo, salimos a delante. Dios no me pudo poner a lado de un mejor compañero de vida que tú. Gracias por ser mi fiel defensor en cada ocasión, por tu apoyo, tus regañones, por todo el interés que pones en mí. Siempre serás mi pequeño niño y por eso voy a estar siempre que me necesites.

A mis adorables abuelitos Rosa, José Luis, Aure y Rosita. Todo ese inmenso amor, sus sabios consejos, las sonrisas y abrazos que me han dado me hacen sentir la nieta más afortunada del mundo por tenerlos.

A mis tíos y tías (Oli, Migue, Moni, Yi, Adri, Flora), primos (Vane, Queren, Pepito, Cristobal, Yunue, Ruth) y a ti Kari que tras la lejanía de mis padres estuvieron al pendiente de mí, tal vez no se imaginan, pero, he aprendido de ustedes muchas cosas. Les estoy muy agradecida porque a pesar de todo, siempre han estado ahí para llorar y reír juntos, aconsejarme, escucharme, regañarme, para darme un abrazo cuando saben que lo necesito o simplemente para platicar. Gracias por eso y por confiar en mi para muchas cosas más. De verdad que no puede haber crecido entre una en una mejor familia.

A mis amigos Keni, Belem, Ale, Carito, Mabe, Gamero, Alfredo que desde que empezamos a escribir este capítulo de nuestras vidas, hemos hecho y deshecho a plenitud. Y a mis compañeros en el laboratorio que poco a poco se fueron haciendo parte de mis amigos Emmanuel, Jessi, Alexis, Lupito, Jesús, Pame, David, Carlitos, Isra, Tani. Muchos momentos con ustedes me han quedado marcados en el corazón, soy muy afortunada por haberlos tenido a ustedes como impulsores, compañeros, amigos, y confidentes. Gracias por



tanta paciencia, apoyo y por compartirme sin condición sus conocimientos durante mi larga estancia en la universidad y el laboratorio. Me llevo muchas risas y momentos bonitos con ustedes, quiero verlos llegar a lo alto, ver que son muy felices en sus vidas y por supuesto espero poder acompañarlos en el proceso.

A las familias Barrera Téllez, Segovia Cruz y por supuesto a la familia Martínez G. Ustedes poco a poco se fueron convirtiendo en parte de mi familia me brindaron todo su apoyo sin condición, sus consejos, abrazos y muchas sonrisas. Me abrieron las puertas de su casa y de su corazón y de igual manera ustedes tendrán siempre y sin condición un lugar muy especial en mi casa y en mi vida.

Jesús, gracias por tu inmensa paciencia, por apoyarme y enseñarme tanto en este proyecto y por quedarte conmigo en el laboratorio hasta tarde. Desde que llegaste a mi vida me has demostrado sin descanso, sin condición y sin dudas tu amor, soy muy feliz de tenerte a mi lado como amigo, confidente, compañero, protector y novio, eres un gran ser humano y espero que podamos estar juntos mucho mucho tiempo más.

Por último y no por eso menos importante a Usted Doctor Guillermo por recibirme en su laboratorio y apoyarme en este trabajo tan importante para mí, gracias por sus consejos y tan valiosos conocimientos. A las doctoras Araceli, Elizabeth, Judith y Fabiola y los maestros Emmanuel y Francisco, me alegra mucho que sean ustedes quienes formen parte de esta investigación y por supuesto de mi formación académica, sin su apoyo me hubiera sido más complicado terminar este proyecto. Les agradezco la disponibilidad para resolver mis dudas y compartir sus conocimientos conmigo en todo momento.

Cada uno de ustedes puso un granito de arena para que yo llegara hasta el final de esta aventura tan bella y a veces tan frustrante, ni con todo el esfuerzo del mundo podré pagarles su valiosa compañía y lo mucho que me han apoyado. Siempre tendrán un lugar muy especial en mi corazón y en mis oraciones.



RESUMEN

El selenio es un oligoelemento traza en algunos alimentos, el cual es indispensable en la dieta. Es por ello que actualmente es muy demandado en suplementos para la salud, dirigidos a la nutrición animal y humana. En este estudio se realizó una selenización de *Lactobacillus casei* Shirota para utilizarlo como cultivo iniciador en la fermentación de proteínas de suero de leche comerciales (WPC-80), con la finalidad de obtener un hidrolizado liofilizado con capacidad antioxidante y con función matriz para la contención del probiótico. Para la selenización del probiótico se realizó un enriquecimiento del microorganismo a través de una fermentación en suero de leche adicionado con selenito de sodio en una concentración calculada como crítica de inhibición (196 mg/mL). Al final del proceso de enriquecimiento el microorganismo se utilizó para inocular una solución de WPC-80 al 10% (p/v) previamente pasteurizada, la fermentación se llevó a cabo por 24 horas a 37°C. Esta solución fermentada se liofilizó y al polvo se le determinó el perfil proteolítico por la técnica del ácido tri-nitro-bencílico-sulfónico (TNBS) y por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Asimismo, se analizó la capacidad antioxidante a través de las pruebas de ABTS, DPPH y FRAP. Los resultados mostraron que la absorción total de selenio inorgánico por el microorganismo fue del 2.19%. Así mismo durante la evaluación del perfil proteolítico se observó que hay una disminución en la concentración de grupos amino libres cuando el microorganismo está selenizado y que hay producción de péptidos con peso molecular inferior a 6.5 kDa, lo cual representa una ventaja en términos de producción de péptidos con carácter biológico. Una de estas funciones biológicas es la capacidad antioxidante, la cual se demostró que existe tanto en medios con probiótico



selenizado como en los que no se encuentran selenizados. Al analizar los resultados obtenidos, se concluyó que el polvo de proteínas de suero hidrolizadas obtenido, es un producto que tiene potencial como ingrediente funcional que engloba una fuente orgánica de selenio a través de un probiótico viable que a su vez ha producido péptidos con probable actividad biológica.



INDICE:

I.	MARCO TEÓRICO	1
I.1.	EL SUERO DE LECHE	1
I.1.1.	Proteínas del suero de leche	2
I.2.	PROPIEDADES FUNCIONALES DEL SUERO DE LECHE	3
I.3.	PROPIEDADES BIOACTIVAS DEL SUERO DE LECHE	4
I.4.	INGREDIENTES FUNCIONALES	5
I.5.	Probióticos como ingredientes funcionales	6
I.6.	PÉPTIDOS DE BAJO PESO MOLECULAR	7
I.6.1.	Péptidos antioxidantes	9
I.7.	SELENIO EN LA SALUD HUMANA	10
I.8.	ALIMENTOS ENRIQUECIDOS CON SELENIO	12
II.	OBJETIVOS	17
I.1.	OBJETIVO GENERAL	17
I.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
III.	METODOLOGÍA	18
III.1.	DIAGRAMA METODOLÓGICO	18
III.2.	ADAPTACIÓN DEL CULTIVO INICIADOR	19
III.3.	ENRIQUECIMIENTO DE <i>LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA</i> CON SELENITO DE SODIO	19
III.4.	FERMENTACIÓN DE CONCENTRADO PROTEICO LÁCTEO	20
III.5.	LIOFILIZACIÓN	20
III.6.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	20
III.7.	ESTUDIO DE VIABILIDAD DE LA BACTERIA	20
III.8.	ANÁLISIS DE ABSORCIÓN DE SELENIO	21
III.9.	ESTUDIO DEL PERFIL PROTEOLÍTICO	22
III.9.1.	Determinación de grupos amino libres por el método de ácido trinitrobencensulfónico (TNBS)	22
III.9.2.	Separación de péptidos por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida	22
III.10.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	25
III.10.1.	Capacidad antioxidante por FRAP	25
III.10.2.	Capacidad antioxidante por DPPH	26
III.10.3.	Capacidad antioxidante por ABTS	27
III.11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
IV.1.	ENRIQUECIMIENTO DE <i>LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA</i> CON SELENITO DE SODIO	29
IV.2.	ESTUDIO DE VIABILIDAD DE <i>L. CASEI SHIROTA</i> DURANTE LA FERMENTACIÓN	30
IV.3.	ANÁLISIS DE ABSORCIÓN DE SELENIO	32
IV.4.	ESTUDIO DEL PERFIL PROTEOLÍTICO	34
IV.4.1.	Determinación de grupos amino libres por el método de ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)	34
IV.3.1.	Separación de péptidos de bajo peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	35
IV.5.	EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	37



V. CONCLUSIONES-----	40
VI. REFERENCIAS -----	41
VII. ANEXOS-----	48



I. MARCO TEÓRICO

I.1. El suero de leche

La leche de vaca es el producto de la secreción de las glándulas mamarias del mismo mamífero. Esta es producida bajo un control hormonal desarrollado durante la gestación y parto del animal con el fin de alimentar a sus crías. Es por ello que, la composición de esta secreción es muy compleja ya que comprende de manera general proteínas fosfatadas; como las caseínas (α -S1, α -S2, κ -CN y β -CN) y proteínas globulares presentes en el suero de leche (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albumina sérica e inmunoglobulinas). Así mismo, la leche es rica en lípidos, lactosa, minerales (calcio, fósforo, magnesio, sodio, cobre, zinc), ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina y ácido ascórbico) (CANILEC, 2011; Walstra & Jenness, 1987).

Uno de los principales componentes de la leche son las proteínas globulares. Estas se encuentran en solución en la parte conocida como suero de leche o lactosuero. El suero de leche es el líquido derivado de la producción de queso que se genera al separar las caseínas de la emulsión. El queso es uno de los productos de mayor producción en México. Tan solo de enero a noviembre de 2017 se produjeron alrededor 361, 000 Toneladas de queso. Esta producción deriva una cantidad total de suero superior a los 3 millones de toneladas, de las cuales solo son aprovechadas el aproximadamente el 10%, el resto se desecha sin tratamiento previo, principalmente a cuerpos de agua (SAGARPA, 2017; Walstra & Jenness, 1987).

El suero de leche está constituido principalmente por proteínas, lactosa y grasa, lo que lo hace en un líquido con alta carga orgánica y, por lo tanto, éste representa un problema ambiental importante en México y el mundo. Por lo anterior, en los últimos años se han buscado alternativas para la utilización y mejor aprovechamiento del suero



de leche. De esto, deriva la importancia de conocer su composición y propiedades (Hernández-Rojas; Vélez-Ruiz, 2014).

1.1.1. Proteínas del suero de leche

Las seroproteínas, son las principales proteínas en el suero lácteo, estas son proteínas globulares hidrosolubles capaces de ligar algunos cationes y representan aproximadamente el 20% de las proteínas totales de la leche. Entre ellas se incluyen la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, albúmina sérica e inmunoglobulinas. Estas proteínas se consideran de alto valor biológico porque en su composición se encuentran aminoácidos azufrados (cisteína y metionina), aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina, valina), lisina y triptófano (CANILEC, 2011).

β -lactoglobulina (β -LG). Con un peso molecular de 18.3 kDa como monómero, es la proteína más abundante en el suero lácteo (56%), tiende a precipitar a 100°C y a pH de 4.3, debido a su punto isoeléctrico. En su estructura cuenta con 162 aminoácidos, 84 de éstos son esenciales (Jovanović, Barać, & Maćej, 2005). También tiene 5 radicales de cisteína que están presentes por cada mol de proteína, de éstos solo 4 están implicados en enlaces disulfuro (Creamer, Parry, & Malcolm, 1983).

α -lactoalbúmina (α -LA). Con un peso molecular de 14.2 kDa, es la segunda proteína de mayor presencia en el suero lácteo (20-25%), es sensible a temperaturas mayores de 70°C. Los aminoácidos que comprenden esta proteína son 123, que incluyen aminoácidos esenciales (más del 50% de su composición) y de cadena ramificada (Jovanović *et al.*, 2005). Esta proteína tiene 8 radicales de cisteína por mol de proteína, todos forman parte de enlaces disulfuro (Walstra & Jenness, 1987).

Albúmina sérica bovina (SAB). Se considera prácticamente igual al de la albumina sérica sanguínea, tiene un peso molecular de 66.3 kDa. Esta proteína tiene sólo un grupo tiol libre y 17 enlaces disulfuro provenientes de cisteína. Durante la



pasteurización, a temperaturas mayores de los 60°C los tioles presentes en las cisteínas de las seroproteínas se hacen accesibles al desplegarse de la proteína, lo que los hace fácil de reaccionar con otros compuestos (Walstra & Jenness, 1987).

Debido a la composición química de las proteínas del suero de leche, estas han sido utilizado como materia prima en industria de alimentos (helados y panificación) aprovechando sus características funcionales como las espumantes y gelificantes que otras proteínas, como las caseínas (pertenecientes a la misma matriz alimentaria de origen), no tienen. Además, el suero de leche ha servido en diferentes investigaciones para la elaboración de alimentos funcionales y complementos alimenticios (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014).

1.2. Propiedades funcionales del suero de leche

Al suero de leche se le han atribuido diferentes propiedades funcionales, estas son derivadas principalmente de las características fisicoquímicas de las proteínas globulares que forman parte de su composición. Estas propiedades son utilizadas en el procesamiento de alimentos, donde el suero lácteo se ha convertido en un aditivo coadyuvante para generar propiedades de textura y de atrapamiento de agua y aire, en las industrias de helados, cárnicos embutidos y panificación. Estas propiedades tecnológicas del suero en alimentos dependen de la interacción de las proteínas con la matriz alimentaria, así como de las condiciones del proceso al que sea sometido (Jovanović, Barać & Maćej, 2005; Kinsella & Whitehead, 1989).

El uso del suero de leche se da a partir de su comercialización directa como concentrado de suero de leche el cual es un producto altamente eficiente como materia prima en la industria alimentaria. Este último se genera a partir de procesos como microfiltración, ultrafiltración y osmosis, de los cuales resulta un polvo conocido como proteínas concentradas de suero de leche comercialmente conocido como WPC (whey protein concentrate) Este, es un producto libre de componentes menores del suero de



leche como minerales, carbohidratos y vitaminas; y que además es generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la FDA (Jovanović *et al.*, 2005; Sinha R, Radha, Prakash & Kaul, 2007).

El WPC comercial alcanza concentraciones de proteína desde 35 a 85% (p/p) y estas concentraciones son dependientes tanto del proceso de obtención como del fin del producto final. El grado de concentración de proteínas es el que dicta las propiedades funcionales del WPC, por ejemplo; el WPC-35 con un contenido de proteína de 34 a 35% tiene excelentes propiedades emulsificantes, es altamente soluble y tiene un ligero sabor lácteo. Este producto es usado en la fabricación de yogurt, quesos y fórmulas para infantes, y su uso se extiende a la industria de panificación y confitería. El WPC-80 con un contenido de proteína cercano a 80%, tiene bajo contenido de carbohidratos y se caracteriza por su poder gelificante, emulsificante y espumante. El WPC-80 es un excelente ingrediente en los suplementos para deportistas y en los productos para manejo de peso corporal. Así mismo es utilizado por su gran capacidad de ligar proteínas y de atrapar agua, en la producción de embutidos cárnicos (Rebouillat & Ortega-Requena, 2015).

1.3. Propiedades bioactivas del suero de leche

El suero lácteo que de manera comercial se encuentra principalmente como un polvo concentrado (Jovanović *et al.*, 2005) ha sido reconocido por sus propiedades nutricionales, las cuales están relacionadas con la variedad de proteínas y aminoácidos que las constituyen o bien por los péptidos derivados de ellas después de la hidrólisis de proteínas. Estas propiedades bioactivas de los péptidos liberados, dependen de las condiciones de hidrólisis y están relacionadas con el incremento en los niveles de glutatión peroxidasa y la prevención de diferentes tipos de cáncer (mama, colon, próstata) (Bounous, 2000), regulación del sistema inmunológico (Bounous Batist & Gold, 1989), aumento de los niveles de serotonina en personas vulnerables al estrés (Markus,



Oliver & de Haand, 2002), actividad opioide (Pihlanto-Leppälä, 2001) y antioxidante (Hernández-Ledesma, Dávalos, Bartolome & Amigo, 2005).

Pacheco *et al*, (2006) demostraron que las proteínas de suero lácteo sometidas a hidrólisis enzimática son capaces de reducir en un 65.5% las lesiones ulcerosas provocadas por la ingesta de alcohol. De igual manera, el suero lácteo concentrado hidrolizado con la enzima papaína inhibe en un 59% la enzima convertidora de angiotensina, pudiendo así ser utilizado en la prevención o tratamiento de la hipertensión arterial (Sinha R, Radha, Prakash & Kaul, 2007). Por su parte Bayram *et al*, (2008) demostraron que al menos 3 fracciones peptídicas derivadas de las proteínas del suero lácteo, después de ser hidrolizadas con pepsina y tripsina poseían una alta capacidad antioxidante.

Adicionalmente, se sabe que el suero de leche es un medio donde las bacterias ácido lácticas, entre ellas las probióticas, se desarrollan sin ninguna complicación (Vázquez, Crosa, Rey & Lopretti, 2009). Es así que las investigaciones sobre el uso de suero de leche para el desarrollo de probióticos y alimentos funcionales es un área de investigación en crecimiento (Sgarbieri, 2017).

I.4. Ingredientes funcionales

Un ingrediente funcional es aquel que además de ser un nutriente ha sido demostrado científicamente que contribuye de manera benéfica a una o varias funciones del organismo. Estos son utilizados para la producción de alimentos los cuales a su vez se usan en el tratamiento o prevención de algunas enfermedades. En la actualidad, el desarrollo e investigación de los complementos y alimentos funcionales se realizan con la finalidad de demostrar que cumplen con estos aspectos y se enfocan principalmente en los probióticos, prebióticos, fibra dietética, vitaminas, minerales, flavonoides, terpenos, carotenoides, fitoestrógenos, betaglucanos, ácidos grasos y péptidos (Zamora, 2011).



Los ingredientes funcionales están dentro de una categoría específica de alimento funcional. En esta, se encuentran los alimentos procesados a los que se les ha añadido (ingrediente funcional) o modificado un componente que aporte beneficios adicionales al organismo, por ejemplo, las leches fermentadas con bacterias probióticas, las cuales ayudan a mejorar la salud del tracto gastrointestinal (Ford & Dahl, 2012).

1.5. Probióticos como ingredientes funcionales

El término probiótico significa “a favor de la vida” y hace referencia a los microorganismos vivos, que cuando se ingieren en cantidades suficientes, tienen efectos benéficos en la salud más allá de los efectos nutricionales comunes, mientras que los alimentos probióticos son aquellos alimentos a los que generalmente se les ha adicionado un microorganismo probiótico, para proporcionar al alimento el mismo fin benéfico (FAO & OMS, 2006). Los microorganismos probióticos son bacterias ácido lácticas (BAL), generalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* (Holzapfel, Haberer, Snel & Schillinger, 1998; Parvez, Malik, Kang & Kim, 2006).

Además, se sabe que los probióticos son un conjunto de bacterias con morfología de cocos o bacilos, son Gram positivas, anaerobias facultativas, catalasas negativas y no forman esporas, son mesófilas o termófilas; y su temperatura óptima de crecimiento, así como su metabolismo homo o heterofermentativo varían para cada una de las especies (Parra, 2010). Para ser consideradas como bacterias probióticas, estas deben cumplir con una serie de características. Una de las principales es su efecto benéfico sobre la salud de huésped, la cual debe de estar documentada científicamente. Adicionalmente, deben sobrevivir al paso por el tracto digestivo, adherirse a las paredes del intestino y proliferar ahí, por lo tanto, deben poder crecer en presencia de bilis y ser resistentes a los jugos gástricos (Holzapfel *et al.*, 1998). Algunas de las bacterias que han sido confirmadas como probióticas son *Lactobacillus rhamnosus*, *L. johnsonii*, *Bifidobacterium lactis*, *L. acidophilus* y *L. casei* (FAO & OMS, 2006).



Entre los beneficios conocidos de las bacterias probióticas están los siguientes: evitan la colonización intestinal de bacterias patógenas, mejoran la digestión, reducen la incidencia y duración de diarreas, estimulan el sistema inmunológico, producen vitaminas (B2, B6 y B8), favorecen la asimilación de oligoelementos, reducen los niveles de colesterol, previenen el cáncer de colon y la proliferación de células tumorales (Parvez *et al.*, 2006).

Los alimentos funcionales que han sido suplementados con microorganismos probióticos son principalmente las leches fermentadas y productos lácteos, como los quesos o el lactosuero. En este último se han generado algunos productos fermentados donde el suero de leche sirve como matriz de contención del probiótico (Pereira, Henriques, Gomes, Gomez-Zavaglia & de Antoni, 2015).

1.6. Péptidos de bajo peso molecular

Los péptidos bioactivos o péptidos con actividad biológica, son secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de proteínas, pero que ejercen actividades biológicas cuando son liberados por hidrólisis química o enzimática durante la digestión gastrointestinal o durante la elaboración de algunos alimentos fermentados con microorganismos como las BAL (Mulero, Zafrilla, Martínez-Cachá, Leal & Abellán, 2011).

Estos péptidos pueden tener un efecto importante en la regulación y modulación metabólica. Entre las actividades biológicas de los péptidos que han sido confirmadas, se encuentra que poseen acción como vasorreguladores, en factores de crecimiento, como inductores hormonales, neurotransmisores, tienen actividad antihipertensiva, hipocolesterolemizante, antioxidante, antimicrobiana, inmunomoduladora, antitrombótica y poseen efectos opiáceos (Mulero *et al.*, 2011). Es por estas razones que se ha incrementado el uso de los péptidos bioactivos como ingredientes funcionales ya sea obtenidos por hidrólisis enzimática o por fermentación microbiana (Nagpal *et al.*, 2011).



En este sentido, se ha demostrado que diversas BAL como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, poseen la capacidad de generar péptidos durante la fermentación de lácteos. Esto lo logran mediante su propio sistema proteolítico, el cual asegura que haya crecimiento de las BAL en cualquier otro medio (González-Olivares *et al.*, 2011).

El sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas está formado primeramente por las proteasas que están situadas en la pared celular y que permiten la hidrólisis de proteínas en oligopéptidos. En una segunda parte se lleva a cabo el transporte de péptidos, que permite el tránsito de los oligopéptidos liberados dentro de la célula y la última parte del sistema, la conforman las peptidasas intracelulares que hidrolizan los oligopéptidos en péptidos o aminoácidos. Por lo tanto, los péptidos bioactivos son los péptidos que no se transportaron al interior de la célula o péptidos que se generan dentro de la célula y posteriormente son excretados al medio (González-Olivares *et al.*, 2014).

En el intestino, son las enzimas digestivas endógenas y las proteasas liberadas por los microorganismos colonizadores las que degradan a los oligopéptidos. Esta liberación continua con la formación de péptidos bioactivos que, al ser liberados en el intestino, pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos por la circulación sanguínea y así tener funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal, o a nivel sistemático (Torres, 2005; Mulero *et al.*, 2011).

El tipo de péptido obtenido y su actividad biológica depende de la fuente de proteína y condiciones de hidrólisis (Muro, Álvarez, Riera, Arana & Téllez, 2011). Dentro de los ejemplos de fuentes proteínicas están aquellas de origen vegetal como las de soya, trigo, maíz, arroz, cebada, girasol. Así como las proteínas de origen animal que se obtienen de la leche, productos lácteos, ovoalbúmina de huevo, carne, músculos de pescados y jalea real (Mulero *et al.*, 2011).



Se ha demostrado que los péptidos liberados después de algún proceso de hidrólisis de las proteínas de leche y sus derivados, así como del suero lácteo poseen diversas actividades biológicas, como actividad antimicrobiana, opioide, inmunomoduladora y antioxidante (Muro *et al.*, 2011). Virtanen, Pihlanto, Akkanen & Korhonen, (2007) demostraron que la fermentación de suero lácteo con bacterias como *Leuconostoc mesenteroides ssp*, *Lactobacillus jensenii* (ATCC 25258) y *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) tiende a producir péptidos de bajo peso molecular (4-20 kDa) y a la vez a aumentar la actividad antioxidante de los hidrolizados al final de la fermentación.

I.6.1. Péptidos antioxidantes

El estudio de la actividad antioxidante de muchos compuestos naturales es actualmente de importancia mayor, debido a que la oxidación es un proceso natural e inevitable de los organismos. Sin embargo, a la oxidación acelerada se deben el envejecimiento prematuro y diversas enfermedades como el cáncer (Medrano & del Castillo, 2011).

Se ha demostrado que algunos péptidos provenientes de proteínas de huevo, leche y soya tienen propiedades antioxidantes. Regularmente estos péptidos antioxidantes pueden ser introducidos a diferentes alimentos o productos farmacéuticos como potentes antioxidantes con beneficios hacia la salud (Kim *et al.*, 2012). Medrano *et al.*, (2011) lograron obtener péptidos con una alta capacidad antioxidante después de hidrolizar proteínas de soya con proteasas de *Streptomyces griseus* y *Aspergillus oryzae*.

Las caseínas y seroproteínas también son una fuente importante de péptidos con actividad biológica principalmente después de una hidrólisis en productos lácteos fermentados (Kim *et al.*, 2012). Virtanen *et al.*, (2007) demostraron que la capacidad de inhibición de radicales libres por el suero de leche aumenta 27% después de haber sido sometido a fermentación con *Lactobacillus jensenii* (ATCC 25258), lo cual



es atribuido a la liberación de péptidos de bajo peso molecular durante la fermentación. En una investigación similar Peng *et al.*, (2009) obtuvieron a partir de un concentrado proteico de suero lácteo hidrolizado con alcalasa, cuatro fracciones peptídicas. De estas fracciones las correspondientes a 0.1 y 2.8 kDa demostraron un efecto reductor significativo de radicales libres, mayor a las fracciones restantes.

La actividad antioxidante de las proteínas de lactosuero se ha relacionado con la presencia de cisteína, ya que ésta activa la producción de glutatión peroxidasa. También se ha relacionado con presencia de lactoferrina y lactoferricina ya que estas tienen la capacidad de secuestrar iones hierro (Kannan, Hettiarachchy & Marshall, 2012). Adicionalmente, la capacidad antioxidante de un alimento funcional está dada no solamente por los componentes intrínsecos del alimento, si no por aquellas sustancias que pueden adicionarse de manera externa. Dentro de las sustancias más estudiadas, se encuentran los oligoelementos como iones metálicos (Pophaly *et al.*, 2014).

1.7. Selenio en la salud humana

El selenio (Se) es el elemento con número atómico 34. Químicamente se puede encontrar en 4 formas inorgánicas principales: selenuro (Se^{-2}) altamente tóxico, selenato (SeO_4^{-2}) (Se VI) moderadamente tóxico, selenito (SeO_3^{-2}) (Se IV) y selenio elemental (Se^0) sin toxicidad. Estas dos últimas especies de Se pueden ser introducidas al metabolismo de diversas especies bacterianas y ser transformadas en especies orgánicas de Se como selenoaminoácidos (Galano *et al.*, 2013).

Este elemento es un micronutriente que en sus formas orgánicas como aminoácidos (selenocisteína y selenometionina) es esencial en el metabolismo humano. La ingesta diaria recomendada de Se es de 75 y 60 μg para hombres y mujeres respectivamente (Rayman, 2000). La ingesta principal de Se es a través del consumo de hortalizas, cereales y suplementos alimenticios, donde el Se se encuentra principalmente en forma de selenoaminoácido como selenocisteína. La selenocisteína es un aminoácido



análogo de la cisteína que a nivel estructural se diferencia únicamente en entre el Se y el S del grupo R (Figura 1). (Salinas, 2010).

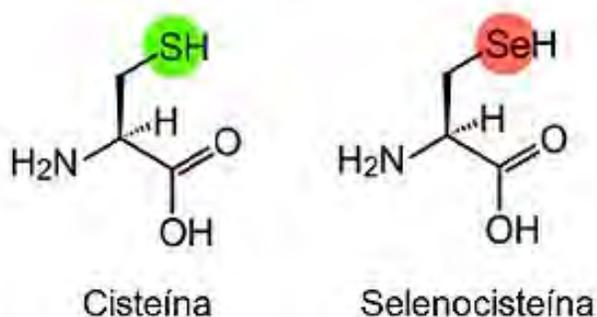


Figura 1. Estructura de cisteína y selenocisteína

En el cuerpo humano existen diversas enzimas con funciones vitales para el organismo y que además contienen selenoproteínas en su estructura o sitio activo. Estas enzimas son principalmente peroxirredoxinas, metionina sulfóxidoreductasas, yodotironin-deiodinasas, tiorredoxin-reductasas y glutatión-peroxidadasas (GPx), estas últimas se conforman de 8 enzimas (GPx 1-8) y las primeras 5 contienen selenocisteína en su centro activo. Las tiorredoxin reductasas y GPx 1-5 son enzimas que entre sus funciones está prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno que causan diversos daños en las células, por lo cual un funcionamiento adecuado de estas enzimas en el organismo puede prevenir enfermedades como el cáncer (Steinbrenner & Sies, 2013).

La presencia de las selenoproteínas en las enzimas ya mencionadas es de gran importancia en la salud ya que cada enzima cumple una función importante en el organismo. Por ejemplo, en los hombres, la GPx4 presente en las mitocondrias de los espermatozoides, durante su maduración es esencial para su movilidad, lo cual es fundamental para la fertilidad (Ursuni *et al.*, 1999). Por su parte la tiroides es el tejido del cuerpo con mayor concentración de Se y se encuentra distribuido entre las enzimas



yodotironin deiodinasas que producen la hormona tri-yodotironina que afecta casi todos los procesos fisiológicos del cuerpo (Schomburg & Köhrle, 2008).

En el cerebro existen regiones con una marcada expresión de genes de selenoproteínas, entre ellas el hipocampo, la corteza del cerebelo y las neuronas. Las selenoproteínas se caracterizan por proteger a las neuronas del daño oxidativo causado por el cobre y el hierro ya que tienen la capacidad de unir a ellas el metal (Steinbrenner & Sies, 2013). La disminución de biosíntesis de selenoproteínas por las neuronas produce fenotipos neurológicos graves que causan convulsiones, ataxia y trastornos en el desarrollo de las interneuronas corticales y trastornos neurológicos. Se ha asociado un bajo nivel de Se en el plasma sanguíneo y bajos niveles de Gpx con el retraso del desarrollo del sistema cognitivo y neurológico en niños. De igual manera se ha demostrado que una dieta deficiente en Se disminuye un 92% la actividad de la enzima glutatión peroxidasa presente en el hígado de ratones (Steinbrenner & Sies, 2013).

1.8. Alimentos enriquecidos con selenio

El valor nutritivo del Se es dependiente de sus especies y las concentraciones presentes en los alimentos o suplementos alimenticios (Kieliszek & Blazejak, 2013). Los alimentos que de manera natural contienen Se son los cereales y las nueces, seguidas de huevo, carne, atún y bacalao. Sin embargo, a pesar de que la ingesta diaria recomendada de Se es muy baja, ésta regularmente no se cubre adecuadamente, debido a que, el Se presente en los alimentos no siempre se encuentra en su forma biodisponible. Cuando el Se inorgánico es bioconvertido a Se orgánico e integrado a cadenas polipeptídicas en forma de selenocisteína o selenometionina, se convierte en una especie completamente biodisponible.

En este sentido, se sabe que la síntesis del aminoácido selenocisteína es diferente respecto a los otros 20 aminoácidos ya que, entre otros aspectos, este no se sintetiza como aminoácido libre. La selenocisteína, se sintetiza sobre un residuo de serina unido



a un tRNA^{sec}. Un ejemplo concreto de síntesis, es el que realizan las BAL, donde la transformación del Se se logra, en una primera parte, cuando se cataliza la formación de selenofosfato a partir del selenito (u otras formas inorgánicas de Se), por la acción de una selenofosfato-sintetasa.

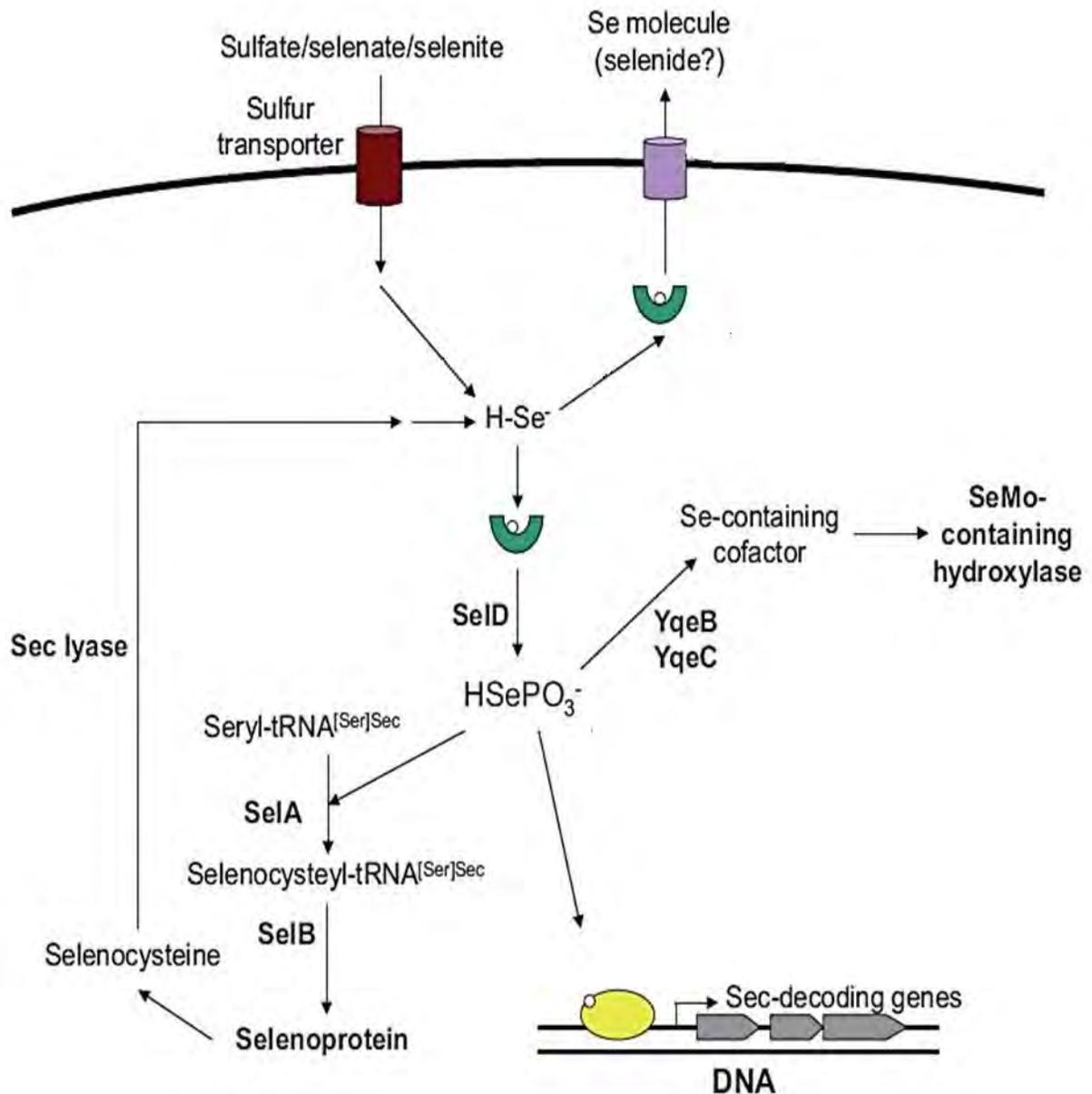


Fig. 2. Cadena de reacciones en la biotransformación de selenio inorgánico (Lin, *et al.*, 2015).



Este selenofosfato es transferido a seril-tRNA^{sec}, el cual es producido a partir de una aminoacilación del tRNA^{sec} con un residuo de serina adenilada. La adición del selenofosfato con seril-tRNA^{sec} deriva en la formación de una selenocisteinil-tRNA^{sec}. Posteriormente la selenocisteinil-tRNA^{sec} es unida con un factor de elongación de traducción específico en el ribosoma y es ahí donde se libera un residuo de selenocisteína que es incorporado a una nueva cadena polipeptídica. La cadena de reacciones se observa en la figura 2. Cabe mencionar que la incorporación de la selenocisteína a los polipéptidos se da de manera cotraduccional en las posiciones específicas del codón UGA (Salinas, 2010; Martil, 2014).

Por lo anterior, en los últimos años se han desarrollado diferentes alimentos enriquecidos con Se. Éstos se generan principalmente, a partir del aumento en la concentración de Se en el suelo de siembra, enriquecimiento de semillas germinadas o como aditivo en los alimentos procesados, ejemplo de estos alimentos son el té, sal de mesa, diversos tipos de yogurt, fórmulas lácteas, setas, cebollines, ajo, tunas, pan, trigo, entre otros (Pophaly *et al.*, 2014). Un ejemplo de lo anterior son las semillas de centeno utilizadas para la producción de pan, que fueron enriquecidas con Se en el germinado y que mostraron un aumento de cinco veces el contenido de Se en el pan, sin afectar su calidad sensorial (Lamberti *et al.*, 2011).

Otra manera de aumentar la concentración de Se en los alimentos es a partir del enriquecimiento de microorganismos con este metaloide. Las levaduras han sido las especies más estudiadas para este fin, ya que, por ejemplo, *Saccharoyces cerevisiae* tiene la capacidad de transformar el Se inorgánico del medio, el cual es potencialmente tóxico para diferentes especies y convertirlo principalmente en una especie segura y orgánica de Se, como lo es la Selenometionina. La selenometionina es un aminoácido análogo de la metionina y que es producido por diversas especies vegetales, sin embargo, este no sustituye a la metionina en la síntesis de proteínas (Alzate, Fernández-Fernández, Pérez-Conde, Gutierrez & Cámara, 2008).



Sánchez-Martínez (2015) utilizó esta característica de las levaduras y aumentó la concentración de Se biodisponible en forma de selenometionina en un pan blanco cuando enriqueció la levadura con selenito de sodio (Na_2SeO_3). La FDA ha descrito la importancia del Se en el crecimiento y desarrollo infantil y ha indicado que las levaduras pueden ser usadas como vehículos en el enriquecimiento de fórmulas lácteas para infantes (Lönnerdal, Vargas-Fernández & Whitacre, 2017).

Se ha demostrado que diferentes especies de BAL, entre las que se incluyen algunas probióticas, tienen la capacidad de convertir el Se inorgánico presente en el medio donde se encuentren a Se elemental o Se orgánico biodisponible, principalmente como selenocisteína. Por ello, se han hecho algunos estudios de incorporación de especies orgánicas de Se en alimentos donde las BAL forman parte de su composición. Los alimentos lácteos como los quesos frescos, quesos semimadurados y leches fermentadas son las matrices donde las BAL probióticas tienden a mantener sus niveles de sobrevivencia, haciendo de estos productos probióticos o bien simbióticos al adicionar una fuente prebiótica (Pophaly *et al.*, 2014; González-Olivares *et al.*, 2016).

Entre los probióticos con capacidad de captación de Se inorgánico se encuentra *L. paracasei*, *L. kéfir*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. fermentum* y *L. helveticus* entre otros (Andreoni, Moro, Cavalca, Erba & Ciappellano, 2000). *L. helveticus*, tiene la capacidad de introducir a su metabolismo el 76% del Se presente en un medio; por su parte, *L. rhamnosus* GG asimila sólo el 33.76%. Ambas bacterias son usadas como cultivos iniciadores en productos lácteos fermentados (González-Olivares *et al.*, 2016). Además, otros probióticos como *L. casei* Shirota han demostrado un alto grado de asimilación de Se inorgánico (hasta 35%), esta concentración es superior a la reportada por microorganismos como *L. Bulgaricus*, el cual es comunmente utilizado en la elaboración de productos lácteos (Martínez, 2016).



En un estudio Deng *et al*, (2015) enriquecieron *L. brevis* CGMCC 6683 aislado de keffir con selenito de sodio, logrando que la bacteria redujera el Se a su forma elemental. La bacteria enriquecida fue inoculada como cultivo iniciador a una leche fermentada con *L. burgaricus* y *S. thermophilus*, permitiendo un aumento significativo en el consumo de Se biodisponible a partir de la leche fermentada. El estudio anterior es importante ya que en la actualidad, las leches fermentadas enriquecidas con Se inorgánico son comunmente enriquecidas desde la fermentación, para ello se utilizan concentraciones de Se muy pequeñas para prevenir intoxicaciones y por lo tanto el consumo de Se biodisponible a partir de estos alimentos no aumentan significativamente el valor de la ingesta diaria (Deng *et al*, 2015), es por ello la importancia de enriquecer los microorganismos antes der ser inoculados en los alimentos.



II. OBJETIVOS

I.1. Objetivo general

Obtener un hidrolizado de proteínas de suero de leche a través de la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota selenizado, para evaluar su capacidad antioxidante y grado de hidrólisis.

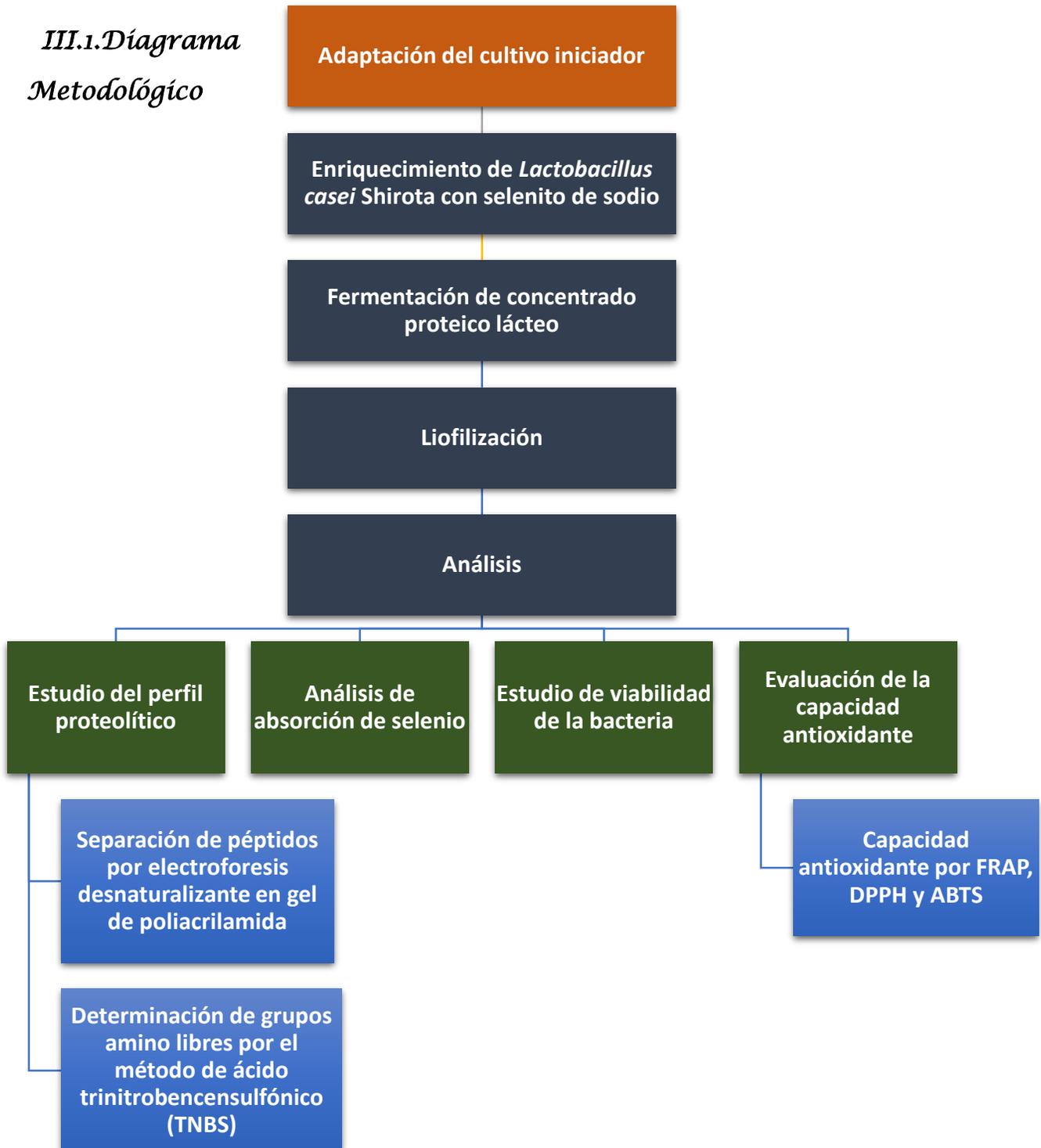
I.2. Objetivos específicos

- I.** Enriquecer *Lactobacillus casei* Shirota con selenio inorgánico a través de una fermentación en presencia de Na_2SeO_3 .
- II.** Fermentar proteínas de suero lácteo comerciales (WPC-80) para generar una hidrólisis a través de la inoculación de *Lactobacillus casei* Shirota selenizado.
- III.** Analizar el grado de hidrólisis del concentrado de proteínas por medio de electroforesis y TNBS para relacionarlo con una probable capacidad biológica
- IV.** Determinar el efecto de la absorción de selenio por *Lactobacillus casei* Shirota sobre la capacidad antioxidante de proteínas hidrolizadas de suero de leche, a través de métodos analíticos.



III. METODOLOGÍA

III.1. Diagrama Metodológico



III.2. Adaptación del cultivo iniciador

La cepa pura de *Lactobacillus casei* Shirota se obtuvo a partir de la bebida láctea fermentada Yakult®, con el objetivo de adaptar los microorganismos al medio de fermentación. Para ello se inoculó 1 mL de bebida láctea fermentada en un tubo con 9 mL de concentrado de proteínas de suero lácteo (WPC-80) reconstituido al 10% (p/v) y adicionado con 1% (p/v) de lactosa, a partir de una solución al 10% (p/v) previamente pasteurizada (90°C/3 min). El tubo se incubó a 37°C por 24 horas. Posterior al tiempo de incubación la cepa se conservó en glicerol en una proporción 1:1 a temperaturas de congelación. La pureza de la cepa se confirmó mediante tinción de Gram.

III.3. Enriquecimiento de Lactobacillus casei Shirota con selenito de sodio

La bacteria *Lactobacillus casei* Shirota se enriqueció con selenito de sodio (Na_2SeO_3) a una concentración de 196 mg/L, concentración correspondiente al punto crítico de inhibición de esta bacteria al Na_2SeO_3 . Este punto se determinó a partir del trabajo de investigación de Martínez (2016).

Para el enriquecimiento de la bacteria, 300 μL del cultivo aislado se inocularon en un tubo de ensaye con una solución previamente pasteurizada (70°C/3 min) de WPC-80 al 10% p/v, lactosa 1% p/v y Na_2SeO_3 a 196 mg/L, para un volumen final de 10 mL. Este cultivo se incubó a 37°C durante 15 horas ya que de acuerdo con Martínez (2016), este es el tiempo de fermentación en que se presenta la fase de desaceleración para *L. casei* Shirota en un medio MRS (Difco®) suplementado con Na_2SeO_3 a la concentración del punto crítico de inhibición. El control se inoculó a la misma concentración de bacteria y se incubó bajo las mismas condiciones, pero sin enriquecimiento con Na_2SeO_3 . La pureza del cultivo se confirmó mediante tinción de Gram.



III.4. Fermentación de concentrado proteico lácteo

Después de la selenización del lactobacilo, el tubo control y el enriquecido con selenio se transfirieron como inóculos, por separado, a un matraz con 90 mL de solución pasteurizada (90°C/3 min), de WPC-80 al 10% (p/v) adicionado con lactosa al 1% (p/v). Para hidrolizar las proteínas, se incubó la solución a 37°C por 24 horas y al final de la fermentación, se procedió liofilizarla. Para comprobar la pureza del cultivo y la ausencia de contaminación se realizó tinción de Gram.

III.5. Liofilización

Posterior a la incubación, los sueros hidrolizados se ultracongelaron a -70°C y posteriormente se liofilizaron en una liofilizadora LABCONCO® (modelo FreeZone6). Al final del proceso se tomó 1 g de muestra, antes del almacenamiento, para determinar la cuenta viable del probiótico en el fermentado liofilizado.

III.6. Preparación de las muestras

Para la evaluación de la viabilidad de la bacteria, de la determinación de grupos amino libres en el suero liofilizado y de los ensayos de la capacidad antioxidante, ambas muestras liofilizadas (WPC-80 hidrolizado con *L. casei* Shirota y WPC-80 hidrolizado con *L. casei* Shirota enriquecido) fueron reconstituidas al 10% (p/v).

III.7. Estudio de viabilidad de la bacteria

Se realizó el conteo de bacterias viables antes y después de la fermentación, así como al final de la liofilización. Para llevar a cabo el conteo de microorganismos, los sueros liofilizados se reconstituyeron en agua estéril. De cada una de las muestras se realizaron 6 diluciones consecutivas, para la primera dilución se tomó 1 mL de cada matraz antes y después de la fermentación o muestra reconstituida y se diluyó en 9 mL de agua peptonada. Posterior a las diluciones, se tomaron 10 µL de cada dilución y por



la técnica de microgota se inocularon en placas Petri con agar DeMan, Rogosa y Sharpe (MRS) (Difco®) preparado según las especificaciones del fabricante. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones anaeróbicas durante 24 horas. Después de las 24 horas se realizó el conteo de microorganismos en cada una de las placas y se realizaron los cálculos correspondientes.

III.8. Análisis de absorción de selenio

La determinación de Se absorbido por las células se realizó homogenizando 1 g del hidrolizado proteico liofilizado en una solución de Ditioneitol (DTT) al 0.3 % (p/v). Posteriormente la solución se centrifugó en tubos Ependorff® a 4°C y 10,000 rpm durante 5 min para separar las células lavadas del DTT. Después de la centrifugación se pesaron aproximadamente 0.3 g del precipitado y se diluyeron con 5 mL de ácido nítrico concentrado y 4 mL de agua desionizada, en un tubo de digestión. La digestión de la materia orgánica presente en las células se realizó mediante un sistema de reacción acelerada por microondas CEM® (modelo MARS S), con las siguientes condiciones: rampa de temperatura de 175°C durante 5.5 min y de manera continua 4.5 min con una temperatura de 175 a 180°C, el límite de presión fue de 300 psi.

Después de la digestión, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora para disminuir la posibilidad de volatilización del Se. Cada muestra resultante se aforó a 25 mL con agua desionizada. El mismo procedimiento se realizó con las muestras del suero control (Segovia, 2017).

Para determinar la cantidad de Se absorbido por las células, se hizo un análisis de espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP) en un equipo Pekin Elmer®, (modelo Optima 8300) con flujo de argón de 8 L/min. Para ello se realizó una curva de calibración de Se de 0 a 3 mg/L (anexo 1) en ácido nítrico al 5% y las mediciones se realizaron a una longitud de onda de emisión máxima de 196 nm (Segovia, 2017).



III.9. Estudio del perfil proteolítico

III.9.1. Determinación de grupos amino libres por el método de ácido trinitrobencensulfónico (TNBS)

El método de TNBS se basa en la formación de un compuesto cromóforo detectable a 340 nm, cuando el ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) reacciona con las aminas primarias disponibles de los aminoácidos presentes en la muestra en condiciones suavemente alcalinas. Este estudio se realizó para las dos muestras antes y después de la fermentación, así como al liofilizado final.

El método se realizó siguiendo la metodología de Alder-Nissen (1979). Para ello, a tubos de ensaye cubiertos con papel aluminio se adicionaron 2 mL de buffer de fosfatos a una concentración de 0.212 M y pH 8.2, 250 µL de muestra, blanco (agua) o solución patrón según correspondiera, posteriormente se agregaron 2 mL de solución TNBS al 0.1% (p/v). Cada tubo se agitó en vortex por 10 segundos y se incubó durante 1 hora a 50°C, transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción con 4 mL de HCl 0.1N y agitando nuevamente en vortex durante 10 segundos. Las lecturas se hicieron en espectrofotómetro Thermo scientific® (modelo Genesys 10vis) a 340 nm. La determinación se realizó por triplicado para las muestras problema y para las muestras del control sin Se. Para obtener una curva de calibración (anexo 2) se realizaron soluciones patrón a concentraciones de 50-300 mg/L, a partir de una solución madre a 300 mg/L de glicina-dodecilsulfato de sodio (SDS).

III.9.2. Separación de péptidos por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida

La electroforesis es una técnica analítica separativa, cuyo principio se basa en la migración de biomoléculas a través de un gel o matriz porosa. En el caso de la separación electroforética para moléculas proteicas, se emplea como matriz un gel de poliacrilamida



con dodecilsulfato de sodio (SDS) como agente desnaturizante. Esta separación tiene relación directa con la carga, peso molecular o tamaño de las moléculas y dicho movimiento es generado a través de un campo eléctrico. La velocidad de migración depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/masa), voltaje aplicado y el grado de entrecruzamiento del gel. Este último depende de la concentración de acrilamida (T%) y bis-acrilamida (%C) en el gel. El peso molecular de las proteínas o péptidos analizados se determina comparando la movilidad de las muestras con la de marcadores de peso molecular conocido (Pérez, 2000).

III.9.2.1. Preparación de los geles

Basados en la metodología de González-Olivares *et al*, (2011) con algunas modificaciones, la determinación se realizó de la siguiente manera. El gel de separación se preparó al 15% de T, para ello se diluyeron 5 mL de una solución de acrilamida 19:1 al 30% en 5 mL de buffer de separación Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, se adicionaron 160 μ L SDS al 10% esta solución y se desgasificó a vacío con agitación suave durante 15 min en un matraz Kitazato de 25 mL. Posterior a la desgasificación se adicionaron 80 μ L de persulfato de amonio al 10% (p/v) en agua y 8 μ L de trimetil-N-diamina (TEMED), la solución se homogenizó por algunos segundos y se vertió rápidamente en dos cristales para electroforesis previamente montados hasta llenar $\frac{3}{4}$ partes de cada uno. Enseguida cada cristal fue llenado con agua para contribuir con la compactación del gel durante su polimerización, la cual se llevó a cabo durante aproximadamente 3 horas.

El gel de concentración al 4% de T, se preparó diluyendo 533 μ L de solución de acrilamida 19:1 al 30% en 3.47 mL de buffer de concentración Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8, a esta solución se le adicionaron 25 μ L de SDS al 10% y se desgasificó en las mismas condiciones del gel de separación. Posterior a la desgasificación se adicionaron 36 μ L de persulfato de amonio al 10% (p/v) en agua y 3 μ L de TEMED. La solución se homogenizó durante unos segundos y se vertió inmediatamente sobre el gel de



separación al cual después del tiempo de polimerización se le retiró el agua. De manera inmediata se colocaron los peines sobre el gel de concentración y se cubrieron los cristales con papel parafilm, la polimerización del gel de concentración se llevó a cabo durante 3 horas más.

III.9.2.2. Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras, cada hidrolizado proteico liofilizado y una muestra de WPC-80 sin ningún tratamiento previo fueron previamente reconstituidos al 0.5% p/v. 40 μ L de cada suero reconstituido fueron adicionados en tubos ependorff seguidos de 20 μ L de buffer colorante (preparado a partir de buffer Tris-HCl, SDS, azul de bromofenol, glicerol y agua desionizada) y 3 μ L de β -mercaptoetanol. Cada tubo se homogenizó e incubó por 5 min a 90°C.

Se utilizó un estándar de polipéptidos SDS-PAGE Broad-Range de Bio-RAD® (anexo 3). Este estándar sirve como referencia para calcular los pesos moleculares de las proteínas obtenidas, y se preparó adicionando 4 μ L de este a un tubo ependorff seguido de 20 μ L de buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8, 20 μ L de buffer colorante, 20 μ L de agua y 3 μ L de β -mercaptoetanol. El estándar se homogenizó completamente e incubó a 5 min a 90°C. Las muestras y el estándar se prepararon después del tiempo de polimerización de los geles.

III.9.2.3. Corrida de las muestras

Una vez polimerizados los geles se retiraron los peines y se colocaron los cristales dentro de la cámara de electroforesis, a la cámara se vertieron 600 mL de buffer de corrida Tris-glicina-SDS (0.1 M de tris, 0.1 M de glicina y 0.1% de SDS) a pH 8.25, verificando que los cristales quedaran completamente cubiertos de la solución buffer.

Enseguida se inyectaron 15 μ L del estándar en el primer carril, se inyectó el mismo volumen para cada una las muestras dejando un carril entre cada muestra y el estándar.



La corrida de las muestras se llevó a cabo durante aproximadamente 2 horas a 200 V hasta que las muestras recorrieron completamente el gel. La cámara de electroforesis fue puesta en un baño de hielo durante la corrida para contrarrestar el calor generado por la corriente eléctrica.

Al término de la corrida las proteínas y péptidos separados se fijaron colocando los geles en una solución de ácido acético 7.5% v/v durante 45 minutos y después se tiñeron en una solución de azul de Comassie durante 2 horas, ambas acciones se llevaron a cabo con agitación mecánica suave. Para desteñir los geles, estos se sumergieron en una solución de ácido acético 7.5% v/v y metanol 10% v/v durante una hora bajo agitación mecánica. El gel se analizó con el software de análisis de imagen “Image Lab” versión 5.2.1 (Gel-Doc Bio-RAD®).

III.10. Evaluación de la capacidad antioxidante

Debido a que las moléculas con capacidad antioxidante actúan por diferentes mecanismos, los ensayos para comprobar la capacidad antioxidante son *in vitro*, generalmente bajo procesos controlados de oxidación y esto se dividen en dos. Los primeros son ensayos que se basan en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) por sus siglas en inglés y los segundos, que se basan en la reacción por transferencia de electrones (ET). Ambos tipos de reacción resultan en la neutralización de los radicales libres. Para confirmar el potencial antioxidante de las moléculas o muestras problema deben realizarse al menos tres diferentes métodos, para posteriormente comparar los resultados (Huang, Ou, & Prior, 2005).

III.10.1. Capacidad antioxidante por FRAP

Uno de los ensayos ET es el del poder antioxidante de reducir el ion férrico (FRAP) cuya reacción es llevada a cabo en medio ligeramente ácido. Dicha reacción tiene lugar cuando, moléculas antioxidantes poseen la capacidad de reducir el ion Fe^{3+} del complejo



TPTZ-Fe³⁺ a Fe²⁺, lo cual se identifica por un cambio de coloración de las soluciones de marrón a azul que puede ser leído espectrofotométricamente a 593 nm (Huang *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo el análisis se utilizó la metodología descrita por Benzie & Strain (1996) con algunas modificaciones. Se preparó el reactivo FRAP a partir de un buffer de acetatos 300 mM pH 3.6, una solución 10 mM de 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) en HCl 40 mM y una solución de FeCl₃.6H₂O (Fe III) 20 mM. Estas soluciones se mezclaron en una proporción 10:1:1 respectivamente.

La curva de calibración (anexo 5) se preparó con soluciones de FeCl₂.4H₂O (Fe II) en HCl 40 mM a concentraciones de 0.01 a 0.05 mM. Para cada solución se tomó 1 mL del reactivo de FRAP, el volumen correspondiente de una solución madre 5mM de Fe (II) en HCl 40 mM para cada concentración de la curva y estas se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Todas las soluciones se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Posterior al tiempo de incubación se midió la absorbancia de cada solución a 593 nm usando como blanco solo el reactivo de FRAP. La capacidad antioxidante de las muestras se determinó bajo el mismo procedimiento que las soluciones estándar, reemplazando la solución de Fe²⁺ por 250 µL de cada muestra reconstituida. Todo el procedimiento se realizó por triplicado. Los valores obtenidos para cada muestra se reportan como mg equivalentes de Fe²⁺ por cada 100 mL de muestra.

III.10.2. Capacidad antioxidante por DPPH

El 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical libre orgánico nitrogenado, susceptible a reaccionar con compuestos antioxidantes cuando estos son capaces de donarle un electrón. La reacción se lleva a cabo en medio metanólico y se monitorea espectrofotométricamente a 515 nm, mediante el cambio de coloración de violeta a amarillo (Huang, Ou & Prior, 2005).



Para llevar a cabo este ensayo se siguió el método propuesto por Brand-Williams (1995) con algunas modificaciones. Se preparó una curva de calibración con Trolox a concentraciones de 0 a 33 μM (anexo 6). Para cada solución de la curva se adicionaron 2.9 mL de DPPH 0.1 mM en metanol, el volumen adecuado de una solución madre de Trolox (1000 μM); finalmente, las soluciones se llevaron a un volumen final de 3 mL con metanol. El control sólo contenía 0.1 mL de metanol y 2.9 mL de DPPH. Las soluciones se dejaron reaccionar en la obscuridad durante 50 minutos, posterior a este tiempo se les midió la absorbancia a 515 nm usando como blanco sólo metanol. La capacidad antioxidante de las muestras se determinó bajo el mismo procedimiento que las soluciones estándar, reemplazando la solución de Trolox por 100 μL de muestra. Todo el procedimiento se realizó por triplicado.

Los resultados para cada muestra se representan como mg equivalentes de Trolox por cada 100 mL de muestra.

III.10.3. Capacidad antioxidante por ABTS

El ensayo se fundamenta en cuantificar la decoloración del radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) cuando este reacciona con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El fenómeno se caracteriza por un cambio en la coloración verde-azul propia del radical a una coloración amarilla indicativa de la reducción del radical ABTS \cdot . El cambio en la coloración está directamente relacionado con el porcentaje de inhibición del radical, este se determina en función del tiempo de reacción y de la concentración del antioxidante (Re *et al.*, 1999).

Para el ensayo de ABTS se siguió el método establecido por Re *et al.*, (1999) con algunas modificaciones. El ensayo de ABTS implica en un primer término la producción del radical libre ABTS \cdot de color verde-azul intenso, este se genera por una oxidación a partir de una solución de ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM en metanol. Esta solución se incubó en completa obscuridad a temperatura ambiente durante 16



horas. Posterior al tiempo de incubación, el radical ABTS formado se diluye aproximadamente 1:20 con metanol hasta tener un máximo de absorción de 0.7 (± 0.02) a una longitud de onda de 734 nm.

Se realizó una curva de calibración con Trolox a concentraciones finales de 0-30 μM (anexo 7). Cada solución de la curva contenía 1.94 mL del radical ABTS diluido, de 0 a 60 μL de solución madre de Trolox (1000 μM), las soluciones fueron llevadas a un volumen final de 2 mL con agua desionizada, tomando como control la solución sin presencia de Trolox. La absorbancia de la reacción fue medida al tiempo 0 y 30 minutos después de iniciada la reacción. La cuantificación de la capacidad antioxidante de las muestras se llevó a cabo bajo el mismo procedimiento reemplazando únicamente el estándar y el agua por 60 μL de muestra reconstituida. Todo el procedimiento se llevó a cabo por triplicado.

Los resultados obtenidos se expresaron en términos de mg equivalentes de Trolox por cada 100 mL de muestra.

III.11. Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) por comparación de medias a través de una prueba de tukey para todos los resultados del estudio.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Enriquecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota con selenito de sodio

El color rosa-rojizo de los cultivos lácticos en presencia de Se es indicativo de la reducción del selenito de sodio a Se elemental y/o especies orgánicas de Se, mismas formas químicas de selenio que presentan mayor grado de biodisponibilidad para el organismo humano (Xia *et al.*, 2007). En este estudio, se encontró que al final de la fermentación los matraces presentaron diferencias notables en el color del cultivo, lo cual se puede observar en la Figura 3. El matraz con el cultivo control Figura 3 (A) conservó un color blanco, mientras que el matraz con el cultivo enriquecido con Na_2SeO_3 Figura 3 (B), se tornó de un color rosa-rojizo.

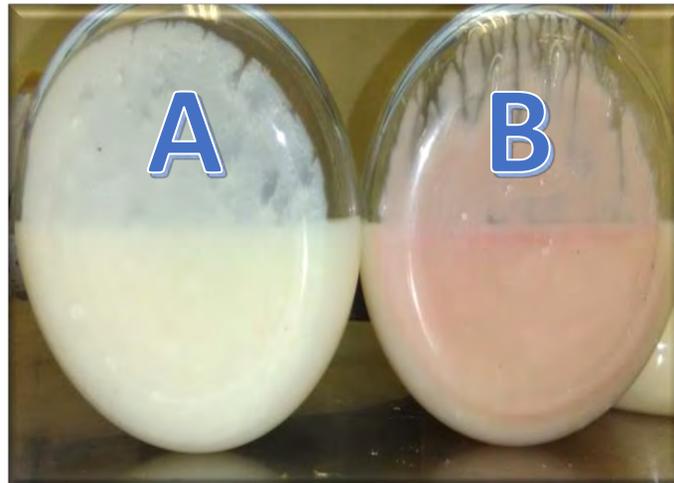


Figura 3. Coloración de cultivos después de la fermentación
A: cultivo control (sin Se) B: cultivo enriquecido con Se.

En un estudio similar, esta misma característica de color se presentó cuando se hicieron crecer 25 diferentes especies de lactobacilos bajo cuatro concentraciones distintas de Na_2SeO_3 demostrando que, el color de los medios de cultivo también es



dependiente de la especie bacteriana enriquecida y la concentración de Se presente en el medio y que este puede ir desde rosáceo a rojo intenso (Saini *et al.*, 2014).

Sin embargo, esta coloración solo se observa cuando las concentraciones de Se son superiores a 50 µg por cada gramo de medio (leche) fermentado por lactobacilos (Alzate *et al.*, 2008). En cambio, cuando la fermentación se lleva a cabo con lactobacilos y levaduras en combinación, como es el caso de la leche fermentada *kéfir*, este cambio de color se detecta cuando la concentración de Se tienen un mínimo de 5 µg por cada gramo de medio, este efecto se ha demostrado a través de ensayos de microscopía electrónica de muestras liofilizadas (Alzate *et al.*, 2008).

Este cambio de coloración está relacionado a la reducción del selenito adicionado (gris) a los medios, el cual pasa a Se elemental (rojo) (Pescuma *et al.*, 2017). Por lo tanto, basándose en los resultados de los estudios mencionados anteriormente, el cambio de coloración presentado en el cultivo de *L. casei* Shirota selenizado, refleja la reducción del Na₂SeO₃ a Se elemental o bien a especies orgánicas del Se.

IV.2. Estudio de viabilidad de L. casei Shirota durante la fermentación

La viabilidad de un probiótico es dependiente de la composición de la matriz donde se desarrolle. Diversos estudios han demostrado que la viabilidad de las BAL disminuye de manera significativa cuando se exponen a la presencia de Se, aun cuando tienen la capacidad de biotransformarlo (Deng *et al.*, 2015; González-Olivares *et al.*, 2016; Martínez, 2016).

En este estudio se observó que la presencia de Se tiene un efecto negativo en la viabilidad de *L. casei* Shirota al final de la fermentación y en el producto liofilizado (Fig. 4). Se observa un descenso significativo (**P=0.05**) cercano a 1 ciclo logarítmico en la viabilidad del microorganismo selenizado, en comparación con el microorganismo control



al inicio y final de la fermentación. Sin embargo, no se observa diferencia significativa ($P=0.05$) en la viabilidad del probiótico en ambos polvos liofilizados reconstituidos (Fig. 4). Adicionalmente, la concentración de microorganismos en el liofilizado se mantuvo en niveles superiores a 10^6 UFC/mL, esto representa una ventaja ya que al tratarse de un polvo que pudiera utilizarse como un ingrediente funcional, el probiótico se mantiene en niveles aceptables de viabilidad para poder sobrevivir al tracto gastrointestinal, proliferar en el intestino y ejercer su función biológica (Champagne, Ross, Saarela, Hansen & Charalampopoulos, 2011; Holzapfel *et al.*, 1998).

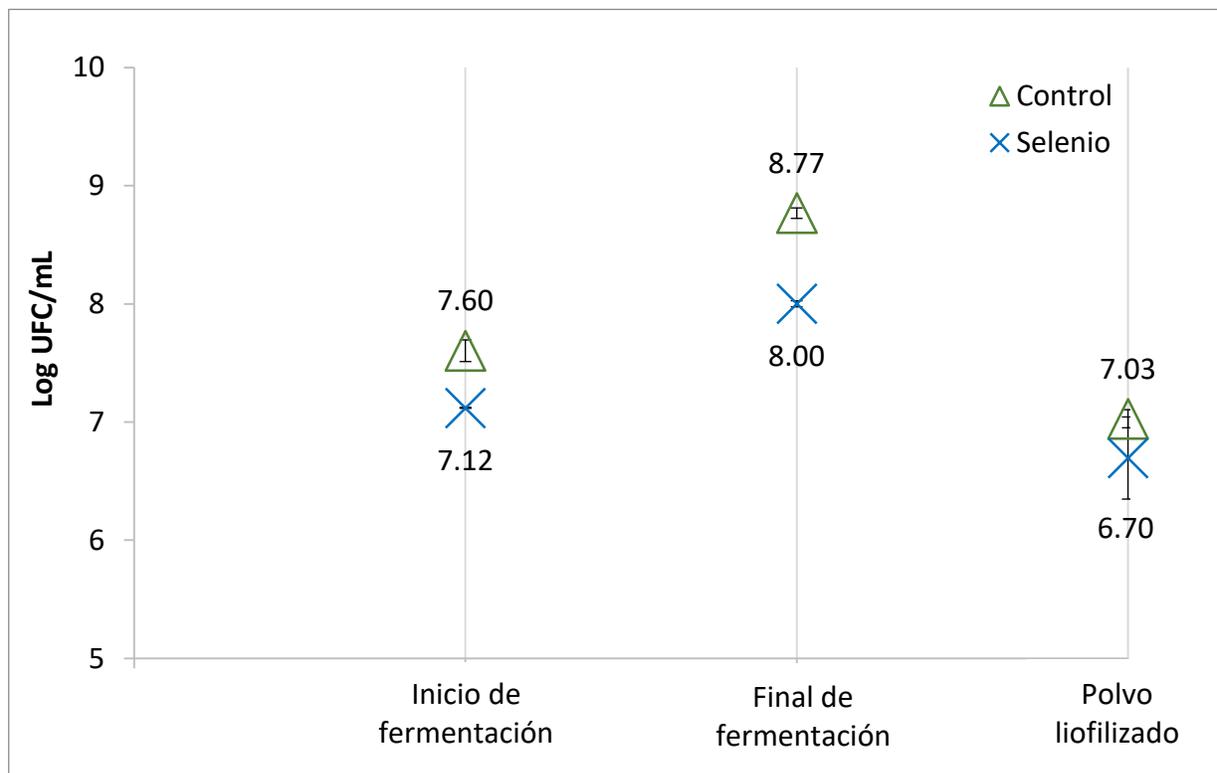


Figura 4. Viabilidad de *L. casei* Shirota con y sin enriquecimiento de Se.

La disminución de la viabilidad de la bacteria durante la fermentación se atribuye principalmente a la presencia de Se en el medio, la cual provoca un estado de estrés celular al que las bacterias responden detoxificando el medio, mientras se adaptan a él (Andreoni, Moro, Cavalca, Erba & Ciappellano, 2000). Se sabe que el modo de



detoxificación del Se en el medio por algunas bacterias ácido lácticas, es transformándolo en especies orgánicas de Se o en Se elemental (Bock, Rother, Leibundgut & Ban, 2006).

Estos resultados coinciden con aquellos de Pusztahelyi *et al*, (2015) quienes reportaron que la viabilidad de *L. casei* fermentado a diferentes temperaturas (28-37°C), disminuyó considerablemente cuando el medio de desarrollo fue enriquecido con 100 y 200 mg/L de NaHSeO₃. No obstante, a pesar de la disminución en la viabilidad se comprobó que, del Se total absorbido el 80% fue promovido a la conversión de Se orgánico.

Por lo tanto, someter a las bacterias a condiciones de fermentación diferentes a las de su desarrollo común, repercute directamente en su metabolismo. Esta repercusión se observa en el aumento del tiempo en la fase de adaptación, disminuyendo la capacidad de replicación del microorganismo y su capacidad proteolítica inmediata. Sin embargo, esto no siempre tiene influencia en la absorción y transformación de Se (González *et al.*, 2016; Segovia, 2017).

IV.3. Análisis de absorción de selenio

A partir de los resultados obtenidos se comprobó que cuando la concentración de Se en el medio de enriquecimiento corresponde a 196 mg/L, el porcentaje de Se en el liofilizado fue de 2.19% (p/v), el cual corresponde en un 100% al Se absorbido por el microorganismo durante el enriquecimiento.

La capacidad de absorber el Se presente en el medio por lactobacilos ya se ha reportado previamente por Saini *et al*, (2014) quienes calcularon una absorción total de Se del 28.8% para *Lactobacillus reuteri* NCD77. Además, la absorción mostrada por este microorganismo en medios de fermentación con proteínas de suero de leche es menor a la reportada para *L. bugarius* y *L. johnsonii* (9.14 y 10.8 %, respectivamente)



por González-Olivares *et al.*, (2016). Sin embargo, en este estudio, la concentración de Se absorbido es suficiente para cubrir la ingesta diaria recomendada (Rayman, 2012), si se toma en cuenta que el análisis se llevó a cabo para 10 g de liofilizado reconstituido en 100 ml de agua

Estos resultados significan una ventaja debido a que la preparación de alimentos enriquecidos con Se biodisponible, en muchos de los casos, se realiza a través del Se inorgánico biotransformado por microorganismos que además son cultivos iniciadores en el proceso de manufactura, como es el caso de las leches fermentadas (Deng *et al.*, 2015). Adicionalmente, los lactobacilos selenizados forman parte de una alternativa como fuente de Se dietario orgánico (Saini *et al.*, 2014).

Varios autores han detectado que cuando se encuentra Se inorgánico en el medio, los lactobacilos y bifidobacterias son capaces de inhibir la producción de cisteína para iniciar la producción de selenocisteína. Entre mayores sean los requerimientos de cisteína para el desarrollo microbiano, es mayor el porcentaje de Se absorbido durante el crecimiento (Xia *et al.*, 2007; Pophaly *et al.* 2014). Es por ello que una considerable parte del Se que es introducido en las bacterias, es transformado como selenocisteína (Pusztahelyi *et al.*, 2015).

La incorporación de Se a la célula regularmente se relaciona con un aumento en la producción de enzimas como glutatión peroxidasa, lo cual se demostró cuando una cepa de *L. casei* 431 enriquecida con NaHSeO₃ aumentó la concentración de glutatión y glutatión reductasa en 9.1% y 33% respectivamente después de la fermentación en medio MRS (Pusztahelyi *et al.*, 2015). En el mismo sentido, se ha reportado que el 80% del Se acumulado por *L. casei spp casei* está asociado a moléculas de selenocisteína (Calomme, HuK, Branden & Vanden, 1995).



IV.4. Estudio del perfil proteolítico

IV.4.1. Determinación de grupos amino libres por el método de ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)

Con el objetivo de evaluar la hidrólisis proteica en la fermentación a partir de una curva de calibración con glicina (Anexo 2), se obtuvo la concentración de grupos aminos libres al inicio y al final de la fermentación, así como del polvo liofilizado reconstituido al 10%.

A partir de los resultados obtenidos, se mostró que el estrés provocado por la presencia de Se en el medio, afecta la actividad metabólica de la bacteria. En la Figura 5 se observa que, durante la fermentación igual que la viabilidad de la bacteria, la producción de grupos amino libres es significativamente menor (**P=0.05**) en el medio hidrolizado con la bacteria selenizada en comparación con el medio hidrolizado con la bacteria control. En ambos hidrolizados se observa que la concentración de grupos amino libres aumenta de manera significativa (**P=0.05**) durante la fermentación y al final de la liofilización.

Los resultados reflejan lo que ya se ha reportado previamente acerca de la producción de grupos amino libres, la cual está directamente relacionada con el grado de hidrólisis proteica en el medio y esta a su vez con el metabolismo bacteriano. Esto da como resultado, la liberación de péptidos de bajo peso molecular e incluso de aminoácidos. Además, es sabido que la hidrólisis proteica depende del requerimiento nutricional, específicamente de aminoácidos, y de la especificidad del sistema proteolítico de cada bacteria (Kunji *et al.*, 1996; Savijoki *et al.*, 2006).



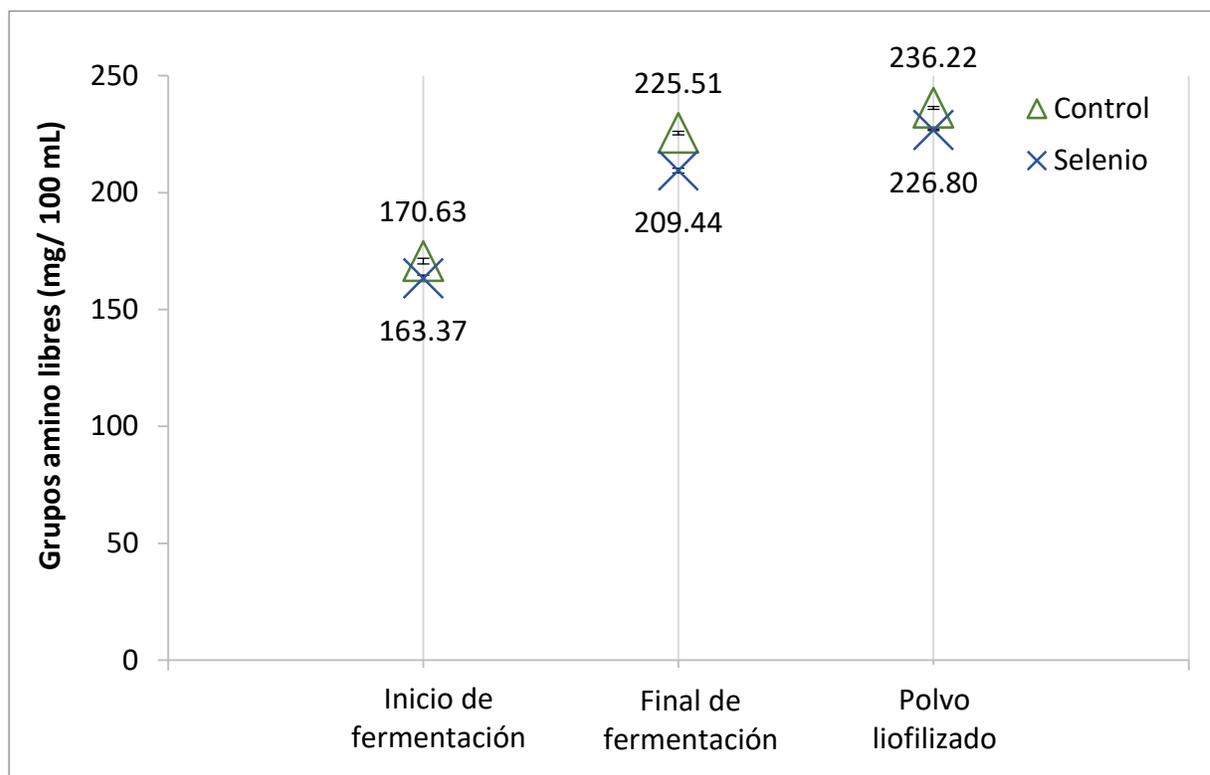


Figura 5. Concentración de grupos amino libres producidos por *L. casei* Shirota con y sin enriquecimiento de Se.

IV.3.1. Separación de péptidos de bajo peso molecular por electroforesis en gel de poliacrílamida (SDS-PAGE)

La electroforesis se considera un método efectivo para la separación de proteínas de leche (Jovanović *et al.*, 2005; Walstra *et al.*, 1987). A partir de esta técnica se evaluaron los pesos moleculares de seroproteínas de WPC-80 y WPC-80 hidrolizado con *L. casei* Shirota y *L. casei* Shirota enriquecido con Se.

En la figura 5 se observa que las fracciones proteicas del WPC-80 (carril W) son comparables con las reportadas en la bibliografía, revelando la presencia de proteínas de lactosuero, como lactoferrina, SAB, y α -LA (Jovanović *et al.*, 2005; Walstra *et al.*, 1987). Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre las pruebas de los



hidrolizado con bacterias enriquecidas y sin enriquecer (carriles WB y WBS). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Palomo *et al*, (2014) quienes observaron que la incorporación de Se durante el proceso de fermentación de yogurt no produjo cambios en la síntesis de fracciones peptídicas frente a un yogurt sin adición de Se.

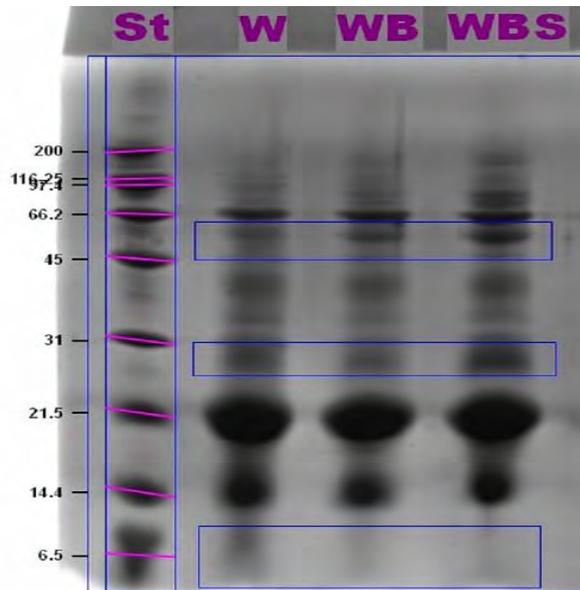


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE de muestras reconstituidas al 5% p/v. St=estándar, W= WPC-80, WB=Hidrolizado proteico con *L. casei* Shirota control, WBS=hidrolizado proteico con *L. casei* Shirota selenizado.

Se presentó evidencia de hidrólisis de proteínas, la cual derivó en la liberación de fracciones peptídicas menores a 6.5 kDa. Esto se observa en los carriles WB y WBS donde se evidencia la disminución de la concentración de estos péptidos. Estos resultados son relevantes ya que, en diversos estudios, se ha comprobado que las fracciones con pesos moleculares menores a 15 kDa son de singular importancia debido a que algunas de ellas llegan a tener diferentes actividades biológicas (O’Keeffe, Conesa & FitzGerald, 2017; Peng *et al*, 2009; Virtanen *et al.*, 2007).



Se ha observado que las bacterias ácido lácticas son capaces de hidrolizar proteínas de leche generando péptidos de bajo peso molecular (2.68 - 0.87 KDa), los cuales llegan a tener una actividad biológica importante como la de inhibir la enzima convertidora de angiotensina (González-Olivares *et al.*, 2011). También se han demostrado algunas otras actividades biológicas como la antimicrobiana, hipocolesteromiante, opioide entre otras (Hettiarachchy, 2012).

La importancia biológica de los péptidos de bajo peso molecular está en que al ser liberados se acumulan y algunos de ellos tienen la capacidad de crear un ambiente antioxidante (Medrano & del Castillo, 2011; Peng, Xiong & Kong, 2009). Peng *et al.*, (2009) evidenciaron que algunos de los péptidos liberados de proteínas de suero de leche después de hidrolizarlas con alcalasa, poseen capacidad antioxidante. Esta característica se puede confirmar a través de análisis químicos (Virtanen *et al.*, 2007).

IV.5. Evaluación de capacidad antioxidante

En diversos estudios se ha demostrado que la capacidad antioxidante de las proteínas de suero lácteo o bien de los péptidos del suero lácteo aparece después de haber sido sometidos a una hidrólisis enzimática (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2009) o bien por fermentación microbiana (Virtanen *et al.*, 2007).

En estudios de este tipo, donde el Se juega un papel importante, los ensayos para determinar la capacidad antioxidante se han realizado en suero sanguíneo de animales después de suministrar dietas con bacterias lácticas enriquecidas con Se, con el objetivo de evaluar la expresión de las enzimas antioxidantes como el glutatión peroxidasa. En estos estudios se justifica que, al haber un aumento en la actividad o concentración de las enzimas hay mayor capacidad antioxidante en el suero sanguíneo, o que aumenta protección por los daños causados por las especies reactivas de oxígeno (Dalia *et al.*, 2017., Gan *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2011).



En este estudio, la evaluación de la capacidad antioxidante (CA) de los hidrolizados proteicos se realizó mediante los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP. Los resultados obtenidos para cada ensayo se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Capacidad antioxidante de hidrolizados proteicos

	DPPH (mg eq. Trolox/100 mL)		ABTS (mg eq. Trolox/100 mL)		FRAP (mg eq. Fe ²⁺ /100 mL)	
	C.A.	D.S.	C.A.	D.S.	C.A.	D.S.
<i>WPC Blanco</i>	63.35	±1.89	113.52	±2.01	66.57	±0.63
<i>WPC B. control</i>	74.48	±1.23	150.25	±3.9	78.55	±0.25
<i>WPC B. enriquecida</i>	109.87	±5.15	127.74	±2.43	70.22	±0.43

C.A.= Capacidad antioxidante. D.S. =Desviación estándar
WPS=blanco (sin bacteria), WPS=bacteria control, WPS=bacteria enriquecida con Se.

Se determinó que la capacidad antioxidante por ABTS y FRAP muestran el mismo comportamiento, donde, la CA es menor en los hidrolizados con la bacteria enriquecida con Se en comparación con los hidrolizados con la bacteria control. Por otro lado, los resultados obtenidos por DPPH demuestran que la presencia de Se en el medio de cultivo, aumenta significativamente (**P=0.05**) la capacidad antioxidante del hidrolizado proteico.

Esta diferencia entre los métodos se debe a que el mecanismo de reacción de cada ensayo es diferente. Sin embargo, los resultados obtenidos en los tres ensayos demostraron que ambas bacterias tienen el potencial para aumentar de manera significativa (**P=0.05**) la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos en comparación con la proteína sin hidrolizar. Lo anterior se atribuye principalmente a la liberación de péptidos de bajo peso molecular posterior la fermentación y probablemente a la acción del Se en enzimas como la glutatión peroxidasa, producida en la fermentación después del enriquecimiento.

Virtanen *et al*, (2007) demostraron que diferentes especies de lactobacilos tienen la facultad de aumentar la capacidad antioxidante del lactosuero después de ser



fermentados con estas bacterias. Entre las bacterias con mayor capacidad de inhibir la formación del radical ABTS está *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 con 29% y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 con 42% de inhibición. En el mismo sentido, Dalia *et al*, (2017) reportaron 4 cepas aisladas de rumen, identificadas como *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*, que al ser enriquecidas con Se tienen la capacidad de introducir parte de este a sus proteínas y a la vez aumentar la capacidad antioxidante de estas.

Muchos de los péptidos de bajo peso molecular, pueden compartir diferentes actividades biológicas (O’Keeffe *et al.*, 2017), determinaron que 5 péptidos menores de 5 kDa derivados de hidrólisis enzimática de WPC-80 contenían capacidad antioxidante y antihipertensiva. Estos péptidos tienen secuencias aminoacídicas diversas, sin embargo, se sabe que los péptidos con aminoácidos no polares tienen mayor capacidad antioxidante.

La presencia de un probiótico selenizado en un conjunto de proteínas hidrolizadas, son un ejemplo de la combinación de diferentes factores funcionales en una sola matriz. Esto conlleva a la investigación integral de los beneficios a la salud.



V. CONCLUSIONES

El WPC-80 mostró ser una matriz que mantiene la viabilidad de *L. casei* Shirota al finalizar un proceso de fermentación y liofilización, aun cuando el probiótico ha sido selenizado, quedando como un hecho que *L. casei* Shirota es capaz de absorber Se del medio.

La liberación de péptidos de bajo peso molecular, con probable bioactividad, durante la fermentación se evidenció tanto para el probiótico selenizado como para el nativo, y se corroboró que la adición de Se en el metabolismo de *L. casei* Shirota no afecta en la liberación de estos.

El WPC-80 no ejerce un potencial antioxidante superior al que tienen estas proteínas hidrolizadas con un probiótico selenizado. Es así que este hidrolizado tiene un potencial como ingrediente funcional, toda vez que esta investigación ha demostrado que la combinación de un probiótico selenizado que hidroliza proteínas de suero, puede ejercer un beneficio a la salud.



VI. REFERENCIAS

- Alder-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysate by trinitrobenzensulfonic acid. *Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262.
- Alzate, A., Fernández-Fernández, A., Pérez-Conde, C. M., Gutierrez, M. A & Cámara, C. (2008). Comparison of Biotransformation of Inorganic Selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in Lactic Fermentation Process of Yogurt and kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8728-8736.
- Andreoni, V., Moro, M. L., Cavalca, L., Erba, D & Ciappellano, S. (2000). Selenite tolerance and accumulation in the lactobacillus species. *Annals of Microbiology*, 50(1), 77-88.
- Bayram, T., Pekmez, M., Arda, N & Yalcin, S. A. (2008). Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. *Talanta*, 75, 705-709.
- Benzie, F. F & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power". the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Bock, A., Rother, M., Leibundgut, M & Ban, N. (2006). Selenium metabolism in prokaryotes. In D. B. Hatfield, *Selenium* (págs. 9-28). Boston, MA: Springer.
- Bounous, G. (2000). whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Research*, 20, 4785-4792.
- Bounous, G., Batist, G & Gold, P. (1989). Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clinical & Investigative Medicine*, 12, 154-161.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, E. M & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 1(28), 25-30.
- Calomme, M., HuK, J., Branden, V. D & Vanden, B. D. (1995). Seleno-lactobacillus. *Biological Trace Element Research*, 47, 379-383.
- (CANILEC), C. N. (2011). *El libro blanco de la leche y los productos lácteos* (Primera ed.). México, D.F.
- Champagne, P. C., Ross, P. R., Saarela, M., Hansen, F. K & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 185-193.
- Creamer, L. K., Parry, D & Malcolm, G. N. (1983). Secondary structure of bovine b-lactoglobulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 221(1), 98-105.



- Dalia, A., Loh, T. C., Sazli, A. Q., Jahromi, M. F & Sansudin, A. A. (2017). Characterization and Identification of organic selenium enriched bacteria isolated from rumen fluid and hot spring water. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 45(4), 343-353.
- Dalia, M. A., Loh, T. C., Sazili, Q. A., Jahromi, F. M & Samsudin, A. A. (2017). The effect of dietary bacterial organic selenium on growth performance, antioxidant capacity, and selenoproteins gene expression in broiler chickens. *BMC Veterinary Research*, 13:254.
- Deng, Y., Man, C., Fan, Y., Wang, Z., Li, L., Ren, H & Jiang, Y. (2015). Preparation of elemental selenium-enriched fermented milk by newly isolated *Lactobacillus brevis* from kefir grains. *International Dairy Journal*, 44, 31-36.
- FAO, & OMS. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estudio FAO alimentación y nutrición*.
- Ford, A & Dahl, J. W. (2012). Functional Foods. *The Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida*. Obtenido de <http://edis.ifas.ufl.edu/fs210>
- Galano, E., Mangiapane, E., Bianga, J., Palmese, A., Pessione, E., Szpunar, J & Amoresano, A. (2013). Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12, 2196-2204.
- Gan, F., Chen, X., Liao, F. S., Lv Chenhui, R. F., Ye, G., Pan, C & Huang, K. (2014). Selenium-enriched probiotics improve antioxidant status, immune function, and selenoprotein gene expression of piglets raised under high ambient temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20).
- González-Olivares, G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L & García-Garibay, M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 179-188.
- González-Olivares, L. G., Contreras-López, E., Flores-Aguilar, J. F., Rodríguez-Serrano, A., Castañeda-Ovando, A., Jaimez-Ordaz, J & Cruz-Guerrero, A. E. (2016). Inorganic selenium uptake by *Lactobacillus spp.* *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(1), 33-38.
- González-Olivares, L. G., López-Cuellar, Z. L., Añorve-Morga, J., Franco-Fernández, M. J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E & Rodríguez-Serrano, G. M. (2014). Viability and proteolytic



- capacity of *Lactobacillus burgaricus* 2772 and *Lactobacillus rhamnosus* GG during cheese ripening. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2, 7-12.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolome, B & Amigo, L. (2005). Preparation and antioxidant enzymatic hdrolysates from a-lactalbumin and b-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 588-583.
- Hernández-Rojas, M & Vélez-Ruiz, F. J. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, 8(2), 13-22.
- Hettiarachchy, S. N. (2012). *Bioactive food proteins and peptides - Applications in human health*. New York: CRC Press.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J & Schillinger, U. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85-101.
- Huang, D., Ou, B & Prior, L. R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Jovanović, S., Barać, M & Maćej, O. (2005). Whey proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo*, 55(3), 215-233.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N & Marshall, M. (2012). Food proteins and peptides as bioactive Agents. In N. Hettiarachchy, *Bioactive food proteins and peptides - Applications in human health* (págs. 16-29). New York: CRC Press.
- Kieliszek, M & Blazejak, S. (2013). Selenium: Significacnce, and outlook for supplementation. *Nutrition*, 29, 713-718.
- Kim, S.-K., Wijesekara, I., Young, P. E., Matsumura, Y., Nakamura, Y & Sato, K. (2012). Proteins and peptides as antioxidants. In S. N. Hettiarachchy, *Bioactive food proteins and peptides applications in human health* (págs. 97-116). New York: CRC Press.
- Kinsella, E. J & Whitehead, D. (1989). Proteins in whey: chemical, physical, and fucntional properties. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 33, págs. 343-438). New York: Academic Press .
- Kunji, E. R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B & Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 187-221.



- Lamberti, C., Mangiapane, E., Passione, A., Mazzoli, R., Giunta, C & Pessione, E. (2011). Proteomic characterization of a selenium-metabolizing probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM for nutraceutical applications. *Proteomics*, 11(11), 2211-2221.
- Lin, J., Peng, T., Jiang, L., Jia-Zuan, N., Liu, Q., Chen, L & Zhang, Y. (2015). Comparative genomics reveals new candidate genes involved in selenium metabolism in prokaryotes. *Genome Biology and Evolution*, 7, 664-676.
- Lönnnerdal, B., Vargas-Fernández, E & Whitacre, M. (2017). Selenium fortification of infant formulas: does selenium form matter? *Food & Function*, 8, 3856-3868.
- Markus, C. R., Oliver, B & de Haand, E. H. (2002). Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75, 1051-1056.
- Martil, D. E. (2014). *Estudos estruturais da seril-tRNA sintetase nativa e em interacao com tRNAs congatos de Trypanosoma brucei*. Tesis de doctorado, Universidade de Sao Paulo, Brasil.
- Martínez, R. X. (2016). *Capacidad de bioconversión de Selenio inorgánico por bacteras ácido lácticas desarrolladas en un medio enriquecido*. Tesis de especialidad, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Medrano, A & del Castillo, M. D. (2011). Obtención de péptidos antioxidantes de glicina de soja. *Revista del Laboratorio Tecnológico de Uruguay*, 6, 32-36.
- Mulero, C. J., Zafrilla, R. P., Martínez-Cachá, M. A., Leal, H. M & Abellán, A. J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 23(5), 219-227.
- Muro, U. C., Álvarez, F. R., Riera, R. F., Arana, C. A & Téllez, J. A. (2011). Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17(4), 293-317.
- Nagpal, R., Behare, P., Rana, R., Kumar, A., Kumar, M., Arora, S & Yadav, H. (2011). Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food & Function*, 2, 18-27.
- O'Keeffe, B. M., Conesa, C & FitzGerald, J. R. (2017). Identification of angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides in a whey protein concentrate hydrolysate produced at semi-pilot scale. *International Journal of Food Science and Technology*, 28(8), 1751-1759.



- Pacheco, B. M., Bighetti, A. É., Carvalho, J. D., Possenti, A & Sgarbieri, V. (2006). Antiulcerogenic activity of fraction and hydrolysate obtained from whey protein concentrate. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15-22.
- Palomo, M., Gutiérrez, M. A., Pérez-Conde, C., Cámara, C & Yolanda, M. (2014). Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt. *Food chemistry*, 164, 371-379.
- Parra, H. R. (2010). Review lactic acid bacteria: Funcional role in the foods. *Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia*, 8(1), 93-105.
- Parvez, S., Malik, K., Kang, S. A & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1171-1185.
- Peng, X., Xiong, L. Y & Kong, B. (2009). Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*, 113, 196-201.
- Pereira, C., Henriques, M., Gomes, D., Gomez-Zavaglia & de Antoni, G. (2015). Novel functional whey-based drinks with great potencial in the dairy industry. *Food Technology & Biotechnology*, 53(3), 307-314.
- Pérez, G. H. (2000). Electroforesis de geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-41.
- Pescuma, M., Gomez-Gomez, B., Perez-Corona, T., Font, G., Madrid, Y., & Mozzi, F. (2017). Food prospects of selenium enriched-*Lactobacillus acidophilus* CRL 636 and *Lactobacillus reuteri* CRL 1101. *Journal of Funtional Foods*, 35, 466-473.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 347-356.
- Pophaly, S. D., Poonam, Singh, P., Kumar, H., Tomar, S. K & Singh., R. (2014). Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: A funtional food perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 39, 135-145.
- Pusztahelyi, T., Szilvia, K., István, P & Prokisch, J. (2015). Selenite-stress selected mutant strains of probiotic bacteria for Se sourse production. *Journal of Trace Elements in Medicine an Biology*, 30, 96-101.
- Rayman, P. M. (2000). The importance of selenium and human health. *The Lancet*, 356, 233-241.



- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rebouillat, S & Ortega-Requena, S. (2015). Potential applications of milk fractions and valorization of dairy by-products: A review of the state-of-the-art available data, outlining the innovation potential from a bigger sata standpoint. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 6, 176-203.
- Ren, Z., Zhao, Z., Wang, Y & Huang, K. (2011). Preparation of selenium/zinc-enriched probiotics and their effect on blood selenium and zinc concentrations, antioxidant capacities, and intestinal microflora in canine. *Biological Trace Element Research*, 141, 170-183.
- SAGARPA. (2017). Panorama de la leche en México. Obtenido de http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche_Septiembre2016.pdf
- Saini, K., Tomar, K. S., Sangwan, V & Bhushan, B. (2014). Evaluation of lactobacilli from human sources for uptake and acumulation of selenium. *Biological Trace Element Research*, 160, 433-436.
- Salinas, G. (2010). Bioquímica de la selenicisteína, el 21er aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana. *Mensaje Bioquímico*, 34, 121-133.
- Sánchez-Martínez, M., Pérez-Corona, T., Cámara, C & Madrid, Y. (2015). Preparation and characterization of a laboratory scale selenomethionine enriched bread. Selenium bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 120-127.
- Savijoki, K., Ingmer, H & Varmanen, P. (2006). Proteolytic system of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- Schomburg, L & Köhrle, J. (2008). On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 1235-1246.
- Segovia, C. J. (2017). *Efecto de la presencia de serina en medio mínimo, sobre la producción de selenocisteína por Streptococcus thermophilus*. Tesis de especialidad, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Sgarbieri, C. V. (2017). Impact of bovine milk whey proteins and peptides on gastrointestinal, immune, and other sistems. In R. R. Watson, J. R. Collier & R. V. Preedy, *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan* (págs. 31-55). USA: Elsevier Inc.

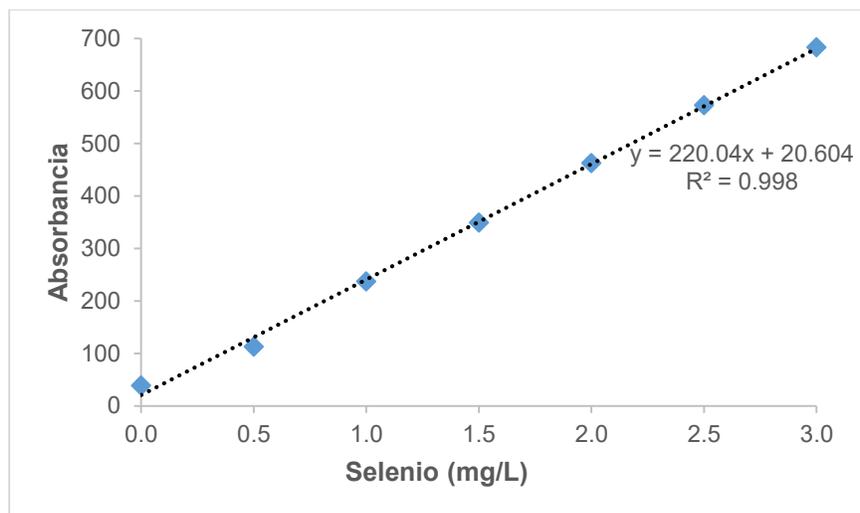


- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J & Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, 101, 1501-1508.
- Steinbrenner, H & Sies, H. (2013). Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: Implications for disorders in the central nervous system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 536, 152-157.
- Torres, L. M. (2005). Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55(2), 111-117.
- Ursuni, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J & Flohe, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 285, 1393-1396.
- Vázquez, S., Crosa, M. J., Rey, F & Lopretti, M. (2009). Viabilidad del uso de suero de quesería como base del medio de cultivo de la cepa nativa probiótica *Lactobacillus paracasei* HA9-2. *Revista del Laboratorio del Uruguay*(4), 10-14.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S & Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106-115.
- Walstra, P & Jenness, R. (1987). *Química y física lactológica*. Zaragoza, España: Acribia.
- Xia, K. S., Chen, L & Liang, Q. J. (2007). Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2413-2417.
- Zamora, V. R. (2011). *Elaboración de un alimento funcional a base de Saccharomyces boulardii e inulina*. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Michoacán, México.

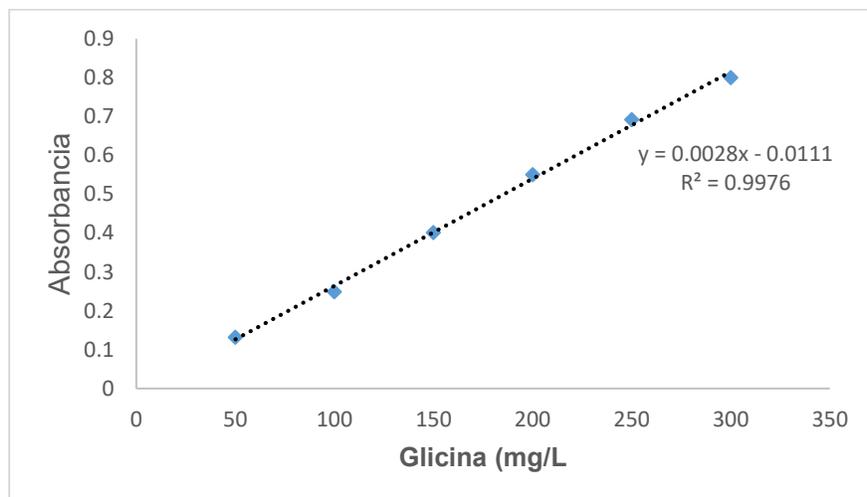


VII. ANEXOS

I. Curva de calibración para ICP-MS



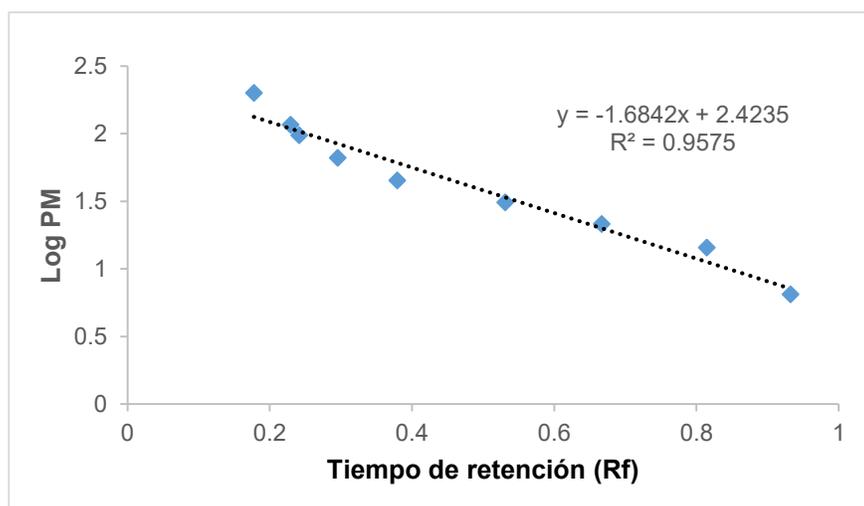
II. Curva de calibración para TNBS



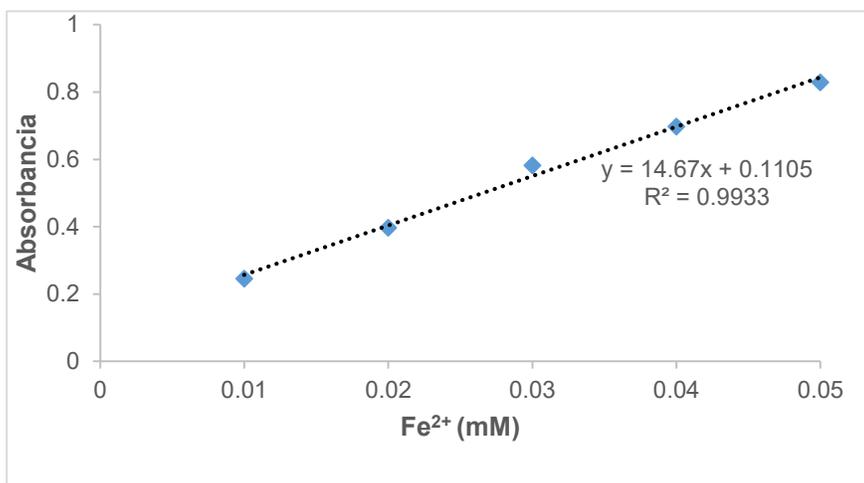
III. Estándar de amplio rango Bio-Rad

Proteína	Peso molecular (KDa)	Proteína	Peso molecular (KDa)
Miosina	200	Anhidrasa carbónica	31.0
β -galactosidasa	116.25	Inhibidor de tripsina	21.5
B-Fosforilasa	97.40	Lisosima	14.4
Seroalbúmina	66.20	Aproteínina	6.5
Ovoalbúmina	45.0		

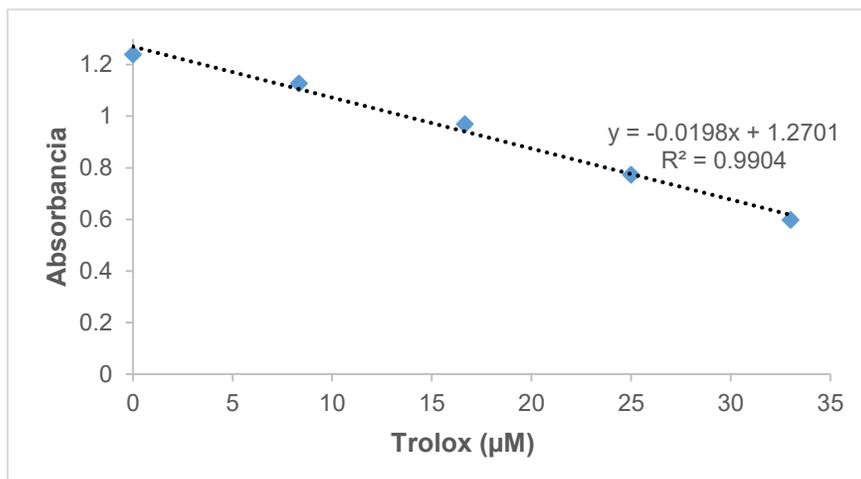
IV. Curva patrón estándar de electroforesis SDS-Page



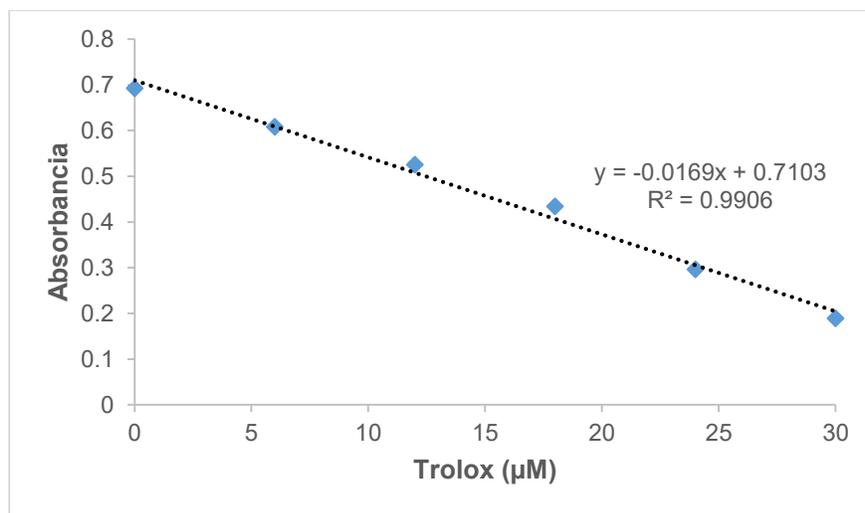
V. Curva de calibración para FRAP



VI. Curva de calibración para DPPH



VII. Curva de calibración para ABTS





LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN Y LA
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Otorga a

García Mora C., González Olivares L. G., Castañeda Ovando A.,
Contreras López E., Ayala Niño A.

la presente

Constancia

por su participación en el trabajo en MODALIDAD CARTEL, con título:

“Capacidad antioxidante de un concentrado de proteínas de lactosuero
hidrolizadas por fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota
enriquecido con selenio inorgánico”

presentado en



Realizado el día 23 al 25 de Mayo del 2018 en el Auditorio Dr. Reyes
Tamez Guerra de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad
Autónoma de Nuevo León.

M. C. . Karla Guadalupe
García Alanís
Jefa de la L.C.A.
Coord. del Congreso F.C.B.

Dr. Juan Gabriel Báez
González
Jefe del Depto. Alimentos
Coord. del Congreso F.C.B.

Dra. Ma. del Rosario
Abraham Juárez
Directora del Depto. Alimentos
Coord. del Congreso U de Gto.

