

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA



“Bioconversión de Selenio inorgánico por bacterias ácido lácticas en un medio enriquecido”

TESIS

Que para obtener el título de:

Licenciado en Química en Alimentos

Presenta:

Juan Francisco Flores Aguilar

Asesor:

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Codirectora:

Dra. Araceli Castañeda Ovando



Mineral de la Reforma Hidalgo, 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:**

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al pasante de la Licenciatura de Química en Alimentos **Juan Francisco Flores Aguilar**, quien presenta el trabajo de investigación "**Bioconversión de Selenio Inorgánico por bacterias ácido lácticas en un medio enriquecido**", después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, estos han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

Presidente	Dr. Javier Añorve Morga	
Primer vocal	Dr. Luis Guillermo González Olivares	
Segundo vocal	Dra. Araceli Castañeda Ovando	
Tercer vocal	Dra. Judith Jaimez Ordaz	
Secretario	Dra. Elizabeth Contreras López	
Primer suplente	Dr. José Antonio Rodríguez Ávila	
Segundo suplente	M. en C. Juan Ramírez Godínez	

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

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Pachuca Hidalgo, 20 de noviembre de 2014.

Dr. Gian Arturo Álvarez Romero
Coordinador Adjunto de la Licenciatura de
Química en Alimentos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE HIDALGO



CENTRO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICAS



PROMOTORSE

Área Académica de Química,
Cametero Pachuca-Tulancingo Km. 4.5,
Ciudad del Conocimiento, Colonia Carboneras,
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts 2206, 2201, Fax 6502
galanv@uaeh.edu.mx



Este trabajo se realizó en el laboratorio de biotecnología de alimentos 2 del edificio de Química en Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la asesoría del Dr. Luis Guillermo Gonzáles Olivares y la Dra. Araceli Castañeda Ovando.

El trabajo fue aceptado y aprobado para su presentación en modalidad de poster en el XXXV encuentro nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A. C. bajo el título de: “Estudio de la absorción de selenio inorgánico para la formación de seleno-proteínas intracelulares de bacterias lácticas”.

No tienes que ser grande para empezar...

pero tienes que empezar...

para ser GRANDE"

Liz Ligsar

Agradecimientos:

Primero, a Dios por permitirme realizar uno de mis más grandes sueños, una de mis principales metas y por la bendición de poder compartir y disfrutar este momento con mis seres queridos.

A mis padres gracias por su esfuerzo, dedicación y entera confianza. Gracias por su apoyo incondicional, por la orientación que me dieron. Agradezco enormemente los consejos que han sabido darme, el siempre estar a mi lado y ayudarme a enfrentar momentos difíciles, gracias por su paciencia y porque gracias a ellos he podido realizar uno de los principales sueños en mi vida.

A mi hermana por enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el mejor camino para lograr nuestros objetivos, gracias por tus comentarios, sugerencias, opiniones, por todos los momentos vividos, pero sobre todo por el apoyo incondicional que siempre he recibido de ti.

A mis profesores por transmitirme sus conocimientos y el formarme no solo de manera educativa sino también de manera ética y moral. Dr. Luis Guislermo gracias por las sugerencias por sus regaños por sus conocimientos, por su tiempo y por su paciencia. Dra. Elizabeth Contreras, Dr. Javier Añorve gracias por todos los consejos que me dieron y por ayudar a darme cuenta de lo que puedo llegar a ser capaz, muchas gracias por esas pláticas llenas de sonrisas y vivencias.

A mis sinodales, Dr. Luis Guillermo, Dra. Araceli Castañeda, Dra. Elizabeth Contreras, Dr. Javier Añorve, Dra. Judith Jaimez, Dr. José Antonio Rodríguez, M. en Q. Juan Ramírez gracias por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo, a sus observaciones y comentarios.

A mis compañeros y amigos, Carlos, Emmanuel, Estefanía, Isai, Jessica, Marsene, Martín, Olga, Oscar gracias por compartir más de cinco años de vivencias de risas de peleas, gracias por siempre acompañarme y ayudarme durante todo este tiempo.

A mis compañeros de laboratorio Emmanuel, Jessica, Xóchitl, Laira gracias por ayudarme durante el tiempo que compartimos el laboratorio, por explicarme diferentes técnicas, pero principalmente por hacer más llevadero el tiempo en laboratorio.

Por último quiero agradecer a todas aquellas personas que de alguna forma han intervenido en mi vida pues sin su ayuda todo lo que soy y lo que he logrado no hubiera sido posible,

¡¡¡GRACIAS POR SER PARTE DE MI VIDA!!!

Juan Francisco Flores Aguilar

INDICE

1. Introducción	10
2. Marco teórico	11
2.1 Bacterias ácido lácticas	11
2.1.1 Características generales.....	11
2.1.2 Lactobacilos.....	12
2.2 Selenio.....	12
2.2.1 Funcionalidad.....	12
2.2.2 Impacto en la salud	13
2.3 Selenoproteínas.....	15
2.3.1 Funciones biológicas.....	15
2.3.2 Mecanismo general de biosíntesis.....	16
2.3.3 Características y propiedades de selenocisteína.....	18
3. Justificación	20
4. Objetivos.....	21
5. Metodología.....	22
5.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas.....	22
5.1.1 Muestras	22
5.1.2 Aislamiento de <i>L. jhonsonni</i>	22
5.1.3 Adaptación de cepas puras	22
5.2 Cálculo de la concentración crítica de inhibición	22
5.3 Fermentación en medios suplementados con Na ₂ SeO ₃	23
5.4 Separación de biomasa	24
5.5 Determinación de biomasa seca	24
5.6 Análisis de selenio	24
6. Resultados y discusión	26
7. Conclusiones	36
8. Perspectivas	37
9. Anexo	38
10. Referencias	42

Glosario

[]: Concentración

%DER Porcentaje de desviación estándar relativa

σ : Desviación estándar

μg : Microgramos

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

BAL: Bacterias ácido lácticas

Cys: Cisteína

DNA: Ácido desoxirribonucleico

GPxs: Enzimas glutatión peroxidasas

ICP: Plasma de acoplamiento inductivo

L: Litros

mg: Miligramos

ml: Mililitros

Na₂SeO₃: Selenito de sodio

P₁: Peso del vial seco

P₂: Peso del vial con biomasa seca

P_m: Peso de la biomasa seca

P_p: Peso promedio

Se: Selenio

SeC: Selenocisteína

UFC: Unidades formadoras de colonias

1. Introducción

El selenio es un micronutriente esencial de naturaleza mineral y se ha demostrado que tiene un marcado efecto antioxidante; además, puede prevenir enfermedades del corazón y ayudar en el tratamiento de algunas otras enfermedades como el cáncer. El selenio se encuentra presente en el cuerpo humano en forma de selenoproteínas las cuales son más eficientes que sus homólogas con cisteína.

La deficiencia de selenio puede generar desórdenes neuromusculares; por ello, se ha propuesto una ingesta diaria recomendada para el ser humano de 55 $\mu\text{g}/\text{día}$ de selenio, la cual a pesar de ser una concentración muy baja no siempre es cubierta, debido a que el selenio no se encuentra disponible para su absorción por el organismo humano.

La familia de selenoproteínas más representativas en el cuerpo humano son las glutathion peroxidadasas, que realizan funciones vitales para el metabolismo humano involucradas en reacciones redox, de las cuales existen 8 tipos y 5 de ellos contienen a la selenocisteína en su centro activo.

Existen bacterias ácido láctico que en su metabolismo pueden introducir el selenio inorgánico en las cadenas polipeptídicas del ribosoma; para posteriormente, transformarlo a selenocisteína. Es por ello el interés en extraer y determinar la selenocisteína presente en proteínas internas de algunas especies de lactobacilos que son utilizados como cultivos iniciadores en procesos de transformación de alimentos; ya que, se ha demostrado que el enriquecimiento de alimentos con selenio confiere beneficios para la salud por su actividad antioxidante, antipatogénica, antimutagénica, anticancerígena y antiinflamatoria.

Debido a la importancia que tiene el selenio en la salud, el objetivo del presente trabajo fue cuantificar la concentración de selenio inorgánico absorbido por bacterias ácido lácticas durante un proceso de fermentación, con la finalidad de determinar el grado de biotransformación de este elemento. Para ello, se analizó el selenio inorgánico absorbido por bacterias ácido lácticas aisladas de productos fermentados comerciales y en de cepas puras.

2. Marco teórico

2.1 Bacterias ácido lácticas

2.1.1 Características generales

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos, debido a que se encuentran en productos de derivados de la leche como yogurt y quesos madurados, en productos cárnicos y en algunas hortalizas fermentadas. Actualmente las BAL son utilizadas principalmente para proporcionar sabor y textura e incrementar el valor nutricional de los alimentos. También son utilizadas como bioconservadores, debido a la producción de diferentes sustancias que ejercen acción antibacteriana que retarda la descomposición de los alimentos (González-Martínez, Gómez-Treviño & Jaiméz-Salas, 2003).

La familia de las BAL está conformada por cocos y bacilos Gram positivos, inmóviles, no esporulados, catalasa y oxidasa negativos. Su metabolismo se basa en la fermentación de azúcares para la obtención de energía con la generación de ácido láctico como producto principal de su metabolismo. Son microorganismos anaerobios o aerotolerantes. Las BAL son principalmente mesofílicas, aunque existen algunas con capacidad de crecer a menor o mayor temperatura (5°C o 45°C, respectivamente), soportan bajos valores de pH con un mínimo de 3 pero la mayoría se desarrollan en un intervalo entre 4 y 4.5 (Mora-Peñaflor & García-Guerrero, 2007).

Los grupos más representativos de esta familia son: *Camobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*.

2.1.2 Lactobacilos

Los lactobacilos son de forma bacilar, variando de bacilos cortos y curvos hasta largos y delgados. Son especies no esporuladas, aerotolerantes o anaerobias, acidúricas y acidófilas. Estas bacterias lácticas se desarrollan a un pH alrededor de 4 con una temperatura óptima de 30–40°C.

El género *Lactobacillus* es el más grande en la familia de las BAL con alrededor de 80 especies organizadas según sus características fermentativas en tres grandes grupos: 1) homofermentativas estrictas, 2) heterofermentativas facultativas y 3) heterofermentativas estrictas (Mora-Peñaflor & García-Guerrero, 2007).

En la actualidad los *lactobacillus* son utilizados muy frecuentemente en la industria de los alimentos, principalmente como cultivos iniciadores de la fermentación de muchos derivados lácteos (AAPPA, 2004).

2.2 Selenio

2.2.1 Funcionalidad

El Se es un micronutriente esencial de naturaleza mineral y se ha demostrado que tiene un marcado efecto antioxidante en el cuerpo humano principalmente en forma proteica (Figura 1); además de que puede prevenir enfermedades como el cáncer. La ingesta diaria recomendada de Se para el ser humano es de 55 µg/día; la cual a pesar de ser una concentración muy baja no siempre es cubierta por la dieta (Suarez & Michelsen, 2004).

Este elemento se encuentra en numerosos alimentos, sobre todo en los de origen vegetal, en los que se ha estudiado que su procedencia puede ser del suelo en el que son cultivados. Para mejorar la biodisponibilidad y eficiencia del Se, desde el punto de vista funcional, se requiere que se encuentre de forma orgánica. Sin embargo, a pesar de sus beneficios se ha establecido una ingesta máxima tolerable de 400µg/día para impedir una intoxicación (selenosis) la cual involucra

pérdida de cabello, irritabilidad, fatiga, uñas débiles y algunos problemas nerviosos leves (Alizate, Fernández-Fernández, Pérez-Conde, Gutiérrez & Cámara, 2008).

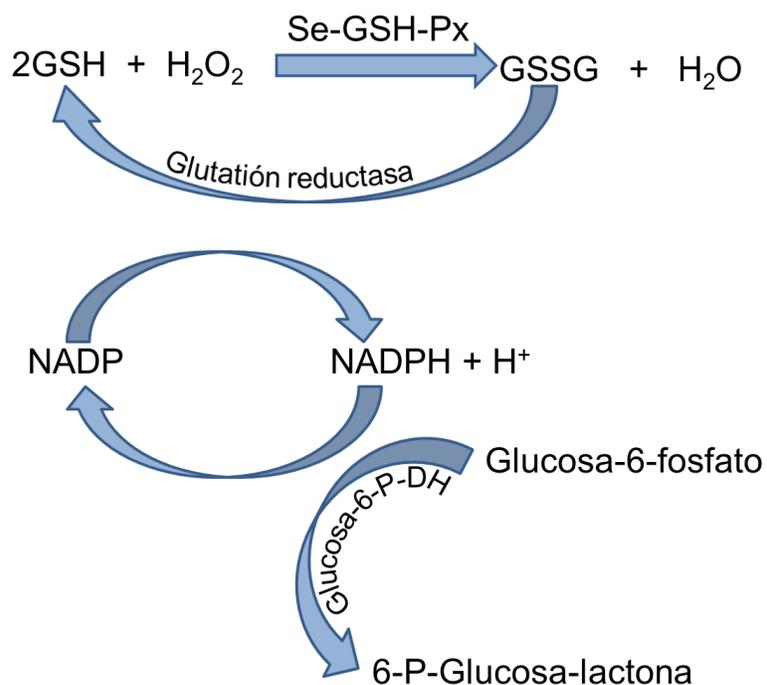


Figura 1: Mecanismo general de reacción en el que participan las GPx o GPS frente al estrés oxidativo. Fuente: Maas, 1990.

2.2.2 Impacto en la salud

De acuerdo a diversas investigaciones, el selenio juega un papel muy importante en la salud humana, y su consumo se ha relacionado con la prevención y tratamiento de algunas enfermedades.

Se ha puesto de manifiesto la asociación entre un bajo nivel antioxidante y una mayor incidencia de enfermedades cardíacas. Esto relacionado a que el estrés oxidativo provocado por los radicales libres producidos durante el metabolismo, puede provocar alteraciones cardíacas, ejemplo de esto es el poder oxidativo de los LDL, los cuales inducen la formación de placas de ateroma en las arterias. El

selenio es uno de los antioxidantes que puede ayudar a prevenir el daño por estos radicales (Noguera-Velasco, Martínez-Hernández & Gil del Castillo, 2005).

La deficiencia de Se está asociada a la disminución de células inmunes; y por ello, un aumento en el riesgo de muerte. Por otro lado, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) destruye el sistema inmune y los radicales libres contribuyen al daño. El Se puede actuar como antioxidante evitando este daño colateral por la acción de radicales libres (Noguera-Velasco, *et al.*, 2005).

Se ha reportado que algunas enfermedades no tienen una relación directa con el nivel de Se en sangre. Sin embargo, estudios muestran que a niveles bajos de este mineral algunas enfermedades se presentan con mayor frecuencia, como la artritis reumatoide. En esta enfermedad el sistema inmune puede generar algunos radicales libres que dañan los tejidos, en donde el Se puede aliviar los síntomas de la artritis mediante el control de estos radicales.

La relación existente entre el Se y el cáncer se ha analizado en diversos estudios epidemiológicos, los cuales establecen que existe una dependencia clara entre un nivel de Se bajo en sangre y el desarrollo del cáncer. Se han planteado diversos mecanismos para explicar el efecto antimutagénico del Se, incluyendo el efecto antioxidante, el aumento en la función inmune, la inducción de apoptosis, la inhibición de la proliferación celular, la alteración del metabolismo carcinogénico y de metabolitos citotóxicos.

Se ha reportado que durante la evolución del cáncer de próstata existe una reducción de selenoproteína-P en la neoplasia prostática epitelial. Del mismo modo, se observa un descenso del nivel de Se en sangre, lo cual se asocia con el riesgo de padecer cáncer de próstata (Cameselle-Teijeiro, *et al.*, 2000).

Finalmente, la deficiencia de Se puede afectar la función tiroidea, de modo que la hormona tiroidea activa, es sintetizada en presencia de la enzima tiorredoxin reductasa, de la que el Se es un constituyente esencial. Otra enfermedad relacionada con la deficiencia de Se es la pancreatitis crónica o la cirrosis (Noguera-Velasco, *et al.*, 2005).

2.3 Selenoproteínas

El selenio (Se) se encuentra en el cuerpo humano en forma de selenoproteínas, principalmente como residuo de selenocisteína (SeC). Dichas proteínas por deficiencia pueden generar desórdenes neuromusculares.

Las selenoproteínas se encuentran en algunas enzimas que se encargan de mantener una homeostasis redox. Una de estas enzimas más importantes en el cuerpo es la tiorredoxina reductasa, la cual oxida al NADPH y reduce a la tiorredoxina.

2.3.1 Funciones biológicas

Existen tres tipos de tiorredoxinas, la citosólica, la mitocondrial y una específica de testículo. En estado reducido cada una de ellas cumple con diversas funciones, de las cuales destaca, el proveer electrones para enzimas esenciales y enzimas antioxidantes. Debido a esto, es que todos los procesos regulados por la tiorredoxina en realidad son selenio-dependientes (Álvarez-Fernández, *et al.*, 2010; Castets, *et al.*, 2012).

Las glutatión peroxidasas (GPxs) son un grupo de enzimas importantes para el metabolismo humano, existen 8 tipos y 5 de ellos contienen a la SeC en su centro activo. La GPx1 o citosólica (primer selenoenzima conocida en mamíferos) es una enzima antioxidante extremadamente eficiente que cataliza la reducción de hidroperóxidos. La GPx4 es esencial en la embriogénesis en mamíferos; además, cumple un rol estructural esencial en la maduración de los espermatozoides. Las funciones de las GPx2 o gastrointestinal, GPx3 o plasmática y GPx6 (también selenoenzimas) no están totalmente identificadas, pero se sabe que son importantes en situaciones de estrés oxidativo (Álvarez-Fernández, *et al.*, 2010). En la Tabla 1 se muestran las selenoproteínas y sus funciones principales en el cuerpo humano.

Tabla 1: Funciones principales de las GPx en el organismo humano.

Selenoproteínas	Funciones
Glutación-peroxidasas GPx1,2,4	Eliminan al H ₂ O ₂ , modulan la formación de eicosanoides disminuyendo el daño oxidativo a lípidos, lipoproteínas y DNA.
Mitocondrial del espermatozoides GPx 4	Protege el desarrollo de espermatozoides y previene el daño oxidativo.
Iodotironina-desiodinasa	Regulación del nivel de las Tioredoxin-reductasas.
Tioredoxina-reductasa	Control del estado redox intracelular, regulación de expresión genética.
Iselenofosfato-sintetasa SPS2	Síntesis de selenofosfato.
Selenoproteína-P	Protección de células endoteliales frente a peroxinitritos.
Selenoproteína-W	Funciones muscular.
Selenoproteína del epitelio prostático	Localizada en las células epiteliales de la próstata ventral. Posible acción protectora de células secretoras frente al carcinoma.

2.3.2 Mecanismo general de biosíntesis

El residuo de SeC es incorporado a las cadenas polipeptídicas en el ribosoma, pero a diferencia de los otros 20 aminoácidos, la SeC es codificada por un codón uracilo-adenina-guanina o UGA (el cual naturalmente indica terminar la síntesis),

reprogramado para codificar SeC por un elemento de incorporación de SeC (elemento SECIS) presente exclusivamente en los ARNm de las selenoproteínas.

El elemento SECIS es el que decodifica el significado del codón UGA, y se localiza debajo del codón UGA: 10 nucleótidos hacia el extremo 3' del ARNm en bacterias, y en la región 3' no traducida en archaeas y eucariotas (Álvarez-Fernández, *et al.*, 2010).

A diferencia de los aminoacil-ARNt convencionales, que son reconocidos por un factor de elongación general, denominado EF-Tu y que media la incorporación de los aminoacil-ARNt al ribosoma, el selenocisteinil-ARNtSec es reconocido por un factor de elongación específico (SelB o EF-Sec), el cual reconoce además de GTP y ARNtSec, al elemento SECIS del ARNm y media la incorporación del ARNtSec al ribosoma.

En eucariotas, el factor de elongación que une Sec- ARNtSec no interacciona directamente con el elemento SECIS, sino a través de la proteína de unión a SECIS, denominada SBP2. Además, otras proteínas, como la proteína ribosomal L30, participan en el proceso de decodificación. La síntesis de SeC ocurre exclusivamente sobre el ARNt (no existe la síntesis del aminoácido libre). El ARNtSec es previamente aminoacilado con serina, por una seril-ARNt sintetasa convencional (enzima que cataliza la formación de seril-ARNtSer) dando lugar a seril-ARNtSec, el cual es luego modificado por la selenocisteína sintetasa a selenocisteinil-ARNtSec.

En eucariotas, la catálisis de la transformación de Ser-ARNtSec a Sec-ARNtSec se realiza con dos enzimas diferentes. El átomo de Se proviene del selenofosfato, el cual es sintetizado por la selenofosfato sintetasa (Figura 2), conocida como SPS2, a partir de selenuro y ATP (Álvarez-Fernández, *et al.*, 2010).

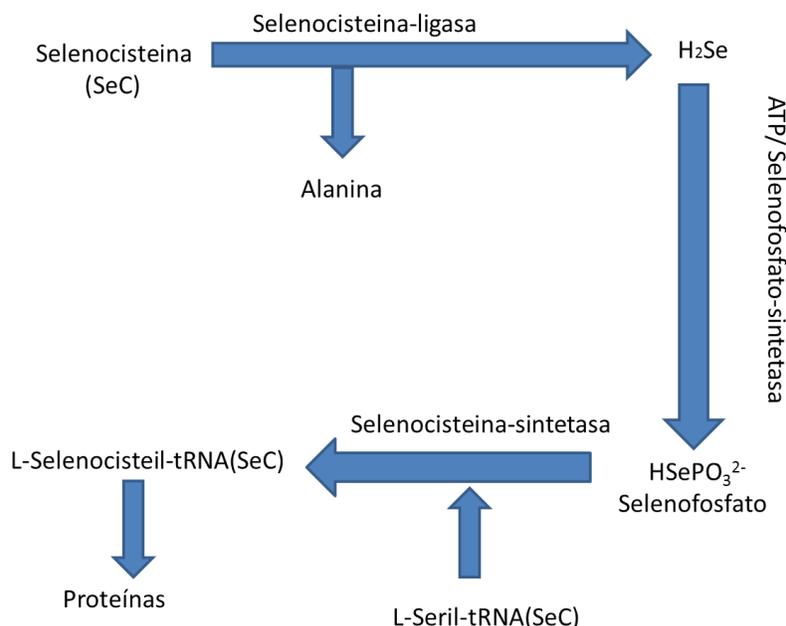


Figura 2: Biosíntesis de selenoproteínas a partir de SeC (Lamberti, *et al.* 2011).

2.3.3 Características y propiedades de selenocisteína

La SeC es un aminoácido que ha sido considerado como un análogo de la cisteína (Cys) con la diferencia de contener al Se en lugar del azufre (S) en su composición (Figura 3). Sin embargo, sus diferencias van más allá de su estructura. Por ejemplo, mientras que la Cys tiene un pK_a de 8.3, el de la SeC es de 5.2. Esto implica que a nivel fisiológico en el cuerpo humano (pH de 7 ± 0.3), el grupo tiol de la Cys se encuentra de forma neutra mientras el grupo selenol de la SeC se encuentra cargado negativamente (selenolato).

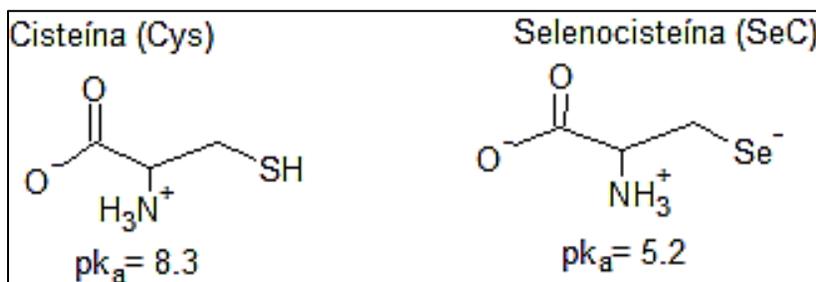


Figura 3: Estructuras de la SeC y Cys en función del pH del cuerpo humano.

Otra característica importante de la selenocisteína es que el Se presenta una mayor polarizabilidad que el S; lo que genera una mayor capacidad nucleofílica en el átomo de Se, y por ende, mayor reactividad (Álvarez-Fernández, *et al.*, 2010).

Las enzimas existentes con residuos de SeC en su centro activo involucradas en reacciones redox son más eficientes que sus homólogas con Cys. Sin embargo, estas enzimas no son biocatalizadores partícipes en reacciones no redox; por lo que, no puede considerarse que la SeC sustituya a la Cys en todas las enzimas (Álvarez-Fernández, *et al.*, 2010).

3. Justificación

Por su gran capacidad para prevenir y tratar enfermedades, el selenio es un elemento irremplazable y fundamental en el metabolismo humano. Debido a la deficiencia de este mineral en la población mexicana y a su difícil asimilación por el cuerpo humano, es necesario el estudio de fuentes orgánicas de este componente. El uso de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*) como receptores y biotransformadores de selenio a SeC es un aspecto novedoso y poco estudiado. Las bacterias lácticas son utilizadas como microorganismos iniciadores en muchos alimentos fermentados, y se sabe que pueden ser fuentes biológicas de selenio. De esta forma, la incorporación de este tipo de bacterias en la elaboración de alimentos generaría productos funcionales y nutracéuticos, trayendo consigo beneficios a la salud de la población en general.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Cuantificar la concentración de selenio inorgánico absorbido por bacterias ácido lácticas en un medio enriquecido, para determinar la concentración de selenio orgánico biotransformado a través de un análisis por emisión atómica.

4.2 Objetivos específicos

1. Realizar el aislamiento y la adaptación de bacterias ácido lácticas para obtener los inóculos de los sistemas de fermentación
2. Determinar la concentración de inhibición crítica a Se(IV) de bacterias lácticas a través de la fermentación en medios de MRS enriquecidos con selenito de sodio
3. Cuantificar el selenio remanente en los medios de cultivo enriquecidos con la concentración de inhibición crítica de selenito de sodio, para determinar el porcentaje de selenio biotransformado por la bacteria láctica

5. Metodología

5.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas

5.1.1 Muestras

Se utilizó una cepa aislada de un producto comercial lácteo que de acuerdo a PROFECO (2004) contiene *L. jhonsonii*. Asimismo, se utilizaron 3 cepas puras: *L. bulgaricus*, *L. helveticus* y *L. rhamnosus*, las cuales fueron donadas e identificadas por el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la UAM-Iztapalapa.

5.1.2 Aislamiento de *L. jhonsonni*

Para el aislamiento del microorganismo se tomaron tres réplicas de 1 mL de la muestra del producto lácteo, y se realizaron diluciones de 10^1 a 10^6 en agua peptonada (peptona de caseína 1% p/v, pH 7.2). Posteriormente, se sembraron en cajas Petri con agar MRS, preparado de la siguiente manera: Agar MRS-NaCl (40g/l de NaCl) y agar MRS. Las cajas se incubaron a 37°C por un período de 24 h en anaerobiosis. El aislamiento se realizó en base a su morfología colonial (Tharmaraj & Saha, 2003). Los microorganismos aislados y los cultivos puros se mantuvieron en refrigeración en caldo MRS.

5.1.3 Adaptación de cepas puras

Se realizó un proceso de adaptación cultivando cada una de las cepas primeramente en caldo MRS y después se siguió el mismo procedimiento que en el aislamiento de *L. jhonsonni* (§Sección 5.1.2), sólo que se utilizaron placas de MRS estándar.

5.2 Cálculo de la concentración crítica de inhibición

Para determinar la concentración crítica de inhibición de las bacterias ácido lácticas al Se(IV) se inoculó 1 mL de un cultivo de bacterias lácticas acondicionado en tubos de ensayo con rosca que contenían 10 mL de caldo MRS suplementado con selenito de sodio (Na_2SeO_3) en las siguientes concentraciones: 20, 50, 100,

200 y 300 mg/L. El selenito se agregó de una solución estéril en agua desionizada con una concentración de 500 mg/L.

La fermentación se llevó a cabo en anaerobiosis a 37°C o 42°C (según el tipo de lactobacilo) por 36 horas. Se tomaron muestras del caldo para medir cuenta viable al final de la incubación, la cual se realizó sembrando diluciones del caldo en agar-MRS, expresando los resultados en UFC por mL.

Se realizaron las curvas de inhibición de acuerdo a la cuenta viable para cada microorganismo, y posteriormente, con ayuda de dichas gráficas se determinó el punto crítico de inhibición.

Para la determinación del punto crítico en las gráficas se utilizó el método de Talmage y Fitch modificado (Peña, 2007), que consiste en:

1. Graficar los datos obtenidos de la cuenta viable de cada bacteria.
2. Identificar el cambio de orden en la gráfica.
3. Trazar una bisectriz de forma tangente a los puntos cercanos al cambio de orden.
4. Alargar y entrecruzar las dos bisectrices, para formar un ángulo frente al cambio de orden.
5. Trazar una línea en el cruzamiento de las bisectrices, para tocar la curva de inhibición.
6. Interpolarse el punto que toca la línea recta a la curva y referenciar respecto a la concentración observada.

5.3 Fermentación en medios suplementados con Na₂SeO₃

Se realizaron las fermentaciones para cada microorganismo; de los cuales se inoculó una concentración de 10⁶ UFC, en tubos de ensayo que contenían 10 mL de caldo MRS enriquecido con las concentraciones de Na₂SeO₃ correspondientes al punto crítico de inhibición para cada bacteria láctica estudiada. La fermentación se llevó a cabo por 36 horas a 37°C para *L.jhonsonni*, *L. casei* y 42°C para *L. helveticus* y *L. rhamnosus*.

5.4 Separación de biomasa

Después de la fermentación, los caldos de MRS fermentados se centrifugaron a 39000g por 15 minutos a 4°C para separar células del medio de cultivo. Los pellets de células se resuspendieron en 10 mL de di-tiotreitol (DTT) al 0.3% (p/v) para liberar cualquier posible enlace de selenio con grupos amino de las proteínas membranales, los cuales podían afectar las mediciones de selenio metabolizado y adsorbido por la bacteria. Las células se centrifugaron a las mismas condiciones utilizadas para separarlas del medio de cultivo con la finalidad de retirar la solución de DTT.

5.5 Determinación de biomasa seca

Para la determinación del peso seco de la biomasa generada, después de la eliminación de DTT, se recuperaron las células en viales de vidrio puestos a peso constante. Los viales fueron colocados en una estufa de secado a 105°C durante 4 h, posteriormente se procedió al pesado de los viales hasta obtener un peso constante, la biomasa generada se calculó por diferencia de pesos.

5.6 Análisis de selenio

Para la determinación de Se por ICP se tomaron tres réplicas de 10 mL del medio sobrenadante del primer proceso de centrifugación. A cada muestra se le adicionaron 10 mL de HNO₃ concentrado; posteriormente, la mezcla se sometió a una digestión por microondas, para la cual se utilizó una rampa de temperatura desde T_{amb} hasta 175°C durante 5.5 minutos y de 175 a 180°C durante 4.5 minutos. El límite de presión en los vasos fue de 110 psi.

Después, la solución resultante se llevó a un volumen final con agua desionizada (18µS/cm) de 25 mL, para el caso de *L. bulgaricus* y *L. helveticus* y de 50 mL para *L. rhamnosus* y *L. jhonsonii*.

Las soluciones estándar de selenio se prepararon por dilución de una solución madre con una concentración de 40 mg/L (preparada a partir de Na₂SeO₃) y en

matriz nítrica (3% de HNO_3), realizando la curva de calibración respectiva, en el intervalo de 2-10 mg/L. Cada uno de los estándares y las muestras se leyeron a la longitud de onda máxima de emisión del Se (196 nm) en un equipo de ICP.

La concentración de Se absorbido por la biomasa se calculó por interpolación y considerando las diluciones correspondientes.

6. Resultados y discusión

6.1 Análisis de tolerancia al Na_2SeO_3

Después de realizar la identificación morfológica y acondicionamiento de las bacterias ácido lácticas aisladas, se realizaron los estudios de tolerancia a Se en caldo MRS.

En la Tabla 2 se aprecia que a pesar de pertenecer al mismo género, los lactobacilos exhibieron diferentes tolerancias al selenio. Se observó que *L. helveticus* fue la bacteria láctica que presentó el mayor rango de tolerancia, debido a la inhibición por selenito de sodio.

La especie *L. rhamnosus* presentó un rango de tolerancia de hasta 300 mg/L; pese a que se ha reportado que algunas especies de este microorganismo son incapaces de metabolizar el selenio inorgánico y algunas otras no tienen tolerancia a la presencia de éste (Andreoni *et al.*, 2000).

Por otro lado, se ha observado que las bacterias ácido lácticas son capaces de sobrevivir en concentraciones de hasta 200 mg/L de Na_2SeO_3 (Calome *et al.*, 1995). En este caso, todas las bacterias lácticas estudiadas sobrevivieron a mayores concentraciones o a una concentración similar de Na_2SeO_3 ; por ejemplo, el *L. bulgaricus*.

Tabla 2: Rango de tolerancia a Na_2SeO_3 en el cultivo de las bacterias estudiadas

Microorganismo	Rango de tolerancia a Na_2SeO_3 (mg/L)
<i>L. johnsonii</i>	0-250
<i>L. rhamnosus</i>	0-300
<i>L. bulgaricus</i>	0-200
<i>L. helveticus</i>	0-500

Las fermentaciones correspondientes para determinar la concentración crítica se realizaron de acuerdo a las concentraciones de trabajo. Se dividieron los rangos entre 8 y 9 diferentes concentraciones de Na_2SeO_3 en el medio (Tabla 3).

Tabla 3: Valores de las curvas tolerancia para los microorganismos estudiados.

Microorganismo			
<i>L. jhonsonii</i>		<i>L. rhamnosus</i>	
[Na_2SeO_3] mg/L	Log UFC	[Na_2SeO_3] mg/L	Log UFC
0	8.00 ± 0.00	0	7.99 ± 0.00
20	7.60 ± 0.03	20	7.55 ± 0.01
40	7.59 ± 0.01	40	7.47 ± 0.30
60	7.33 ± 0.01	60	5.68 ± 0.01
80	7.21 ± 0.03	80	5.50 ± 0.00
100	6.73 ± 0.03	100	5.46 ± 0.01
150	6.53 ± 0.06	150	4.98 ± 0.02
200	6.53 ± 0.06	200	4.25 ± 0.02
250	6.15 ± 0.15	300	4.13 ± 0.02
<i>L. bulgaricus</i>		<i>L. helveticus</i>	
[Na_2SeO_3] mg/L	Log UFC	[Na_2SeO_3] mg/L	Log UFC
0	8.00 ± 0.00	0	8.09 ± 0.01
20	7.62 ± 0.02	20	6.65 ± 0.04
40	6.84 ± 0.06	40	5.75 ± 0.02
60	4.51 ± 0.01	60	5.25 ± 0.02
80	3.38 ± 0.08	80	5.09 ± 0.02
100	3.00 ± 0.00	100	4.97 ± 0.02
150	3.15 ± 0.15	200	4.65 ± 0.05
200	0.00 ± 0.00	500	4.15 ± 0.15

Se observó que de todas las bacterias estudiadas, *L. helveticus* exhibió la mayor disminución en viabilidad. Esta disminución correspondió a dos ciclos logarítmicos a una concentración de 20 mg/L de Na_2SeO_3 .

L. bulgaricus presentó inhibición total en la concentración más alta de su rango de estudio (200 mg/L), teniendo una cuenta nula. En el caso de *L. jhonsonii*, este microorganismo bajó sólo dos ciclos logarítmicos, en todo el intervalo de concentración estudiado (0-250 mg/L).

Algunos estudios han revelado que la tolerancia a especies, como el selenio, depende de la presencia de otros metales en el medio, principalmente del zinc (Kai-Xia, Chen & Qing-Liang, 2007). Por otro lado, se sabe que la presencia de

iones como el Cd(II) en el medio, tiene un efecto positivo sobre la resistencia de las bacterias ácido lácticas a la presencia de Se(IV) (Caballero-Arauz, *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha reportado que no sólo la interacción entre especies iónicas hace que los microorganismos sean más resistentes a la presencia de selenio inorgánico; sino que, la encapsulación con quitosano aumenta la resistencia, de algunas especies de lactobacilos a la presencia de esta especie química, lo que podría aumentar el rango de supervivencia de estas especies (Vodnar & Socaciu, 2014).

6.2 Determinación de la concentración crítica de inhibición

A partir de los datos de tolerancia (Tabla 3), se calculó la concentración crítica de inhibición. Mediante el cálculo de las regresiones lineales en los puntos de inflexión de la gráfica (Figura 4) y discriminando aquellos con menor correlación lineal (R^2 más pequeña, Tabla 4), se pudo determinar el punto donde se encontraba el cambio de orden en la curva.

Tabla 4: Correlación lineal de segmentos en las curvas de tolerancia.

Microorganismo	Rango analizado	Correlación lineal R^2
<i>L. helvéticas</i>	0 – 500 mg Na ₂ SeO ₃ /L	0.489 ^a
	100 – 1000 mg Na ₂ SeO ₃ /L	0.854
<i>L. rhamnosus</i>	0 – 100 mg Na ₂ SeO ₃ /L	0.876
	150 – 300 mg Na ₂ SeO ₃ /L	0.708 ^a
<i>L. bulgaricus</i>	40 – 150 mg Na ₂ SeO ₃ /L	0.565 ^a
	80 – 200 mg Na ₂ SeO ₃ /L	0.704
<i>L. jhonsonii</i>	0 – 80 mg Na ₂ SeO ₃ /L	0.952
	80 – 200 mg Na ₂ SeO ₃ /L	0.716 ^a
	150 – 300 mg Na ₂ SeO ₃ /L	0.899

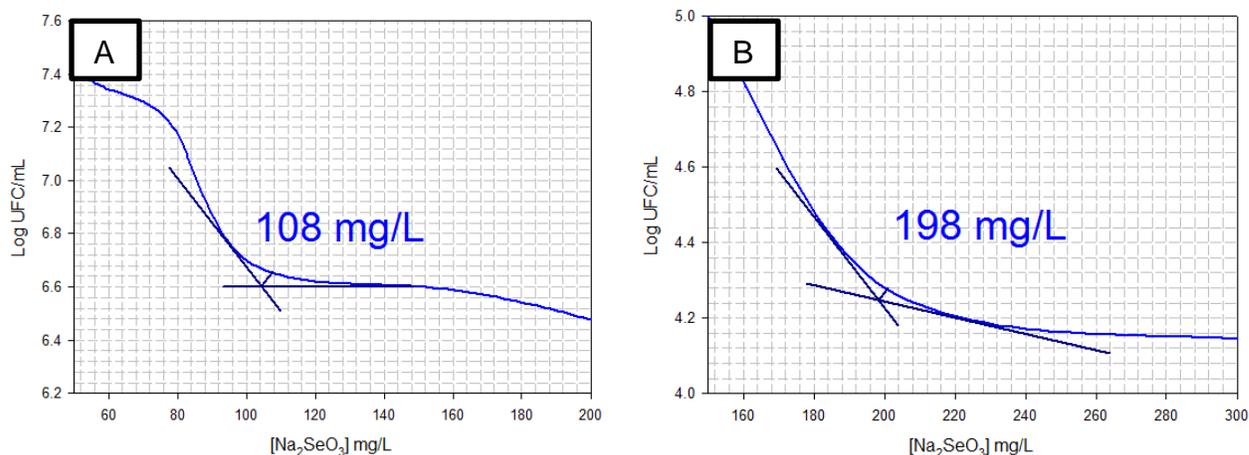
^a: rango analizado para la determinación de la concentración crítica de inhibición.

En la Figura 4 se observa las partes segmentadas de las curvas en las cuales se determinaron los puntos críticos para cada microorganismo estudiado, siguiendo el método modificado de Talmage y Fitch (Peña, 2007).

Los estudios revelaron que de los cuatro microorganismos, *Lactobacillus rhamnsus* presentó la mayor tolerancia con una concentración crítica de 198 mg/L de Na_2SeO_3 ; mientras, *Lactobacillus helveticus* presentó la menor tolerancia (43 mg/L).

En todos los casos, los resultados de tolerancia fueron mayores a los reportados para otras especies de lactobacilos, donde se encontró que con una concentración de 1mg/L de Na_2SeO_3 se presentaba inhibición del crecimiento en caldo MRS (Andreoni, *et al.*, 2000).

Kai-Xia y colaboradores (2007) demostraron que más de 16 mg/L de Na_2SeO_3 adicionado a medio MRS en crecimiento de *L. bulgaricus* tiene un efecto inhibitorio. Sin embargo, la presencia de otros metales como manganeso y zinc, incrementa la tolerancia de bacterias lácticas a este tipo de especies química; principalmente, en lactobacilos y estreptococos (Calomme, *et al.*, 1995).



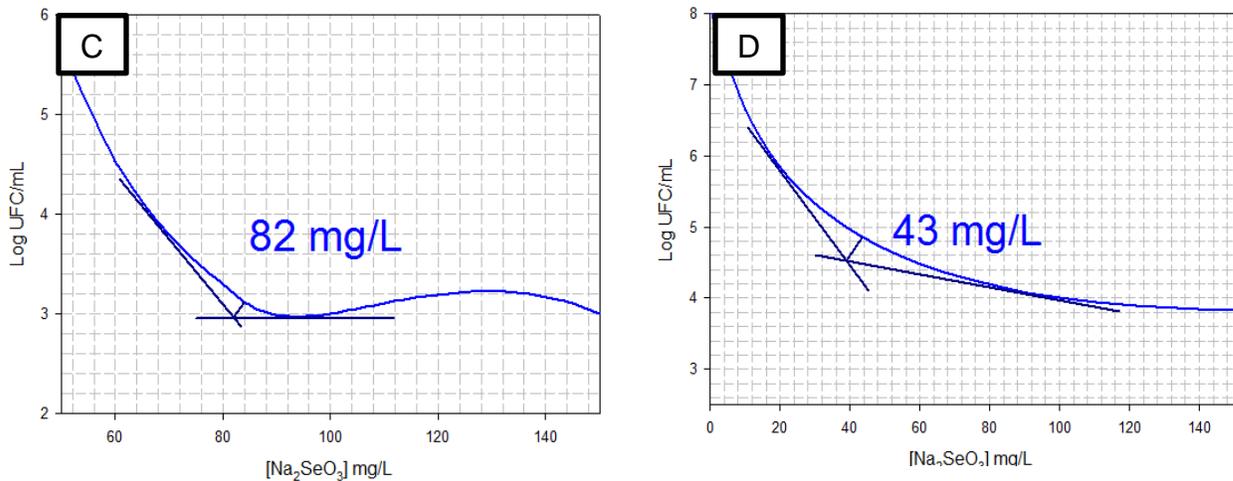


Figura 4: Determinación de la concentración crítica de tolerancia a Na_2SeO_3 por *Lactobacillus*: A: *johnsonii*, B: *rhamnosus*, C: *bulgaricus*, D: *helveticus*.

Se ha demostrado que la tolerancia al selenio, por bacterias lácticas tiene una relación directa con la dispersión del selenio en el medio. Por ejemplo, en leches fermentadas, una concentración de hasta 200 mg/L no tiene efecto sobre la viabilidad de bacterias probióticas; y además, se logra una inserción de selenio inorgánico de hasta el 75% para algunas especies de lactobacilos (Alizate, *et al.*, 2010).

6.3 Análisis de selenio

Para la determinación de selenio en las muestras analizadas (remanentes de selenio en el caldo MRS después de la centrifugación) se elaboró una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de 2 a 10 mg/L. Los parámetros de regresión se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Parámetros de regresión de las líneas de calibrado, Intensidad vs concentración de Selenio (mg/L).

Parámetro	Valor
Desviación estándar residual, s_e	28.94
Número de estándares, n	5
Coefficiente de correlación, r^2	0.9995
Ordenada en el origen, $a \pm ts_a$	7.5 ± 7.5
Pendiente, $b \pm ts_b$	224 ± 11
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	2-10
Límite de detección (µg L ⁻¹)	0.27 µg L ⁻¹
Reproducibilidad (%DER, $n=3$, 6 µg L ⁻¹)	1.6

Todas las muestras se analizaron por triplicado, obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Porcentaje de absorción de selenio por especies de *Lactobacillus*.

Microorganismo	[Se] ₁ ^a	[Se] ₂	% de Absorción de Se
<i>L.rhamnosus</i>	12.1	8.01	33.76
<i>L.helveticus</i>	2.75	0.65	76.50
<i>L.bulgaricus</i>	5.24	4.76	9.14
<i>L.jhonsonii</i>	6.66	5.93	10.80

[Se]₁= concentración de selenio adicionado al medio en µg; [Se]₂= concentración de selenio después del crecimiento de las bacterias en µg. ^aLa concentración adicionada al medio está reportada según las diluciones realizadas para el análisis.

Con los resultados obtenidos se evaluó la capacidad de biotransformación de selenio inorgánico que tiene cada una de las bacterias lácticas. De acuerdo a estos resultados, se encontró que, *Lactobacillus helveticus* fue la BAL que mayor porcentaje de absorción mostró (76.50%); a pesar de ser la bacteria con menor

tolerancia al Se. En contraste, *Lactobacillus bulgaricus* mostró el menor porcentaje de absorción (9.14%).

Se ha demostrado que para algunas especies de lactobacilos la absorción de selenio inorgánico puede alcanzar hasta un 13%, del cual el 3% se queda interaccionando en la membrana celular. La mayoría de los lactobacilos, transforman el selenio inorgánico en SeC por un mecanismo bioquímico integrado al citoplasma (Andreoni, *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos demuestran que hubo mayor biotransformación de selenio que el mostrado por algunas bifidobacterias probióticas, en las cuales se han logrado valores de hasta 28% (Zhi-Qiang, Bo-Wen, Ping-Lan, 2009).

Es importante resaltar que la bioconversión de selenio inorgánico a selenio coloidal u orgánico, se realiza de manera más eficiente en sistemas con nutrientes específicos para las bacterias lácticas, como son las leches fermentadas. Se ha demostrado que hasta un 73% de selenio inorgánico puede ser biotransformado durante la fermentación de leche (Alzate, *et al.*, 2010).

En la literatura se ha reportado sólo a las levaduras como productores naturales de selenio orgánico (Calomme, *et al.*, 1995; Kai-Xia, *et al.*, 2007), para estos microorganismos se ha logrado un máximo de 50% de absorción de Se, transformado principalmente a selenometionina (Kai-Xia, *et al.*, 2007).

También, se ha propuesto el uso de algunas especies de lactobacilos agregados como ingredientes funcionales; ya que, la capacidad de conversión que se ha presentado, en algunos casos, es más alta a la reportada por levaduras (Kai-Xia, *et al.*, 2007).

6.3.2 Determinación de la concentración de selenio inorgánico absorbido

Para determinar la concentración de selenio inorgánico absorbido y transformado por cada bacteria láctica, se calculó el peso de biomasa seca en cada fermentación (Tabla 7).

Se pudo observar que *L. helveticus* fue el microorganismo que generó la mayor concentración de biomasa en el medio (14.06 mg); mientras que con *L. jhonsonii* se obtuvo menos de 1 mg durante el proceso de fermentación.

Los resultados de generación de biomasa, después de 36 horas de fermentación, demuestran que cada microorganismo tiene una curva de crecimiento diferente. Sin embargo, se ha reportado que independientemente de la etapa de crecimiento microbiano, los lactobacilos son capaces de absorber selenio inorgánico para su transformación a SeC. De igual manera, la concentración de Na_2SeO_3 no tiene implicaciones directas en el porcentaje de absorción (Kai-Xia, *et al.*, 2007).

Tabla 7: Biomasa generada por los diferentes *lactobacillus* en un periodo de 36 hrs.

Microorganismo	[Se] ₁ (mg/L)	Biomasa generada (mg) ^a
<i>L. helveticus</i>	43	14.06 ± 3.5x10 ⁻⁴
<i>L. rhamnosus</i>	198	8.83 ± 5.7x10 ⁻⁵
<i>L. bulgaricus</i>	82	2.3 ± 1x10 ⁻⁴
<i>L. jhonsonii</i>	108	0.8 ± 2x10 ⁻⁴

[Se]₁= concentración de selenio adicionado al medio. ^aLos datos para calcular la biomasa generada por sistema se muestran en el anexo.

Considerando la biomasa generada por cada bacteria, se pudo estimar la capacidad de cada una de ellas para el aprovechamiento de Se en los sistemas de fermentación enriquecidos con la concentración crítica de Na_2SeO_3 (Tabla 8).

Tabla 8: Relación de la concentración de Se en el medio y su absorción, respecto la biomasa generada.

<i>Microorganismo</i>	[Se] ₁ (mg/L)	Biomasa generada (mg)	% de absorción de Se	$\rho \left(\frac{\mu g_{Se}}{mg_{biomasa\ generada}} \right)$
<i>L. helveticus</i>	43	14.06	76.5	0.149
<i>L. rhamnosus</i>	196	8.83	33.76	0.454
<i>L. bulgaricus</i>	82	2.3	9.14	0.208
<i>L. jhonsonni</i>	108	0.8	10.8	0.91

[Se]₁= concentración de selenio adicionado al medio.

L. jhonsonii mostró un mayor aprovechamiento de Se absorbido por mg de biomasa generada (0.91 µg/mg). Mientras que, *L. helveticus* tuvo el menor índice de aprovechamiento con 0.15 µg de Se por mg de biomasa. Esto puede explicarse por el requerimiento proteico que es diferenciado según el tipo de bacteria.

En este contexto, se ha reportado 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 SeC, entre mayor sean los requerimientos de Cys para el desarrollo microbiano, es mayor el porcentaje de selenio absorbido durante el crecimiento (Kai-Xia, *et al.*, 2007; Sarang, *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha determinado que la concentración de selenio absorbido por lactobacilos puede llegar hasta 407 µg/g de biomasa seca (Calomme, *et al.*, 1995). Sin embargo, datos más recientes refieren que en el caso de *L. reuteri* NCDC77 tiene la capacidad de absorber hasta 800 µg/g de biomasa seca (Galano, *et al.*, 2013; Saini, *et al.*, 2014). Adicionalmente, para los enterococos se han alcanzado valores de absorción de Se, de alrededor 2 µg/g de biomasa seca (Pieniz, *et al.*, 2013).

Relacionando los resultados obtenidos en esta investigación, con los reportados por otros autores, se pueden realizar inferencias sobre la posible utilización de los

lactobacillus estudiados (*helveticus*, *ramnosus*, *bulgaricus* y *jhonsonii*) como biogeneradores de Se orgánico, tomando en cuenta las siguientes características:

- Tolerancia critica a la presencia de Se.
- Porcentaje de absorción de Se por bacteria.
- Cantidad de biomasa generada en el sistema.
- Relación entre los mg de Se absorbido por mg de biomasa generada.

Muchos estudios han propuesto sistemas de cultivos iniciadores para la elaboración de leches fermentadas, principalmente. En todos los estudios se ha puesto de manifiesto la importancia de la bioconversión de selenio inorgánico por BAL.

Una de las características más importantes es la determinación de selenio insertado y se ha referido que el aprovechamiento del selenio agregado sea el mayor posible para no dejar remanentes de selenio inorgánico en el medio (Alzate, *et al.*, 2010; Pieniz, *et al.*, 2013; Saini, *et al.*, 2014).

7. Conclusiones

La concentración crítica de inhibición por Na_2SeO_3 así como la acumulación de selenio, durante la fermentación en medios enriquecidos, son diferentes para todos los microorganismos estudiados.

No hay una relación directa entre el porcentaje de absorción de Na_2SeO_3 y la concentración de selenio acumulada ya que, con independencia de la cantidad de selenio inorgánico absorbida, la concentración acumulada al interior de la célula varía.

Existe una relación directa proporcional entre la tolerancia a la presencia de Na_2SeO_3 y el porcentaje de acumulación de selenio por las bacterias ácido lácticas estudiadas.

L. jhonsonii y *L. rhamnosus* presentan potencial como biogeneradores de selenio orgánico, lo que permitiría su aplicación como ingrediente funcional en distintos tipos de alimentos.

8. Perspectivas

1. Analizar y comparar la capacidad de absorción de los *Lactobacillus* a concentraciones por debajo del punto crítico de tolerancia al Se en un medio de crecimiento enriquecido.
2. Realizar pruebas de absorción *in vitro* e *in vivo* para estimar la cantidad de Se absorbible por el cuerpo humano, teniendo como fuente las cepas estudiadas, en la concentración donde la relación ρ y el porcentaje de Se absorbido sea el ideal para aplicación en procesos de elaboración de alimentos.
3. Realizar pruebas piloto en la elaboración de productos lácteos utilizando las bacterias estudiadas a las concentraciones de Se determinado con mayor eficiencia.

9. Anexo

Tabla 9: Biomasa generada por *L. helveticus* en un sistema con 43 mg/L de Na_2SeO_3 .

Muestra	P ₁ (g)	P ₂ (g)	P _m (g)	P _p (g)	Σ	%DER
1	2.2397	2.2541	0.0144	0.01406	3.5x10 ⁻⁴	2.48
2	2.2433	2.2574	0.0141			
3	2.2760	2.2897	0.0137			

Tabla 10: Biomasa generada por *L. rhamnosus* en un sistema con 198 mg/L de Na_2SeO_3 .

Muestra	P ₁ (g)	P ₂ (g)	P _m (g)	P _p (g)	Σ	%DER
1	2.3512	2.360	0.0088	0.00883	5.7x10 ⁻⁵	0.65
2	2.2741	2.2830	0.0089			
3	2.2469	2.2557	0.0088			

Tabla 11: Biomasa generada por *L. bulgaricus* en un sistema con 82 mg/L de Na_2SeO_3 .

Muestra	P ₁ (g)	P ₂ (g)	P _m (g)	P _p (g)	Σ	%DER
1	2.2067	2.2091	0.0024	0.0023	1x10 ⁻⁴	4.34
2	2.2722	2.2745	0.0023			
3	2.2703	2.2723	0.0022			

Tabla 12: Biomasa generada por *L. jhonsonni* en un sistema con 108 mg/L de Na₂SeO₃.

Muestra	P ₁ (g)	P ₂ (g)	P _m (g)	P _p (g)	Σ	%DER
1	2.2648	2.2654	0.0006	0.008	2x10 ⁻⁴	2.5
2	2.3160	2.3168	0.0008			
3	2.1989	2.1991	0.001			

Tabla 13: Datos para el cálculo del Se absorbido por BAL.

Microorganismo	Absorbancia	[Se] medio	Promedio	Σ	%DER
<i>L. helveticus</i>	130.6	0.6281	0.6557	0.0277	4.22%
	143.2	0.6836			
	136.8	0.6554			
<i>L. bulgaricus</i>	1042.2	4.4616	4.7605	0.1270	2.66 %
	1065.8	4.7455			
	1099.6	4.8943			
<i>L. rhamnosus</i>	1714.7	7.6026	8.0149	0.3807	3.87 %
	1825.1	8.0887			
	1885.2	8.3533			
<i>L. jhonsonni</i>	1341.5	5.9594	5.9367	0.2300	4.75 %
	1385.8	6.1545			
	1281.7	5.6961			

Memorias del XXXV Encuentro Nacional de la AMIDIQ
6 al 9 de Mayo de 2014, PuertoVallarta, Jalisco, México

ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DE SELENIO INORGÁNICO PARA LA FORMACIÓN DE SELENO-PROTEÍNAS INTRACELULARES DE BACTERIAS LÁCTICAS

Juan Francisco Flores Aguilar^a, Luis Guillermo González Olivares^a

^aCentro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,

¹autor de correspondencia lgonzaies@uaeh.edu.mx

Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Mineral de la Reforma, Hgo., C.P. 42184, México

Resumen

El Selenio (Se) es un micronutriente esencial en el metabolismo humano y se ha demostrado que tiene un marcado efecto antioxidante. Su biodisponibilidad está relacionada dentro de otras cosas con la naturaleza química del Se (orgánica o inorgánica). En la forma inorgánica (sales) el Se puede ser potencialmente tóxico para la salud humana mientras que en su forma orgánica su disponibilidad aumenta y su toxicidad disminuye. Existen principalmente dos tipos de Se orgánico la selenocisteína (SeC) sintetizada por organismos heterótrofos y la selenometionina (SeM) sintetizada principalmente por organismos autótrofos. En el organismo el Se se encuentra presente en forma de selenoproteínas, principalmente como residuo de SeC. Existen microorganismos como algunas cepas de *Lactobacillus*, *E. coli*, *S. cerevisiae* que pueden utilizar el Se inorgánico en su metabolismo proteico el cual es incorporado a las cadenas polipeptídicas en el ribosoma, generando selenoproteínas las cuales pueden ser una fuente potencial de selenio en su forma orgánica. El objetivo general de esta investigación es determinar y cuantificar el selenio en *Lactobacillus ssp*, a través del cultivo en medios enriquecidos con Na₂SeO₃ para determinar la capacidad de incorporación del Se en su metabolismo proteico. En esta investigación se utilizan 4 bacterias lácticas, se determinó su tolerancia al Se adicionando Na₂SeO₃ a su medio de cultivo. El selenio absorbido y metabolizado por las células se determinó por medio de espectroscopía de plasma (ICP). Este análisis permitió hacer una inferencia sobre la capacidad de cada microorganismo en la transformación de Se inorgánico a Se orgánico (SeC).

Introducción

El Se es un micronutriente esencial de naturaleza mineral y se ha demostrado que tiene un marcado efecto antioxidante además de que puede prevenir enfermedades como el cáncer, se encuentra presente en el cuerpo humano en forma de selenoproteínas principalmente como residuo de selenocisteína (SeC)[1], dichas proteínas por deficiencia pueden generar desordenes neuromusculares, ejemplo de ello son las glutatión peroxidadas (GPxs) que son un grupo de enzimas importantes para el metabolismo humano, existen 8 tipos y 5 de ellos contienen a la SeC en su centro activo involucradas en reacciones redox, dichas enzimas son más eficientes que sus homologas con Cys [1, 2], por ello se ha propuesto una ingesta diaria recomendada para el ser humano de 55µg/ día de Se la cual a pesar de ser una concentración muy baja no siempre es cubierta debido que el selenio no se encuentra disponible para su absorción por el organismo humano. Existen algunas bacterias ácido lácticas que pueden incorporar el Se inorgánico a su metabolismo el cual es incorporado a las cadenas polipeptídicas en el ribosoma, y lo transforman a SeC, esto aumenta la biodisponibilidad del Se, permitiendo que las bacterias ácido lácticas

1439

© 2014 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-2-8

AMMIDIQ

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A. C.

“La Interdisciplinariedad en la Ingeniería Química”

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

JUAN FRANCISCO FLORES AGUILAR, ISAI VÁZQUEZ GARRIDO, LUIS GUILLERMO
GONZÁLEZ OLIVARES

Por la presentación del trabajo:

**"ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DE SELENIO INORGÁNICO PARA LA FORMACIÓN DE
SELENO-PROTEINAS INTRACELULARES DE BACTERIAS LÁCTICAS"**

ID: 842

XXXV Encuentro Nacional
Puerto Vallarta, Jalisco México, 6 al 9 de Mayo de 2014

Dr. Juan Gabriel Segovia Hernández
PRESIDENTE DE AMMIDIQ



Dr. Tomás Alvarado García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO



10. Referencias

- Academia del Área de Plantas Piloto de Alimentos (A. Á. P. P. A.) (2004). Cultivos lácticos y su aplicación en la elaboración de yogur (Ed.), Introducción a la tecnología de Alimentos: 13 – 33. México: Limusa.
- Alizate, A., Fernández-Fernández, A., Pérez-Conde, C., M., Gutiérrez, M., C., Cámara. C. (2008). Comparison of Biotransformation of Inorganic Selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in Lactic Fermentation Process of Yogurt and Kefir.
- Álvarez-Fernández, G., Bustos-Jaimes, I., Castañeda- Patlán, C., Guevara-Fonseca, J., Romero-Álvarez, I., Vázquez-Meza, H. (2010). Bioquímica de la Selenocisteína, el 21er aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana.
- Alzate, A., Pérez-Conde, M. Gutiérrez, M., Cámara, C. (2010). Selenium-enriched fermented milk: A suitable dairy product to improve selenium intake in humans. *International Dairy Journal* 20 (2010) 761-769.
- Andreoni, V., Moro_Luischi, M., Cavalca, L., Erbas, D., Ciapellano, S. (2000). Selenite Tolerance and accumulation in *Lactobacillus* species. *Annals of Microbiology*, 50, 77-88.
- Caballero Aráuz, Scott Afton , Kazimierz Wrobel , Joseph A. Caruso , J. Felix Gutiérrez Corona , Katarzyna Wrobel (2008). Study on the protective role of selenium against cadmium toxicity in lactic acid bacteria: An advanced application of ICP-MS. *Journal of Hazardous Materials* 153 (2008) 1157–1164.
- Calomme, M. R., Van den Branden, K., Vanden Berghe, D. A. (1995). Selenium and *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 79:3, 331-340.
- Cameselle Teijeiro, Cortizo Torres, López Touza, M. Gómez Cuñarro, L. Pousa Estévez y A. Senra Varela (2000). Prevención del cáncer de mama en atención primaria Elsevier *Atención Primaria* 419- 427.

- Castets, P., Lescure, A., Guicheney., P., Allamand, V. (2012). Selenoprotein N in skeletal muscle: from diseases to function.
- Galano, E., Mangiapane, E., Bianga, J., Palmese, A., Pessione, E., Szpunar, J., Lobinski, R., Amoresano, A. (2013). Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* Proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12, 2196-2204.
- Gonzalés-Martínez, E. B., Gómez-Treviño. M., Jaiméz-Salas. Z.(2003). Bacteriocinas de Prebióticos. *Revista de salud pública y nutrición*. 4(2).
- Kai-Xia, S., Chen, L., Qing-Liang, J. (2007). Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007), 2413-2417.
- Lamberti C., Mangiapane, E., Pessione, A., Mazzoli, R., Giunta, C., Pessione, E. (2011). Proteomic characterization of a selenium-metabolizing probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM for nutraceutical applications. *Proteomic* 11 (2001), 2212-2221.
- Maas, J. 1990. Selenium deficiency in cattle. En: *Proceeding XVI World Buiatrics Congress, Salvador, Brasil*, pp.13. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X1997000200001&script=sci_arttext#MAAS 1990 Sabado 6 de septiembre del 2014.
- Mora-Peñaflor, N., García-Guerrero., A. (2007). Susceptibilidad de Bacterias Ácido Lácticas Frente a Diversos Antibióticos. (Tesis inédita de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Noguera-Velasco, A., Mastínez-Hernández, P., Gil del Castillo, L. (2005). Determinación de selenio: importancia y medición. *Asociación Española de Farmacéuticos Analistas* 3 (2005), 21-30.
- Peña, R., Circo, S. (2007). Solución automática del método de Talmage y Fitch. *Tecnología Química* 1 (2007), 10-15.

- Pieniz, Andrezza, Queiroz Pereira, Anastácio de Oliveira Camargo, Adriano Brandelli. (2013). Production of Selenium-Enriched Biomass by *Enterococcus durans*. *Biological Trace Element Research* 155:3, 447–454.
- Saini, Sudhir K. Tomar, Vikas Sangwan y Bharat Bhushan. (2014). Evaluation of Lactobacilli from Human Sources for Uptake and Accumulation of Selenium. *Biological Trace Element Research*. 160:3, 433–436
- Suárez de Ronderos, N.D., MSc.1 Jorge Michelsen Rueda, M.D. (2004). El papel del selenio y la vitamina E en la prevención y tratamiento del cáncer de próstata *Salud Publica Costa Rica*.
- Sarang Dilip Pophalya, Poonama, Prashant Singhc, Hitesh Kumara, Sudhir Kumar Tomara, Rameshwar Singha (2014). Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: A functional food perspective. *Trends in Food Science & Technology*.
- Vodnar, Socaciu (2014). Selenium enriched green tea increase stability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* in chitosan coated alginate microcapsules during exposure to simulated gastrointestinal and refrigerated conditions. *LWT - Food Science and Technology* 57 (2014) 406-411.
- Zhi-qiang, Zhang Bo-wen, LI Ping-lan. (2009). Selenium Tolerance and Enrichment in *Bifidobacterium animalis*. *Food Science*. 15 (2009), 104-110.