



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

ESPECIALIZACIÓN

**“Efecto de la presencia de serina en medio mínimo, sobre la
producción de selenocisteína por *Streptococcus thermophilus*”**

PRESENTA:

Q.A. Jesús Alberto Segovia Cruz

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

Dr. Luis Guillermo González Olivares

SINODAL:

Dra. Araceli Castañeda Ovando

Ciudad de México., junio 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

ESPECIALIZACIÓN

“Efecto de la presencia de serina en medio mínimo, sobre la
producción de selenocisteína por *Streptococcus thermophilus*”

PRESENTA:

Q.A. Jesús Alberto Segovia Cruz

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

Dr. Luis Guillermo González Olivares

SINODAL:

Dra. Araceli Castañeda Ovando

Ciudad de México., junio 2017



Este trabajo de investigación fue realizado como parte del proyecto de Ciencia Básica 2014 con clave 241333 titulado “Estudio del mecanismo bioquímico de la biotransformación de selenio inorgánico en selenoproteínas por bacterias ácido lácticas termófilicas”

Latin Food 2016

IAFP's 5th Latin American Symposium in Food Safety
7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting

Los resultados de esta investigación fueron presentados en forma de poster, en el IAFP'S 5th Latin American Symposium in Food Safety 7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting; Latin Food 2016, llevado a cabo del 9 al 11 de noviembre en Cancún, Quintana Roo; México.



AMEPAL A.C.

Latin Food 2016

IAFP's 5th Latin American Symposium in Food Safety
7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting



CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This is to certify that the presentation entitled:

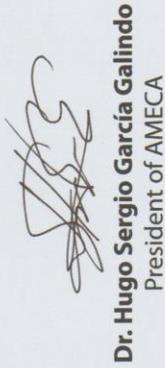
Effect of the Presence of Serina and Sodium Selenite on the Growth of
Streptococcus thermophilus in a Minimal Medium.

Authored by:

Segovia-Cruz, J.A., González-Olivares, L.G., Rodríguez-Serrano, G.M., Contreras-
López, E., Ramírez-Godínez J., Castañeda-Ovando, A., Jaimez-Ordaz, J., Añorve-
Morga, J.

Was presented in Latin Food 2016, held in Cancun Q. Roo,
México. November 9 - 11, 2016.


Dr. José Santos García Alvarado
President of AMEPAL


Dr. Hugo Sergio García Galindo
President of AMECA



UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Agradecimientos

Le agradezco a Dios de todo corazón por haberme acompañado en esta aventura. En ocasiones me sentí solo, pero siempre estuviste conmigo. Has sido mi sustento y mi motor para continuar.

A mis padres y a mi hermano: Saben que los quiero mucho, sin su apoyo incondicional no podría haber hecho nada de lo que me he propuesto.

A mi novia Coral: Eres una persona que me ha hecho muy feliz, tienes un lugar muy importante en mi corazón y en mi vida.

A mis compañeros de laboratorio: Jessica, Alexis, Emmanuel, Xóchitl, Juan, Aldahír, Daniel y Guadalupe. Gracias por hacer soportable las interminables horas que pasé en el laboratorio y por su ayudada brindada. Sin sus conocimientos no podría haber avanzado en ninguno de los experimentos que desarrolle.

Dr. Guillermo: Fue un gran privilegio que me permitiera trabajar con usted, le agradezco de todo corazón el tiempo y su amistad.

Dra. Gabriela: Sin la oportunidad que me brindó no podría haber hecho posible la especialización. Muchas gracias.

Dra. Araceli, Dra. Elizabeth y Dra. Verónica: Gracias por sus asesorías y todo el apoyo. Me gusto trabajar mucho con ustedes.

Muchas personas me ayudaron en el trascurso de esta pequeña aventura. Sin el apoyo de cada uno de ellos, el pequeño escalón que estoy subiendo no lo pude haber conseguido. A todos los llevare en mi corazón.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Impacto del selenio en la salud humana.....	2
2.2. Selenoaminoácidos.....	3
2.3. Mecanismo general de biosíntesis de selenocisteína.....	3
2.4. Selenoproteínas.....	6
2.5. Bacterias ácido lácticas.....	6
2.6. <i>Streptococcus thermophilus</i>	7
2.7. Importancia de bacterias ácido lácticas enriquecidas con selenio.....	8
2.8. Uso del selenio orgánico en la industria alimentaria.....	9
2.9. Análisis de aminoácidos por derivatización con 3-orto-ftaldehído (OPA).....	9
III. JUSTIFICACIÓN.....	11
IV. HIPÓTESIS.....	12
V. OBJETIVOS.....	13
5.1. General.....	13
5.2. Específicos.....	13
VI. MATERIALES.....	14
6.1. Reactivos.....	14
6.1.1. Preparación de reactivo empleado para la reacción de derivatización (OPA).....	14
6.2. Instrumentación.....	14
6.2.1. Espectroscopía de Emisión Atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP).....	14
6.2.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	14
VII. Metodología.....	15
7.1. Aislamiento e identificación de cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i>	15
7.2. Adaptación de cepas puras.....	15
7.3 Cálculo de la concentración crítica de inhibición.....	15
7.4. Fermentación en medios mínimos suplementados con Na ₂ SeO ₃ y serina.....	16
7.5. Separación de biomasa.....	16
7.6. Análisis de selenio por ICP.....	17
7.7. Determinación de selenocisteína por derivatización con OPA por RP-HPLC.....	17
7.7.1. Preparación de las fases móviles.....	17
7.7.2. Carboximetilación de selenocisteína.....	17

7.7.3. Reacción de derivatización.....	18
7.7.4. Determinación de selenocisteína.....	18
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
8.1. Cálculo de la concentración crítica de inhibición.....	19
8.2. Fermentaciones en medios mínimos suplementados con Na ₂ SeO ₃ y serina.....	21
8.3. Análisis de selenio por ICP	23
8.4. Determinación de selenocisteína por RP-HPLC.....	25
IX. CONCLUSIONES.....	31
X. PERSPECTIVAS	32
XI. REFERENCIAS	33
XII. ANEXO.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Etapas involucradas en la biosíntesis e incorporación de la selenocisteína.	5
Figura 2.- Reacción de derivatización de carboximetilselenocisteína con 3-ortoftaldehído.	10
Figura 3.- Curva de crecimiento de <i>Streptococcus thermophilus</i> a diferentes concentraciones de selenito de sodio (Na_2SeO_3) donde se muestra la aplicación del cálculo de Talmage y fitch modificado	20
Figura 4.- Curva de crecimiento de <i>Streptococcus thermophilus</i> en medio mínimo	21
Figura 5.- Curva de crecimiento de <i>Streptococcus thermophilus</i> en medio mínimo enriquecido con Na_2SeO_3 .	21
Figura 6.- Curva de crecimiento de <i>Streptococcus thermophilus</i> en medio mínimo enriquecido con Na_2SeO_3 y serina	22
Figura 7.- Cromatograma de carboximetilselenocisteína	26
Figura 8.- Cromatograma de la presencia de carboximetilselenocisteína de una muestra celular de <i>Streptococcus thermophilus</i> después de 17 h de fermentación en un medio mínimo enriquecido con Na_2SO_3 .	26
Figura 9.- Cromatograma de la presencia de carboximetilselenocisteína de una muestra celular de <i>Streptococcus thermophilus</i> después de 18 h de fermentación en un medio mínimo enriquecido con Na_2SO_3 .	27
Figura 10.- Cromatograma de la presencia de carboximetilselenocisteína de una muestra celular de <i>Streptococcus thermophilus</i> después de 10 h de fermentación en un medio mínimo enriquecido con Na_2SO_3 y serina.	27
Figura 11.- Cromatograma de la presencia de carboximetilselenocisteína de una muestra celular de <i>Streptococcus thermophilus</i> después de 12 h de fermentación en un medio mínimo enriquecido con Na_2SO_3 y serina.	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Medio mínimo de cultivo para <i>Streptococcus thermophilus</i> .	16
Tabla 2.- Log de UFC/mL a diferentes concentraciones de Na ₂ SeO ₃ .	19
Tabla 3.- Determinación de SE absorbido por <i>Streptococcus thermophilus</i> .	24
Tabla 4.- Determinación de selenocisteína metabolizada por <i>Streptococcus thermophilus</i> .	29
Tabla 5.- Parámetros de regresión de la curva de calibración, intensidad vs concentración de selenio (mgL ⁻¹).	38
Tabla 6.- Parámetros de regresión de la curva de calibración, área vs concentración de carboximetilselenocisteína (mgL ⁻¹).	38

ABREVIATURAS

BAL	Bacterias ácido lácticas
DI1/2	Yodotironina deydinasas
DI3	Deyodinasas
DS	Desviación estándar
DTT	Di-tiotreitol
EPS	Exopolisacáridos
GPxs	Glutación peroxidasas
ICP	Espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
MeSeC	Metilselenocisteína
MrsB1	Metionina- <i>R</i> -sulfóxido reductasa
OPA	3-orto-ftaldehido
RP-HPLC	Cromatografo de líquidos de alta resolución fase reversa
SE	Selenio
SeC	Selenocisteína
SECIS	Secuencia de intersección de selenocisteína
Sec-tRNASec	Selenocisteinil-tRNASec
SELA	Selenocisteína sintetasa
SELC	tRNASec
SELD	Selenofosfato sintetasa
SeMet	Selenometionina
SEPP1	Selenoproteína P
SEPS1	Selenoproteína S
SerRS	Seril-tRNA sintetasa
SPS	Selenofosfato sintetasa
St	<i>Streptococcus thermophilus</i>
TCNav	Total chrom navigator
TrxRs o TRs	Flavoenzima tiorredoxina reductasas

I. INTRODUCCIÓN

El selenio es un micronutriente esencial en los procesos metabólicos de los seres humanos y animales, formando parte de las denominadas selenoproteínas, compuestos que participan en varios procesos enzimáticos que contribuyen directamente al mantenimiento óptimo de la salud (Rayman, 2000).

La ingesta diaria recomendada (IDR) del selenio para el ser humano es de 55 µg/día con una concentración máxima de 400 µg/día. Aunque es una concentración muy baja, no siempre está cubierta, ya que la mayor parte de éste no se encuentra biodisponible para ser absorbido por el organismo. Esto se debe principalmente a la forma química en que se encuentre tal elemento (Pophaly *et al.*, 2014).

Generalmente las formas orgánicas de SE son más biodisponibles que las formas inorgánicas. Es así, como el selenio orgánico se puede absorber con mayor facilidad en una de sus formas orgánicas, como selenocisteína (Álvarez-Fernández, *et al.*, 2010; Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008).

Se ha observado que algunas bacterias ácido lácticas pueden incorporar a su metabolismo el selenio inorgánico para biotransformarlo. Sin embargo, el mecanismo bioquímico que precede a esta biotransformación es desconocido aún. Se sabe que este mecanismo está íntimamente ligado a la presencia de algunas sustancias como la serina; la cual participa en el proceso de síntesis a través de la acción de la enzima seril-ARNt sintetasa que está involucrada en la síntesis de selenocisteína y su subsecuente incorporación a las selenoproteínas (Pophaly *et al.*, 2014; Álvarez-Fernández *et al.*, 2010).

Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la presencia de serina en la biotransformación de selenio inorgánico en un medio mínimo por *Streptococcus thermophilus* durante un proceso de fermentación.

II. ANTECEDENTES

2.1. Impacto del selenio en la salud humana

El selenio (SE) es un elemento no metal escaso en la corteza terrestre y es considerado como un micronutriente esencial para el ser humano. Su consumo está relacionado con la prevención y tratamiento de enfermedades (Pophaly *et al.*, 2014; Khanam & Platel, 2016).

En diferentes partes del mundo como China, Finlandia y Nueva Zelanda se han observado problemas de salud en los seres humanos por la deficiencia del selenio en la dieta, ya que el contenido de selenio en los alimentos y bebidas varía de acuerdo al área geográfica dentro de cada país y entre países. Es por esto, que las políticas de salud pública de algunos países sugiere la suplementación del selenio en la dieta de los habitantes de estos lugares (Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008; Mistry *et al.*, 2012).

Se han realizado esfuerzos para aumentar el contenido de SE en las plantas, adicionando tal elemento en el suelo de cultivo y obteniendo con esto vegetales y frutos ricos en SE; o bien, utilizando tales vegetales para la alimentación animal, fomentando con esto la síntesis de seleno-proteínas en los animales y facilitando la acumulación en carne (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique, 2008).

La deficiencia de SE en los seres humanos es rara, pero existen pruebas de que los cambios menos evidentes en la biodisponibilidad del SE pueden afectar aspectos de la salud, tales como: la respuesta inmune, la neurodegeneración, las enfermedades cardiovasculares, los trastornos músculo-esqueléticos, la enfermedad de Kashine Beck, el cáncer, entre otros. Adicionalmente, se ha encontrado evidencia que sugiere que este elemento juega un papel importante en la reproducción en animales y humanos. Sin embargo, una sobredosis de este oligoelemento puede provocar selenosis (Zhuo & Diamond, 2009; Mistry *et al.*, 2012).

Por otro lado, la forma inorgánica de SE no es del todo biodisponible, ya que de la ingesta total sólo alrededor del 1-2% es absorbido por el cuerpo humano. Además, la biodisponibilidad del SE también se ve afectada por el procesamiento térmico de los alimentos ya que esto disminuye su contenido por volatilización con

pérdidas reportadas de hasta un 40% (Reeves *et al.*, 2009; Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008; Khanam *et al.*, 2016). Adicionalmente, se sabe que la biodisponibilidad del SE está influenciada por factores de la dieta. Un ejemplo de ello es el hecho de que la ingesta de vitaminas A y E aumenta su biodisponibilidad, mientras la presencia de metales pesados y fibra dietética la disminuyen (Zhuo & Diamond, 2009).

2.2. Selenoaminoácidos

Los selenoaminoácidos son moléculas orgánicas donde se puede encontrar el selenio en sus diferentes formas orgánicas como la seleniocisteína (SeC), selenometionina (SeMet), metilselenocisteína (MeSeC), entre otros. La SeC o también denominado el aminoácido 21, es un selenoaminoácido que se considera biológicamente activo, el cual difiere de la cisteína por sólo un átomo de selenio en lugar de azufre, teniendo un pK_a de 5.2 y 8.5, respectivamente (Álvarez-Fernández *et al.*, 2010).

La SeC se sintetiza a partir de serina como precursor en una serie de reacciones que requieren un mecanismo específico donde se utiliza el SE. Este aminoácido se produce en proteínas de tres reinos de la vida (*Eukaria*, *Archea* y bacterias), así como en virus. Este aminoácido forma parte del centro activo de algunas selenoproteínas, como las glutatión peroxidasa (GPx), tiorredoxina reductasa (TrxR) y selenoproteína P (SeP), por lo que la deficiencia de selenio puede provocar una disminución en la actividad enzimática de las selenoproteínas que tienen un papel importante en todas las formas de vida (Arnér, 2010; Rother, 2012).

Los selenoaminoácidos pueden ser producidos por diferentes tipos de microorganismos, especialmente la seleniocisteína por bacterias ácido lácticas, las cuales tienen una gran versatilidad e importancia en la industria y tecnología de alimentos (Pophaly *et al.*, 2014).

2.3. Mecanismo general de biosíntesis de selenocisteína

El primer paso para la incorporación de SeC en proteínas procariontas, inicia con la aminoacilación del tRNA^{Sec} (SELC) con un residuo de serina adenilada por acción de la enzima seril-tRNA sintetasa (SerRS). Después de la aminoacilación,

una selenocisteína sintetasa (SELA), dependiente de piridoxal fosfato, remueve un grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina formando un intermediario denominado seril-tRNA^{Sec}. Este compuesto intermediario insaturado se tautomeriza para formar un grupo amino inestable.

Al mismo tiempo, una enzima selenofosfato sintetasa (SELD) cataliza la formación de selenofosfato y ATP. El selenofosfato es obtenido a partir de selenito o selenocisteínas a través de la acción de selenotransferasas y selenocisteína liasa, respectivamente. El selenofosfato, forma activa de selenio, es entonces transferido a seril-tRNA^{Sec} produciendo así selenocisteinil-tRNA^{Sec} (Sec-tRNA^{Sec}) que poco después es liberada. Un factor de elongación de traducción específico denominado SELB, el cual carga una molécula de GTP, se une al selenocisteinil-tRNA^{Sec} en el ribosoma mediante la unión del elemento SECIS en el mRNA. (da Silva, 2013; Martil, 2014).

Adicionalmente, se sabe que parte del N-terminal del SELB es probablemente capaz de unirse al selenocisteinil-tRNA^{Sec} al complejo formado SELB-GTP-Sec-tRNA^{Sec}. Este complejo encamina al Sec-tRNA^{Sec} para el ribosoma a través de su vínculo con el elemento SECIS en mRNA. Por otro lado, el fragmento C-terminal se liga exclusivamente al elemento SECIS en mRNA.

Se supone que una parte inferior del elemento SECIS sufre alguna modificación de manera que el codón UGA es posicionado dentro del sitio A del ribosoma, en cuanto que su parte superior permanezca ligada a SELB. Al mismo tiempo, el anticodón de Sec-tRNA^{Sec} es pareado con un codón UGA del sitio A que después hidroliza la molécula de GTP. SELB permanece ligado a un GDP y se desprende de tRNA y de la estructura SECIS. Por último Sec-tRNA^{Sec} permanece en el sitio A del ribosoma, permitiendo así que el residuo de SeC sea incorporado a la cadena polipeptídica naciente. En la Figura 1 se muestran las etapas involucradas en la biosíntesis e incorporación de selenocisteína en *Escherichia coli* (da Silva, 2013; Martil, 2014).

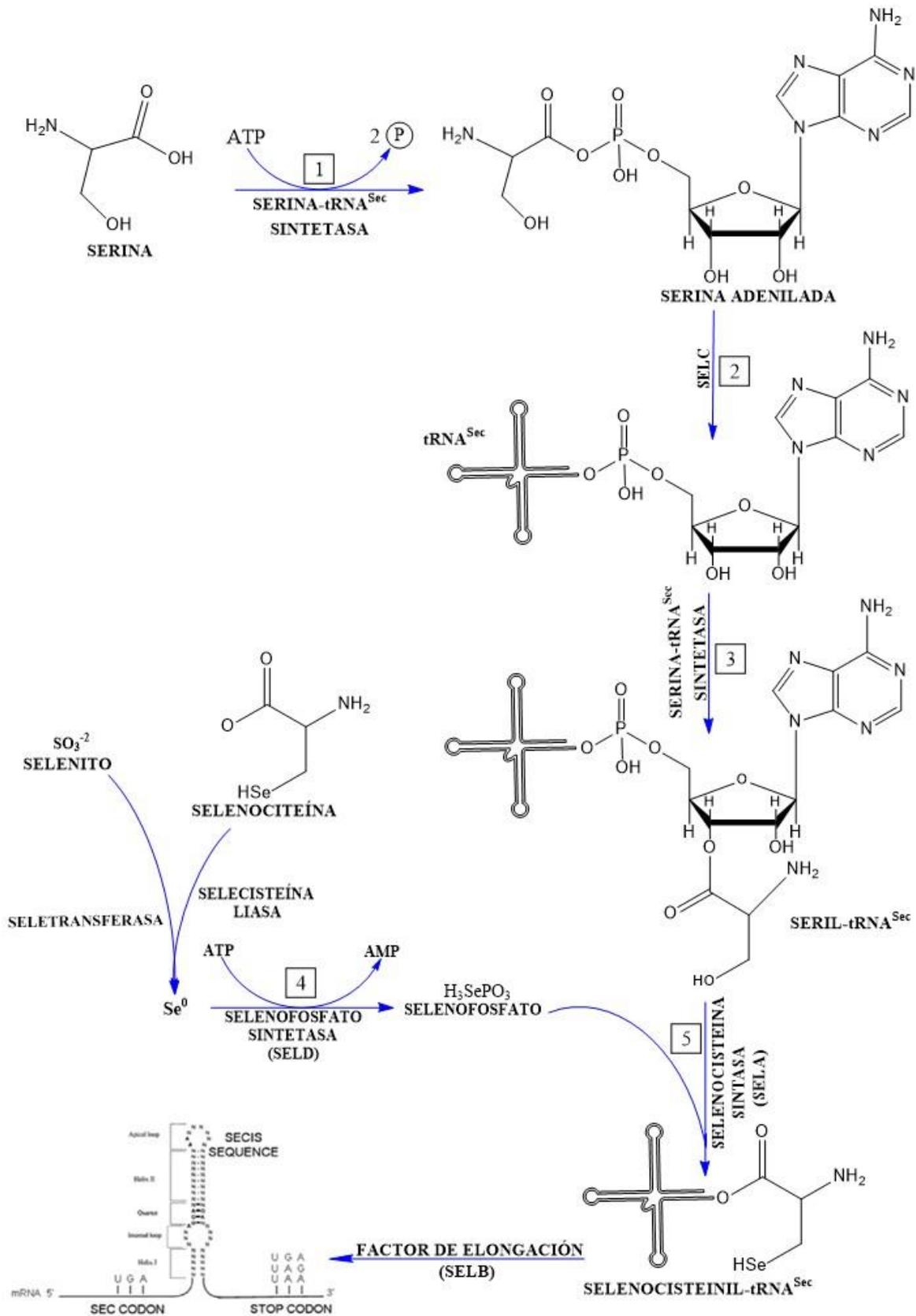


Figura 1. Etapas involucradas en la biosíntesis e incorporación de la selenocisteína. (Modificado de Martil, 2014).

2.4. Selenoproteínas

El SE se encuentra en el cuerpo humano en las selenoproteínas, bajo la forma de selenocisteína (SeC). Se han identificado 25 tipos de genes que codifican para selenoproteínas en los seres humanos. Dentro de ellas se encuentra, la regulación de especies reactivas del oxígeno, homeostasis redox y el metabolismo de la hormona tiroidea. También están implicadas en la reducción de CO₂ a metano y la producción de moléculas ricas en energía como formiato y glicina (Metanis & Hilvert, 2014).

Se han identificado más de 50 selenoproteínas de familias diferentes. Entre las que se encuentran la selenofosfato sintetasa (SPS), glutatión peroxidasas (GPxs), flavoenzima tiorredoxina reductasas (TrxRs o TRs), metionina-*R*-sulfóxido reductasa (MrsB1), yodotironina deydinasas (DI1/2), deydinasa (DI3) selenoprotiena P (SEPP1) selenoproteína S (SEPS1), las cuales han sido aisladas y caracterizadas bioquímicamente (Metanis & Hilvert, 2014).

Las selenoproteínas juegan un rol muy importante en procesos fisiológicos debido a la acción antioxidante que el selenio ejerce, aún integrado como selenocisteína. Esta actividad se atribuye principalmente a la acción natural de selenoproteínas como la glutatión peroxidasa, la tiorredoxina reductasa, deydinasa yodotironina y selenoproteína P, las cuales presentan propiedades redox únicas, que a su vez son asociadas a la presencia de selenocisteína en el sitio activo de estas enzimas (Rayman, 2012). Muchas de estas enzimas, son también sintetizadas por bacterias ácido lácticas.

2.5. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos utilizados comúnmente en la cadena alimentaria del ser humano. Están involucradas en la producción de alimentos fermentados, producción de biomoléculas y también como huéspedes simbióticos hospedados en el intestino, promoviendo con esto la salud y el bienestar de los seres humanos (Lyer *et al.*, 2010; Tamang *et al.*, 2016).

Además, las BAL tienden a soportar ambientes extremos y condiciones de estrés. Tales condiciones se pueden clasificar en dos categorías: las primeras son tecnológicas (oxidación, frío, alta presión osmótica y alta temperatura), las segundas

se denominan de estrés fisiológico (oxidación, bajo pH, concentraciones altas de sales biliares y toxinas) (Pophaly *et al.*, 2012).

Otra de sus facultades son las características aportadas a los alimentos, como son el incremento de su vida útil y proporcionan atributos organolépticos típicos de los productos (Sreevani *et al.*, 2013).

Una propiedad muy importante que tienen las BAL es la capacidad de unirse, captar y biotransformar los iones metálicos del medio a formas elementales y orgánicas. Entre estos iones se encuentra el selenio inorgánico, donde las BAL lo pueden transformar a selenocisteína que es un aminoácido biodisponible para el cuerpo humano (Álvarez-Fernández *et al.*, 2010; Pophaly *et al.*, 2014;).

Las BAL y las bifidobacterias forman parte importante en la dieta de los seres humanos en diferentes partes del mundo a través de los productos fermentados, por lo que su capacidad de biotransformación de SE inorgánico da lugar a la obtención de una fuente barata para la alimentación de animales y humanos (Ren *et al.*, 2011).

2.6. *Streptococcus thermophilus*

El *Streptococcus thermophilus* es un tipo de BAL, el cual es un microorganismo gram-positivo, microaerófilo, homofermentativo, anaerobio facultativo, GRAS, fermentador de lactosa, productor de bacteriocinas, vitaminas, ácido láctico, diacetilo, formiato, acetoína, acetaldehído y acetato como productos finales; además de que cuenta con capacidad proteolítica.

Esta BAL ha sido utilizada como iniciador en la producción de alimentos fermentados como yogurt y queso. Además, algunas especies son capaces de producir exopolisacáridos (EPS), que ayudan a mejorar la viscosidad, la textura, aumentar la resistencia a la manipulación mecánica y disminuyen la susceptibilidad al desuerado (Pieniz *et al.*, 2010; Zajsek *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016).

Hay investigaciones donde se conoce el efecto de la adición de selenito de sodio en la leche durante la producción de yogurt, sobre la biotransformación a MeSeC y SeC. Esta biotransformación es llevada a cabo por bacterias como *Streptococcus thermophilus* en el yogurt, donde el principal selenoaminoácido producido por ellas es la selenocisteína (Palomo *et al.*, 2014; Pophaly *et al.*, 2014).

2.7. Importancia de bacterias ácido lácticas enriquecidas con selenio

Existen enormes beneficios para la salud de los seres humanos y animales cuando consumen BAL enriquecidas con selenio. Estas bacterias se consumen en productos lácteos y no lácteos que se encuentran en el mercado en diferentes países del mundo (Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008).

Dentro de los beneficios asociados al consumo de BAL enriquecidas con SE están: reconstrucción de la masa ósea, fortalecimiento del sistema inmunológico, regulación de la función de la tiroides, mejora de la fertilidad masculina, reducción en el riesgo de contraer cáncer, reducción en el envejecimiento, disminución de fatiga, disminución de problemas de la flora intestinal, entre otros (Pophaly *et al.*, 2014).

Por otro lado, el grado de biotransformación del SE depende del tipo de bacterias que se encuentran en el proceso de fermentación. Además, el proceso también es dependiente de la forma de SE inorgánico que se encuentre en el medio y de las condiciones de cultivo, y se sabe que los productos de biotransformación (selenoaminoácidos) alteran las características sensoriales de los alimentos fermentados seleno-enriquecidos desde el color, hasta el aspecto y el olor (Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008).

La innovación de productos lácteos es consecuencia de los estudios e investigaciones acerca de los beneficios que ofrecen a la salud humana, uno de estos es el relacionado a los beneficios directos que las BAL confieren cuando son suplementadas con selenio. Tal desarrollo tecnológico ha abierto las puertas a un mundo de posibilidades nutricionales donde se pueden adquirir fuentes de SE a partir de la fermentación de alimentos. Además, los productos de fermentación también son sustancias funcionales eficaces en la industria alimentaria y médica (Zhang *et al.*, 2015).

A pesar de los grandes beneficios sobre los aspectos tecnológicos y de salud de los probióticos enriquecidos con selenio y el desarrollo de alimentos funcionales, existen muy pocos informes sobre su toxicidad y efectos secundarios. Por lo que se necesitan investigaciones extensas y a profundidad de los productos, para así tener un desarrollo integral que beneficie completamente a los consumidores (Navarro-Alarcón & Cabrera-Vique, 2008).

2.8. Uso del selenio orgánico en la industria alimentaria

En los últimos años los consumidores son más conscientes de lo que comen y es por ello que exigen alimentos que contribuyan beneficiosamente a su salud. Hoy en día los alimentos están destinados no solamente a satisfacer el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios, sino también para prevenir las enfermedades relacionadas con la nutrición y la mejora del bienestar físico y mental (Betoret *et al.*, 2011).

El aumento en la demanda de este tipo de alimentos se debe a que existe un creciente incremento en el costo de la asistencia médica, el aumento constante de la esperanza de vida y el deseo de las personas mayores para mejorar su calidad de vida (Roberfroid, 2007).

Con el afán de contrarrestar las deficiencias del selenio en la dieta de las poblaciones humanas, se han desarrollado nuevas tecnologías para la generación de nuevas moléculas, más seguras y nutritivas. Estas moléculas son la selenocisteína, selenometionina y compuestos metilados de selenio. También han surgido nuevos alimentos que contienen probióticos enriquecidos con SE. Estos, han demostrado contribuir a la salud de quien los ingieren. De igual manera se han desarrollado nuevos alimentos funcionales enriquecidos con SE, como son: té, sal de mesa, yogurt, kéfir, formula infantil, ajo, cebolla, hongos, tuna, carne de carnero, entre otros (Khanam & Platel, 2016).

La utilización del selenio en industria alimentaria busca fortalecer las carencias de este oligoelemento en la dieta de la población así como también contrarrestar enfermedades que contribuyen a la mortalidad y movilidad de las poblaciones (Kieliszek *et al.*, 2013; Pophaly *et al.*, 2014).

2.9. Análisis de aminoácidos por derivatización con 3-orto-ftaldehído (OPA)

Uno de los principales métodos de análisis de aminoácidos se realiza mediante la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa conocida también como RP-HPLC (por su nombre en inglés). Es una técnica que implica la separación de las moléculas basándose en su hidrofobicidad, esta separación depende de la unión hidrófoba de la molécula del soluto de la fase móvil a la fase estacionaria, es decir, la columna cromatográfica. Los solutos se eluyen en presencia de tampones acuosos y la adición de un disolvente orgánico, éstos se

hacen pasar a través de la fase estacionaria. La elución se puede llevar a cabo por condiciones isocráticas y por elución en gradiente. En la primera, la concentración del disolvente orgánico es constante, en la segunda la cantidad de disolvente se incrementa durante un periodo de tiempo. Los solutos son, por lo tanto, eluidos en orden de hidrofobicidad molecular de forma creciente (Aguilar, 2004).

El HPLC está acoplado a diferentes tipos de detectores, los cuales se encargan de identificar los compuestos de acuerdo a sus características químicas particulares. Uno de estos detectores es el UV-vis que consiste en identificar los compuestos de acuerdo a sus cambios cromáticos resultado de la longitud de onda en la que inciden, pudiendo ir tales longitudes desde 195 a 800 nm (Skoog *et al.*, 2008).

El OPA es un compuesto que no tiene fluorescencia natural y ésta se desarrolla cuando reacciona sólo con el grupo amino de los aminoácidos primarios. Esta reacción se desarrolla en un medio acuoso a pH fuertemente alcalino en presencia de un agente reductor, como es el caso del 2-mercapto-etanol, dando como resultado un isoindol. La reacción se finaliza en 1 o 2 min a temperatura ambiente. Para obtener una mayor sensibilidad la detección se debe determinar por un detector UV-vis a una longitud máxima de 339 nm. En la Figura 2 se muestra la reacción de derivatización con OPA de carboximetilselenocisteína (Shively, 1986; Leyva-Lopez, 2015).

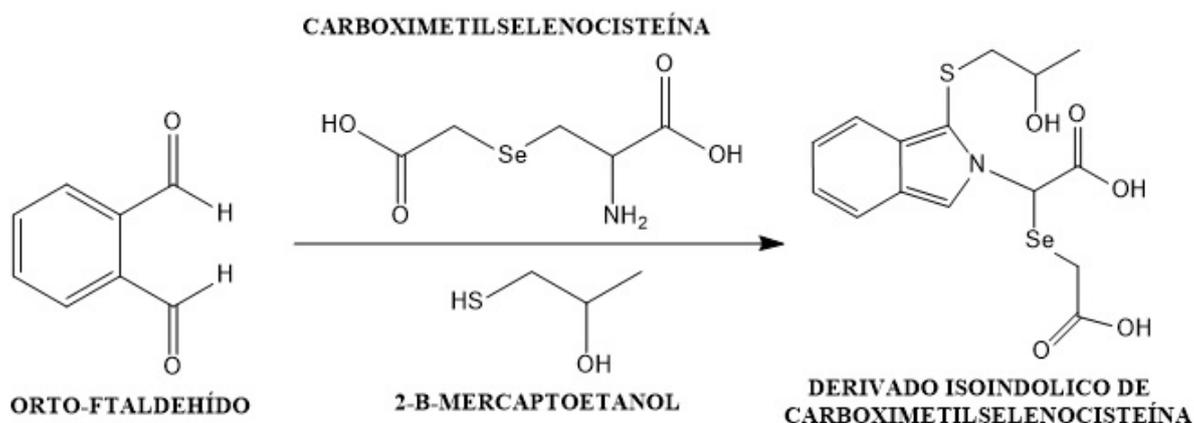


Figura 2. Reacción de derivatización de carboximetilselenocisteína con o-ftaldehído. (Modificada de Leyva-Lopez, 2015).

III. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos capaces de transformar el selenio inorgánico a proteínas de carácter biológico como son las selenoproteínas. Estas proteínas rigen una serie de procesos metabólicos que ocurren en el ser humano, promoviendo con esto un incremento en la salud. Al mismo tiempo, ayudan en la prevención y tratamiento de enfermedades degenerativas.

Existen investigaciones donde se ha estudiado el mecanismo bioquímico que siguen las bacterias ácido lácticas en la biotransformación de selenio inorgánico a selenoproteínas. Sin embargo, se desconocen algunos mecanismos de regulación en esta conversión. Se sabe que la serina participa en este mecanismo.

Es por ello, que este trabajo está enfocado en medir la respuesta que tiene *Streptococcus thermophilus* ante la presencia de serina para la obtención de selenoproteínas. Así, se demostrará la importancia de este aminoácido en la biotransformación de selenio inorgánico por este microorganismo.

IV. HIPÓTESIS

La síntesis de selenoproteínas por bacterias ácido lácticas a partir de selenio inorgánico, sigue un proceso metabólico complejo. Para que la síntesis tenga lugar se debe partir de una molécula de serina que aminoacila un ARNt específico para selenocisteína. En este sentido, la presencia de serina puede tener un efecto inductor en la biotransformación de selenio inorgánico en selenocisteína para su posterior integración en cadenas polipeptídicas en el metabolismo de *Streptococcus thermophilus*.

V. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el efecto de la presencia de serina durante una fermentación por *Streptococcus thermophilus* en un medio mínimo, para determinar la concentración de selenocisteína producida a partir de selenio inorgánico.

5.2. Específicos

- Determinar el punto crítico de inhibición de crecimiento de *S. thermophilus* a través de la fermentación en medio MRS enriquecido con selenito de sodio.
- Enriquecer *S. thermophilus* con selenio inorgánico a través de una fermentación en medio MRS adicionado con la concentración crítica de inhibición de selenito de sodio.
- Realizar una curva de crecimiento de *S. thermophilus* en medio mínimo enriquecido con la concentración crítica inhibitoria de selenito de sodio y serina.
- Determinar la concentración de selenio absorbido durante la fermentación por *S. thermophilus* a través de un análisis de ICP.
- Determinar la concentración de selenocisteína sintetizada por *S. thermophilus* durante la fermentación en medio mínimo por medio de un análisis por RP-HPLC.

VI. MATERIALES

6.1. Reactivos

6.1.1. Preparación de reactivo empleado para la reacción de derivatización (OPA)

Se disolvieron 50 mg de *o*-ftaldehído (OPA, Sigma Aldrich), en 500 μL de buffer de boratos $0.4 \text{ molL}^{-1}\text{M}$ ($\text{pH} = 9.5$), 4 mL de metanol y 50 μL de β -mercaptoetanol. La solución se preparó antes de cada análisis debido a su inestabilidad. (Shively, 1986; Castillo-Portela, 2011).

6.2. Instrumentación

6.2.1. Espectroscopía de Emisión Atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP)

El equipo que se utilizó fue un espectrofotómetro de emisión atómica con fuente de plasma (Pekin Elmer, modelo Optima 8300) con flujo de argón de 8 L/min.

6.2.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), marca Perkin Elmer, modelo Series 200, equipado con una bomba cuaternaria, inyector manual Rheodyne, detector UV-vis (Perkin Elmer, modelo Series 200) con una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6X150 mm 5- μm (Marca: Angilent).

VII. Metodología

7.1. Aislamiento e identificación de cepas de *Streptococcus thermophilus*

Se aislaron las cepas de *Streptococcus thermophilus* de un yogurt comercial (Yoplait) en agar M-17, se incubaron a 42°C y se identificaron morfológicamente con tinción de Gram (Flores-Aguilar, 2014).

7.2. Adaptación de cepas puras

Las cepas puras de *Streptococcus thermophilus* se pre-cultivaron a 42°C en caldo MRS, previamente sonicado por 5 minutos para eliminar el exceso de oxígeno, hasta el final de la fase exponencial de crecimiento. Este se etiquetó como caldo de conservación.

Antes de su inoculación en los medios mínimos, el cultivo se centrifugó a 10000 g y el sedimento se lavó dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (50 mmol L⁻¹ a pH 6.5) con la finalidad de eliminar todos los nutrientes remanentes (Hutkins & Goh, 2014; Letort & Juillard, 2001).

7.3 Cálculo de la concentración crítica de inhibición

Para determinar la concentración crítica de inhibición de SE (IV), a partir de los caldos de conservación se inoculó una concentración conocida (UFC/mL) de *Streptococcus thermophilus* en 5 mL de caldo MRS suplementado con selenito de sodio (Na₂SeO₃) con concentraciones calculadas en base a estudios anteriores (Flores-Aguilar, 2014) y a partir de una solución de agua estéril desionizada de 900 mgL⁻¹: 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250 y 300 mgL⁻¹.

La fermentación se llevó a cabo en anaerobiosis a 42°C por 36 horas. Se tomaron muestras para medir cuenta viable al final y al inicio de la incubación, mediante la siembra en agar-MRS de las diluciones sucesivas en agua peptonada. Los resultados se expresaron en UFC por mL.

Para la determinación exacta del punto crítico de inhibición se utilizó el método gráfico de Talmage y Fitch modificado según González-Olivares *et al* 2016).

7.4. Fermentación en medios mínimos suplementados con Na₂SeO₃ y serina

El medio mínimo se preparó de acuerdo al protocolo de Letort y Juillard (2003) modificado. Se colocó una concentración de vitaminas de complejo B de 5.275×10^{-4} g L⁻¹ y una concentración de cistina de 0.12 g L⁻¹ (Tabla 1).

Se inoculó una concentración conocida (10^7 UFC) de *Streptococcus thermophilus* previamente lavado con buffer de fosfatos 50 mmol L⁻¹ pH 6.5, en una serie de tubos de ensayo que contenían 5 mL de medio mínimo enriquecido con la concentración crítica de inhibición de Na₂SeO₃ junto con 340 mg L⁻¹ de serina; igual que una serie de tubos que sólo contenían la concentración crítica de Na₂SeO₃. La fermentación se llevó a cabo por 24 horas a 42°C (Flores-Aguilar ,2014; Letort & Juillard, 2001).

Tabla 1.- Medio mínimo de cultivo para *Streptococcus thermophilus*.

Componentes	Concentración, gL ⁻¹	Componentes	Concentración, gL ⁻¹
Lactosa	5.00	Metionina	0.06
Acetato de sodio	1.00	Leucina	0.10
Citrato de amonio	0.60	Isoleucina	0.05
KH ₂ PO ₄	3.00	Valina	0.20
K ₂ HPO ₄	2.50	Piridoxamina	4×10^{-4}
Urea	0.24	Ácido nicotínico	0.5×10^{-4}
Ácido ascórbico	0.5	Riboflavina	2.5×10^{-5}
MgCl ₂ •6H ₂ O	0.16	Pantotenato de calcio	0.5×10^{-4}
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.01	Tiamina	2.5×10^{-6}
Cistina	0.15	Serina	0.34
Glutamina	0.12		

7.5. Separación de biomasa

Después de las fermentaciones, se tomó una alícuota de 1 mL de cada uno de los caldos fermentados y se centrifugaron a 10000 g por 15 min a 4°C para separar células del medio de cultivo. Los pellets de células se resuspendieron en 100 µL de di-tiotreitól (DTT) al 0.3% (p/v) para liberar cualquier posible enlace de selenio con grupos amino de las proteínas membranales, para no afectar las mediciones de selenio metabolizado y adsorbido por la bacteria. Las células se

centrifugaron se indica al inicio del párrafo con la finalidad de retirar la solución de DTT. Se conservaron los medios madre y los medios sin células para la cuantificación de SE (Flores-Aguilar, 2014).

7.6. Análisis de selenio por ICP

Para la determinación de SE inorgánico por ICP las muestras se digestaron en un sistema de reacción acelerada por microondas (Microondas “CEM” modelo MARS S). Se utilizó una rampa de temperatura que partía de temperatura ambiente hasta llegar a 175°C durante 5.5 minutos y de 175 a 180°C durante 4.5 minutos, con un límite de presión de 110 psi. (Flores-Aguilar, 2014). Después, la solución resultante se llevó a un volumen final de 25 mL con agua desionizada (18 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Las soluciones estándar de selenio se prepararon a partir de una solución de 50 mg/L de SE en matriz nítrica de 5 % de HNO_3 (Perkin Elmer Pure) para posteriormente realizar la curva de calibración respectiva, en el intervalo de 0.2-3 mgL^{-1} . Cada uno de los estándares y las muestras se analizaron a una longitud de onda máxima de emisión del SE (196 nm) por medio de un equipo de ICP. La concentración de SE que se encontraba en el medio de cultivo y en los medios libres de células se calculó por medio de interpolación y se consideraron las diluciones correspondientes (Flores-Aguilar, 2014).

7.7. Determinación de selenocisteína por derivatización con OPA por RP-HPLC

7.7.1. Preparación de las fases móviles

Para la determinación se utilizaron como fases móviles buffer de acetato de sodio 0.1 molL^{-1} pH 7.2, con 0.1% de acetonitrilo (Fase A) y metanol (Fase B). Ambas soluciones se filtraron a través de una membrana de tamaño de poro de 0.45 μm . Las filtraciones se realizaron por triplicado para ambas fases (Turlo *et al.*, 2007).

7.7.2. Carboximetilación de selenocisteína

La reacción de carboximetilación se llevó a cabo en un matraz schlenk macho (Anorsur) en el que se colocaron 50 mg de seleno-L-cistina con 375 μL de agua desionizada junto con 15 mg de KBH_4 , en atmósfera de nitrógeno a 50 °C por 1 h, después se adicionó 1 mL de 0.4 molL^{-1} de ácido yodoacético a pH= 8.5 ajustado

con 1 M de NaOH, en atmósfera de N₂ a 37 °C por 1 h en oscuridad; para terminar la reacción se le adicionaron 50 µL β-mercaptoetanol y se dejó en refrigeración por una noche. El estándar de carboximetilselenocisteína se preparó a partir de seleno-L-cistina.

Las muestras se trataron de la misma forma como se describe para el estándar pero fueron previamente sonicadas en un baño ultrasónico (Branson 2510) durante 1 h. Después de la carboximetilación se adicionaron 50 µL de HCl 6 molL⁻¹ en atmósfera de nitrógeno y la hidrólisis se realizó durante 20 h a 110°C (Shively, 1986; Crankshaw & Grant 1996; Turlo *et al.*, 2007).

7.7.3. Reacción de derivatización

La reacción de derivatización se realizó mezclando 1 mL buffer de boratos a 0.4 molL⁻¹ pH 9.5, 30 µL muestra o estándar de carboximetilselenocisteína y 30 µL de solución OPA (Shively, 1986; Brückner *et al.*, 1995; Vázquez *et al.*, 1995).

7.7.4. Determinación de selenocisteína

La detección de la selenocisteína se realizó con un detector de UV-vis a una longitud de onda máxima de 340 nm con un volumen de inyección de 20 µL de la muestra. Para llevar a cabo el análisis, las fases móviles se desgasificaron con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de aire disuelto en ellas.

Se estabilizó la columna a un flujo de 1.0 mL min⁻¹. Para la separación se utilizó una columna Zorbax Eclipse C₁₈ (Turlo *et al.*, 2007; Leyva-Lopez, 2015).

El gradiente utilizado fue: 75% A durante 25 min, después se modificó la polaridad a 100% de B durante 20 min, teniendo un tiempo de corrida de 45 min (Turlo *et al.*, 2007).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Cálculo de la concentración crítica de inhibición

Los resultados obtenidos sobre la determinación de la concentración crítica de inhibición de *Streptococcus thermophilus* para Na₂SeO₃ se muestran en la Tabla 2.

La concentración inicial de microorganismos fue de 8.85 log de UFC. Se observó que a medida que la concentración de selenio aumentaba, la concentración de biomasa en el medio disminuía. El microorganismo presentó un crecimiento nulo a concentraciones de 200 mgL⁻¹ de Na₂SeO₃.

Tabla 2. Log de UFC/mL a diferentes concentraciones de Na₂SeO₃.

Concentración (mgL ⁻¹ Na ₂ SeO ₃)	Log UFCmL ⁻¹ ± DS
0	7.51 ± 0.0
20	7.14 ± 0.0
40	6.09 ± 0.07
60	6.47 ± 0.46
80	6.19 ± 0.58
100	5.84 ± 0.76
150	4.57 ± 0.38
200	0
250	0
300	0

La concentración crítica de inhibición para *Streptococcus thermophilus* se encontró con 140 mgL⁻¹ (Figura 3), aplicando el cálculo de Talmage y Fitch modificado (Flores-Aguilar, 2014).

Se ha observado que a concentraciones de 5 mmol L⁻¹ de selenito de sodio en MRS tiene un efecto negativo en el crecimiento bacteriano, inhibiéndolo o desacelerándolo. Por el contrario se conoce que concentraciones no superiores a 20 mmol L⁻¹ de selenito de sodio en MRS, favorecen el crecimiento de las BAL (Pophaly *et al.*, 2014).

De acuerdo a Calomme *et al.* (1995) algunas BAL son capaces de sobrevivir a concentraciones de hasta 200 mgL⁻¹ en medios enriquecidos con Na₂SeO₃. Por otro lado, González-Olivares *et al.* (2016) demostraron que la concentración de Na₂SeO₃ tolerada por varios lactobacilos, es variable y puede depender de sus características metabólicas particulares.

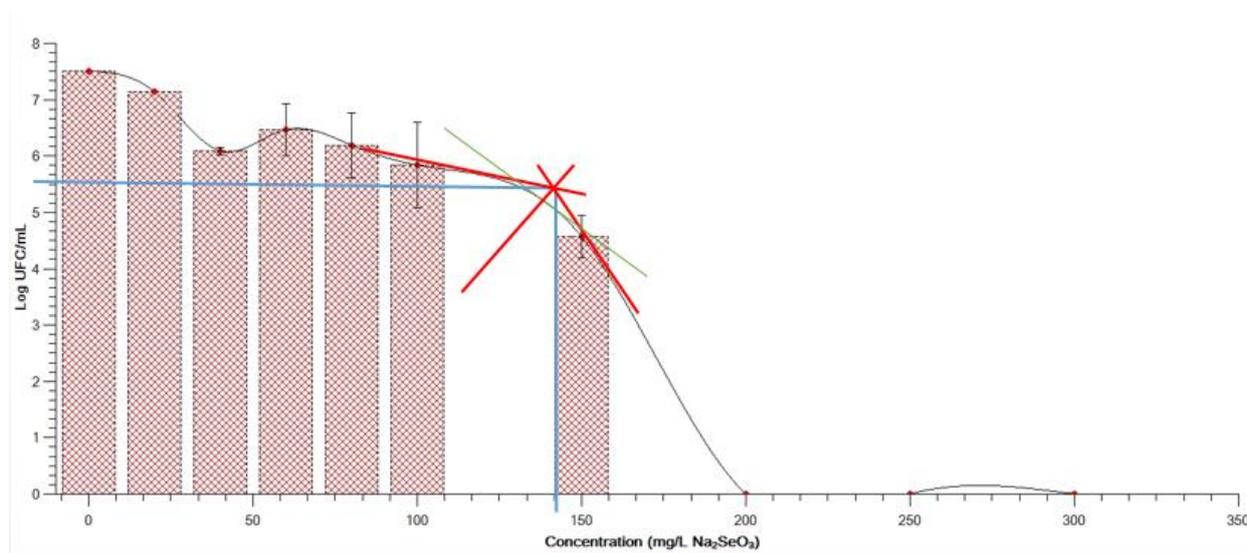


Figura 3. Curva de crecimiento de *Streptococcus thermophilus* a diferentes concentraciones de selenito de sodio (Na₂SeO₃).

Se determinó que el *Streptococcus thermophilus* utilizado en este estudio, tiene una concentración mínima inhibitoria de 140 mg L⁻¹, esta concentración fue elevada en comparación con lo reportado por González-Olivares *et al.* (2016) quienes obtuvieron crecimiento de BAL por debajo de los 140 mgL⁻¹, con excepción de *L. rhamnosus*, el cual alcanzó concentraciones mayores a 150 mgL⁻¹ de tolerancia a selenito de sodio. Pero también el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* a 140 mg L⁻¹ es elevado en comparación con otras BAL que no crecieron a concentraciones mayores de 80 mg L⁻¹ (Xia *et al.*, 2007).

La concentración crítica de inhibición de Na₂SeO₃ determinada, se utilizó para preparar la suplementación de los medios mínimos enriquecidos, la cual correspondió a 63.92 mg L⁻¹ de selenio (140 mg L⁻¹ de Na₂SeO₃).

8.2. Fermentaciones en medios mínimos suplementados con Na_2SeO_3 y serina

Se realizaron las cinéticas de crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en el medio mínimo (Figura 4), en el medio mínimo suplementado con Na_2SeO_3 (Figura 5) y en el medio mínimo suplementado con Na_2SeO_3 y serina (Figura 6).

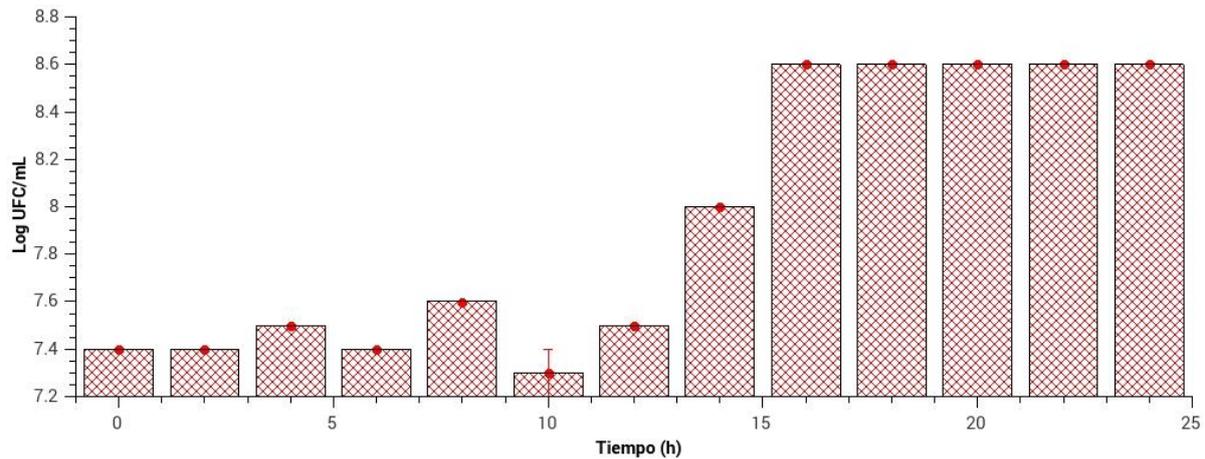


Figura 4. Curva de crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en medio mínimo.

En las Figuras 4, 5 y 6 se observa la fase logarítmica de crecimiento para cada uno de los experimentos. Es en ésta donde las células tienen una máxima actividad metabólica debido a la concentración de nutrientes en el medio, y además, es aquí donde se producen los metabolitos resultantes del crecimiento microbiano (Tortora *et al.*, 2007).

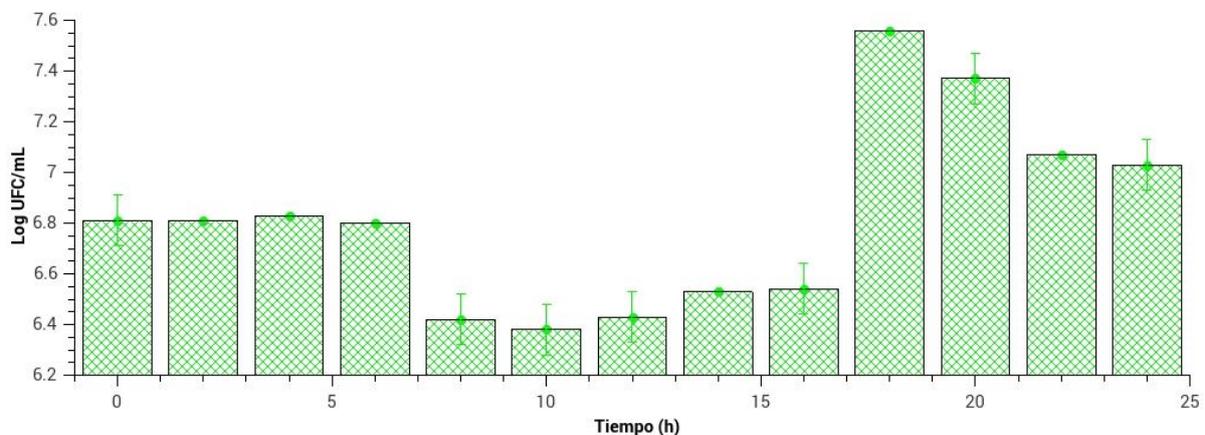


Figura 5. Curva de crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en medio mínimo enriquecido con Na_2SeO_3 .

En las curvas de crecimiento de *Streptococcus thermophilus* se observaron diferencias en los tiempos de la fase de adaptación, que fue independiente de la concentración inicial de microorganismo. De igual manera se mostraron diferencias en el inicio de la fase logarítmica. La curva de fermentación del medio mínimo enriquecido con Na_2SeO_3 y serina (Figura 6), muestra que el tiempo de la fase de adaptación fue menor que el de las otras dos curvas. Esto indica que la concentración de serina adicionada en el medio podría estar promoviendo un crecimiento más acelerado de *Streptococcus thermophilus* pero con menor concentración de microorganismos durante el experimento, ya que hubo mayor crecimiento en los experimentos sin serina. Esto pudo deberse a la sobreexpresión de las enzimas participantes en la absorción y transformación de selenio inorgánico que es observado en las bacterias ácido lácticas y bifido bacterias descubierto por Lamberti *et al.* (2011). Por otro lado, la adaptación del microorganismo a la presencia de Na_2SeO_3 , provoca un alargamiento de la fase lag y esto a su vez incide en que el inicio de la fase logarítmica se vea retrasado (Andreoni *et al.*, 2000).

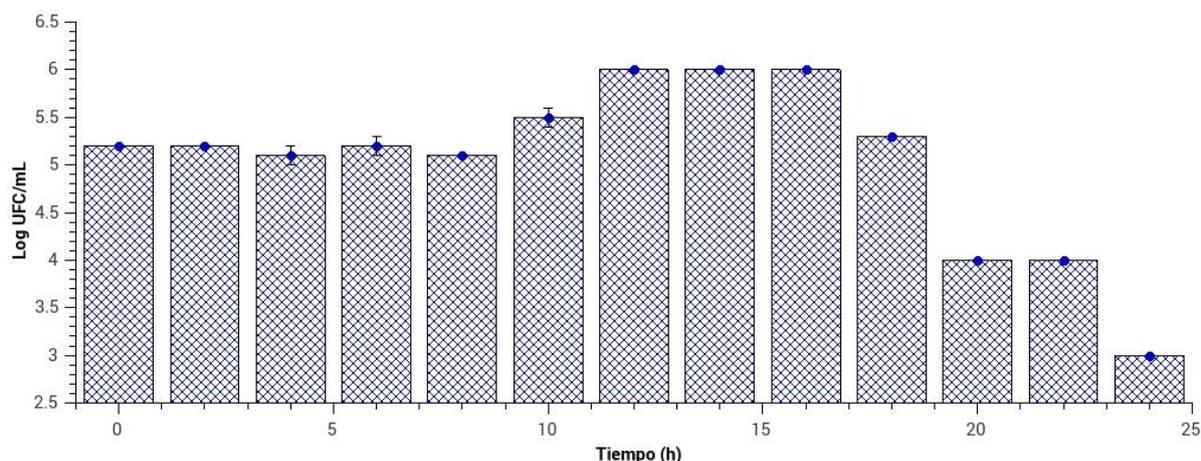


Figura 6. Curva de crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en medio mínimo enriquecido con Na_2SeO_3 y serina.

Además, se observó que el microorganismo experimentó una fase lag de menor tiempo en el medio suplementado con serina y la sal de selenio (Figura 6), en contraste con los microorganismos que se hicieron crecer en los medios sin suplementación (Figura 4) y el suplementado con Na_2SeO_3 (Figura 5). Esto indica

que la presencia de serina en el medio, tiene un efecto activador del crecimiento de *Streptococcus thermophilus*. En este sentido, se ha observado que algunos aminoácidos son esenciales para el desarrollo de este microorganismo, como lo reportaron Letort y Juillard (2003); sin embargo, a pesar de que la serina no es un aminoácido esencial para su crecimiento, se sabe que ésta participa en el proceso de transcripción y traducción de la SeC (Martil, 2014).

También se observa que, en la fermentación donde fue adicionado Na_2SeO_3 y serina (Figura 6), las bacterias tienden a permanecer poco tiempo en la fase estacionaria e iniciar el descenso de su actividad celular. Esto podría deberse a que la serina acelera el metabolismo de la bacteria provocando que esta agote los nutrientes del medio más rápidamente o la bacteria se intoxique con el selenio (Tortora *et al.*, 2007; Pophaly *et al.*, 2014).

Las curvas de crecimiento microbiano muestran el comportamiento de *Streptococcus thermophilus* por 24 h, y de acuerdo a lo reportado por Alzante *et al.* (2010), esta bacteria puede sobrevivir hasta 4 semanas en una leche fermentada con Na_2SeO_3 , por lo se podría utilizar *Streptococcus thermophilus* como microorganismo iniciador en bebidas fermentadas funcionales, adicionadas con selenio.

Más aún, con la fase logarítmica determinada para cada curva, se obtuvo el tiempo de mayor asimilación de SE inorgánico. Esto se vio reflejado en la presencia de un precipitado color rojo ladrillo, el cual indicó la formación selenuro de sodio por la reducción de selenito de sodio realizada por las BAL (Levine, 1936; Calomme *et al.*, 1995).

8.3. Análisis de selenio por ICP

Se seleccionaron muestras del final y de la mitad de la fase logarítmica de cada una de las curvas de crecimiento microbiano, con la finalidad de demostrar la cantidad de selenio absorbido por *Streptococcus thermophilus*. De esta forma se conoció la concentración remanente del SE después de la fermentación. Los análisis se realizaron por medio de ICP, tanto al medio de cultivo sin fermentar como a los medios de cultivo fermentados antes y después de retirar la biomasa. Las diferencias entre ellos expresaron la concentración teórica del selenio absorbido por la célula.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3 y los parámetros de regresión de las líneas de calibrado se presentan en el apartado de anexos en la Tabla 5.

Tabla 3. Determinación de SE absorbido por *Streptococcus thermophilus*.

Condiciones del medio de crecimiento	[SE] _α	t, h	[SE] _Ω ±DS	% de absorción de Se	µgSE/UFC
A	0	14	0	0	
	0	16	0	0	
B	63.92	17	4.19±0.40	14.27	0.58
	63.92	18	6.13±0.56	19.55	0.83
C	63.92	10	7.76±1.21	21.86	1.20
	63.92	12	10.75±0.51	28.58	1.66

Curva de crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en (A) medio mínimo; (B) medio mínimo enriquecido con Na₂SeO₃; (C) medio mínimo enriquecido con Na₂SeO₃ y serina; [SE]_α= Concentración de SE adicionado al medio mínimo en mgL⁻¹; [SE]_Ω= Concentración de Se dentro de la célula en mgL⁻¹. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Los resultados obtenidos en el análisis de SE del medio suplementado con Na₂SeO₃ en las condiciones B y C muestran que existe selenio inorgánico dentro de la células de *Streptococcus thermophilus*. Esto demuestra que *S. thermophilus* puede metabolizar selenio inorgánico intracelularmente igual que otras BAL, como lo demostró Calomme *et al.* (1995) y Adrioni *et al.* (2000). Además, los porcentajes de absorción de selenio inorgánico en los análisis obtenidos (14.27, 19.55, 21.86 y 28.58%) en algunos casos son menores, en otros son iguales y en un caso específico resultó mayor a los reportados por Adrioni *et al.* (2000) cuyos porcentajes oscilaron entre 20 y 25% en la mayoría de las BAL que estudiaron. Sin embargo, todos los resultados obtenidos son mayores a los porcentajes de absorción de selenio inorgánico por *Lactobacillus rhamnosus* (de 3 a 13%) reportados por estos mismos autores. Es importante destacar que a las 12 h de fermentación de *S. thermophilus* se presentó la mayor absorción de selenio (28.58%) y este porcentaje es más alto a todo lo reportado por Adrioni *et al.* (2000) para cada una de las BAL estudiadas.

Por otro lado, comparando nuestros resultados obtenidos con los reportados por González-Olivares *et al.* (2016) para diferentes especies de *Lactobacillus*; los porcentajes de absorción fueron menores a los obtenidos para *L. helveticus* y *L. rhamnosus* pero mayores que *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* y *L. jhonsonii* con porcentajes de absorción de 76.5, 33.76, 9.14 y 10.8% respectivamente.

El análisis de SE de la fermentación del medio suplementado con Na_2SeO_3 y serina (condiciones C, Tabla 5) en las horas 10 y 12 mostró que el porcentaje de SE absorbido por el microorganismo fue mayor que en el estudio donde sólo fue agregado Na_2SeO_3 . En este sentido, es probable que la presencia de serina promoviera la absorción del selenio de forma intracelular. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que regulan la absorción del selenio con la adición de serina en *Streptococcus thermophilus*. Se sabe que el mecanismo de inserción de selenio inorgánico por levaduras lleva consigo el gasto de energía para la transformación de un serina-fosfato-RNA, el cual es el precursor de la formación de selenocisteína (Rayman, 2004). En el caso de bacterias ácido lácticas este mecanismo no está del todo establecido, pero se ha avanzado en la explicación in silico de éste (Zhang *et al.*, 2008).

Además, se conoce que entre mayor sea la concentración de selenio inorgánico encontrado dentro de células, en el caso de bacterias ácido lácticas, mayor es la cantidad de seleno-compuestos orgánicos existentes, principalmente selenocisteína (Alzante *et al.*, 2008; Palomo *et al.*, 2014).

8.4. Determinación de selenocisteína por RP-HPLC

Para determinar el tiempo y la concentración de selenocisteína se realizó una curva de calibrado para carboximetilselenocisteína a partir de seleno-L-cistina (Turlo *et al.*, 2007). En la Figura 7 se muestra el cromatograma para el selenoaminoácido. La carboximetilselenocisteína tuvo un tiempo de retención de 11.58 min con un pico definido. Los parámetros de regresión de la curva de carboximetilselenocisteína se muestran en la Tabla 6.

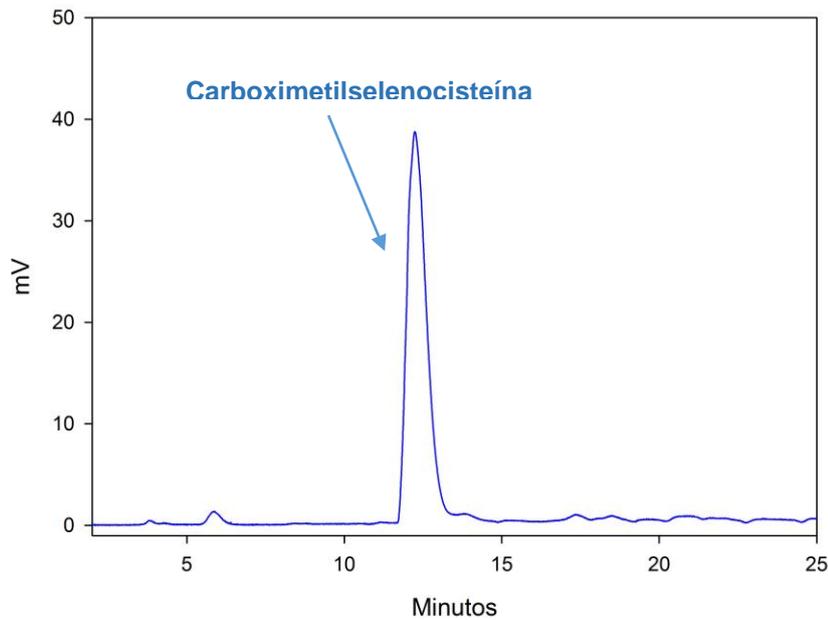


Figura 7.- Cromatograma de carboximetilselenocisteína.

A partir de la curva de carboximetilselenocisteína se determinó la concentración de SeC de cada una de las muestras celulares a diferentes tiempos de fermentación. Las muestras celulares corresponden a 10, 12, 14, 16, 17 y 18 h partiendo de las curvas de crecimiento de *S. thermophilus*, en medio mínimo enriquecido con Na_2SeO_3 y en medio mínimo enriquecido con Na_2SeO_3 y serina. Como era de esperarse, en las muestras control donde no se agregó Na_2SeO_3 no se observó la presencia de selenocisteína.

En los medios donde solo se tenía la presencia de selenito de sodio, no se observó la presencia de selenocisteína, al menos no en las concentraciones de límite de detección del equipo (Figuras 8 y 9). Sin embargo, se sabe que la sola presencia de la sal inorgánica de selenio promueve la formación de moléculas orgánicas de selenio y principalmente la de selenocisteína en bacterias ácido lácticas. Esto ha sido observado por Alzante *et al.* (2008).

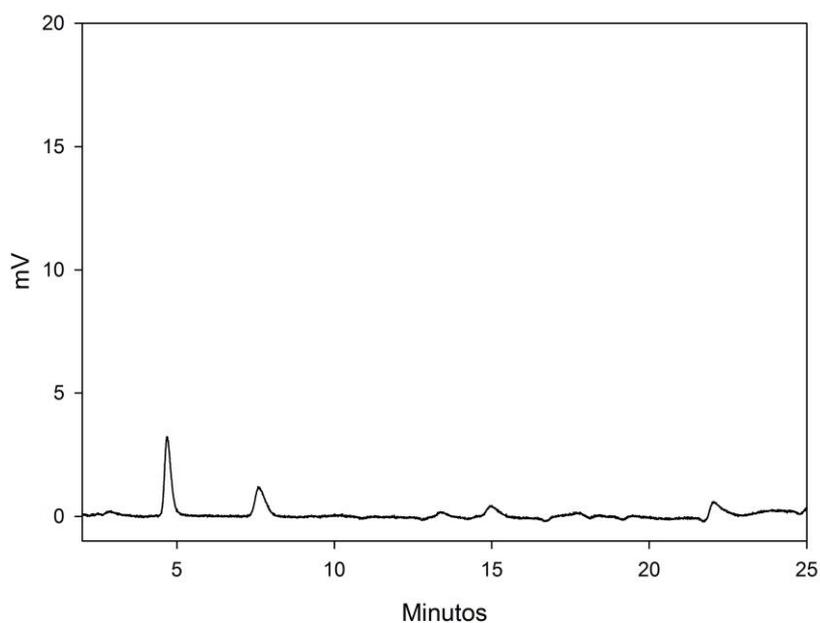


Figura 8. Cromatograma de la presencia de carboximetilselenocisteína de una muestra celular de *Streptococcus thermophilus* después de 17 h de fermentación en un medio mínimo enriquecido con Na_2SO_3 .

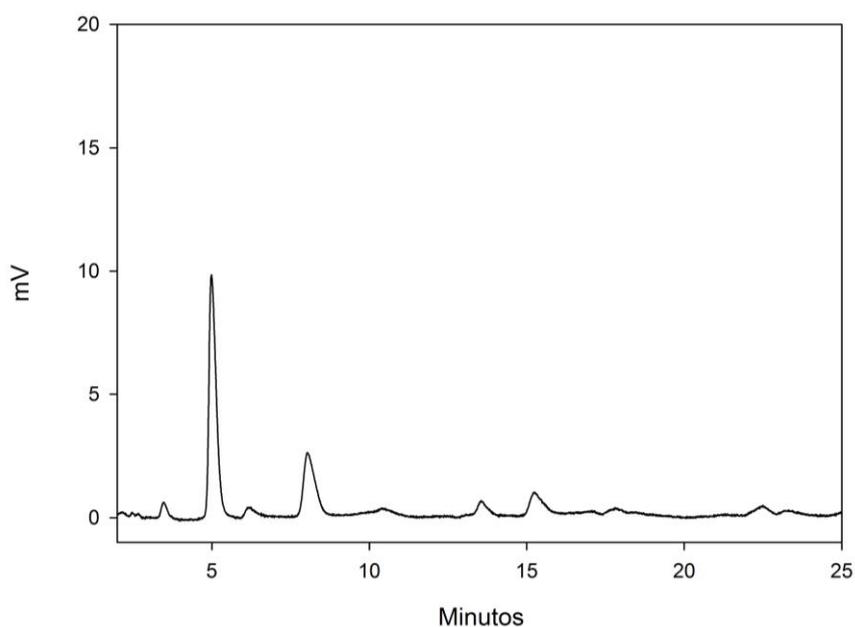


Figura 9. Cromatograma de la presencia de carboximetilselenocisteína de una muestra celular de *Streptococcus thermophilus* después de 18 h de fermentación en un medio mínimo enriquecido con Na_2SO_3 .

Los cromatogramas que se muestran en las figuras 10 y 11 se observa un pico definido con tiempos de retención de 10.5 y 12 min respectivamente que corresponden a la presencia de carboximetilselenocisteína, además de que se pudo observar que la concentración de carboximetilselenocisteína se incrementa conforme pasa el tiempo de fermentación, mostrándose un pico de mayor tamaño a las 12 h.

El tiempo de retención obtenido para carboximetilselenocisteína cambió en comparación con lo reportado por Turlo *et al.* (2007) que fue de 8.7 min, debido a que se modificó la metodología para el análisis, cambiando el pH de 7 a 7.2, el flujo de 1 a 1.2 mL/min y además de que se utilizó un detector UV en lugar de uno de fluorescencia.

Se determinó la concentración de selenocisteína en forma de carboximetilselenocisteína, debido a que la selenocisteína metilada es más estable a la degradación de Edman. Esta degradación consiste en el rompimiento de los enlaces pépticos de las proteínas o polipéptidos, liberando con esto a los aminoácidos. Es importante hacer mención que en el caso de que no se lleve a cabo la metilación, la SeC sufre una oxidación, lo que evita su cuantificación (Hammel *et al.*, 1997; Turlo *et al.*, 2007).

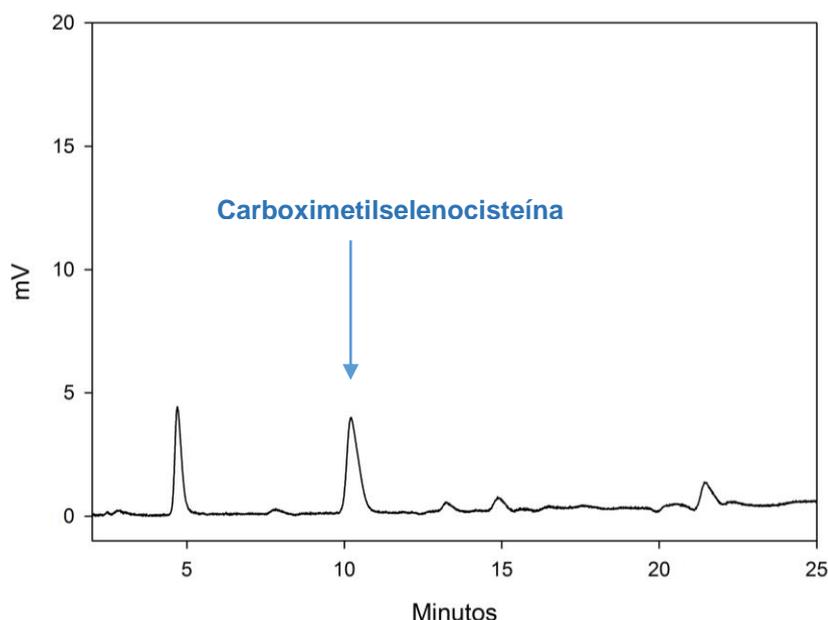


Figura 10. Cromatograma de la presencia de carboximetilselenocisteína de una muestra celular de *Streptococcus thermophilus* después de 10 h de fermentación en un medio mínimo enriquecido con Na₂SO₃ y serina.

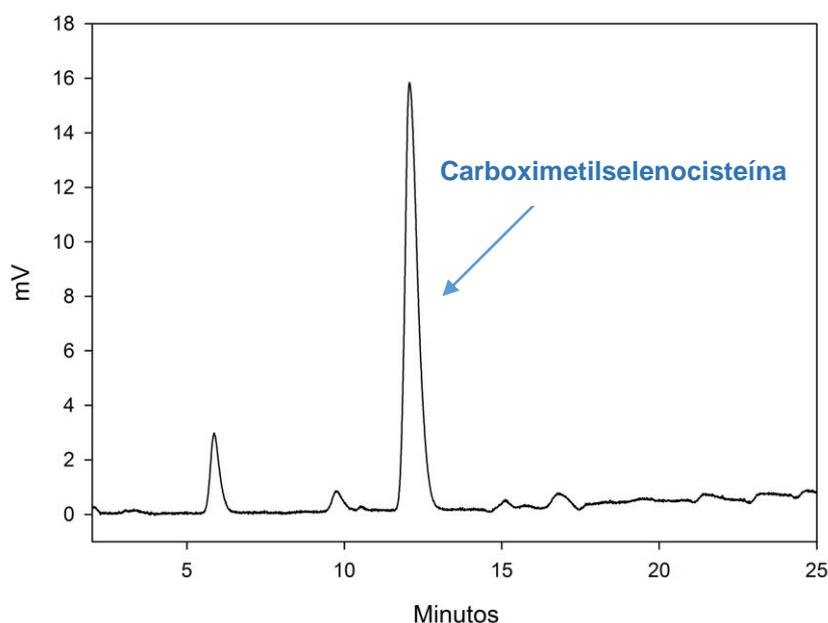


Figura 11. Cromatograma de la presencia de carboximetilselenocisteína de una muestra celular de *Streptococcus thermophilus* después de 12 h de fermentación en un medio mínimo enriquecido con Na₂SO₃ y serina.

Se determinó la presencia de SeC en las células de *S. thermophilus* en la mitad y al final de la fase logarítmica de cada una de las tres curvas de crecimiento microbiano en medio mínimo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Determinación de SeC metabolizada por *S. thermophilus*.

Condiciones del medio de crecimiento	[Se] _α	[Serina]	Horas	[SeC]±DS	µgSeC /UFC	% de SeC por [SE] intracelular
A	0	0	14	0	0	0
	0	0	16	0	0	0
B	63.92	0	17	0	0	0
	63.92	0	18	0	0	0
C	63.92	340	10	1.29±0.01	0.2	16.62
	63.92	340	12	8.36±0.17	1.29	77.76

Curva de crecimiento de *S. thermophilus* en (A) medio mínimo; (B) medio mínimo enriquecido con Na₂SeO₃; (C) medio mínimo enriquecido con Na₂SeO₃ y serina; [SE]_α= Concentración de selenio adicionado al medio mínimo en mgL⁻¹; [Serina]=Concentración de serina adicionada al medio mínimo en mgL⁻¹; [SeC]= Concentración de selenocisteína determinada por RP-HPLC en mgL⁻¹ de volumen de medio mínimo. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Los resultados que se obtuvieron para los tiempos 14 y 16 h de las condiciones del medio de crecimiento A, indican la ausencia de SeC. Esto se debe a que en este medio no se le adicionó Na_2SeO_3 , por lo que no tendría que haber una señal correspondiente para SeC. También se observa que no existe presencia de selenocisteína en las muestras a 17 y 18 h de las condiciones B. Tales resultados, reflejan que existe una concentración de selenocisteína que está por debajo de los límites de detección para la RP-HPLC para estos tiempos, por lo que se tendría que utilizar el detector adecuado para llevar a cabo un análisis más amplio. No se puede descartar la presencia de selenocisteína en las muestras donde sólo se le fue agregado Na_2SeO_3 debido a que BAL son capaces de integrar el selenio inorgánico sólo como SeC (Alzate *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en los tiempos de 10 y 12 h de crecimiento de *S. thermophilus* en las condiciones C, reflejan que la BAL tiene la capacidad de producir SeC a partir de un medio enriquecido con Na_2SeO_3 . Esta capacidad de biotransformar selenio inorgánico a SeC concuerda con lo mencionado por Pophaly *et al.*, (2014), quienes reportan que múltiples BAL pueden sintetizar SeC.

Las concentraciones de selenocisteína determinadas por la derivatización con OPA (1.29 y 8.36 mgL^{-1} respectivamente) muestran que existe una mayor producción del seleno-aminoácido en los medios donde se le agregó serina. Esto se puede deber a que la serina es el aminoácido iniciador junto con el selenito de sodio en la biotransformación de SE inorgánico a SE orgánico, debido a que el inicio del seleno-metabolismo en las bacterias y levaduras empieza a partir de un residuo de serina (Martil, 2014; Pophaly *et al.*, 2014).

Igual que en el análisis por ICP se observó que el contenido de SeC metabolizada por *S. thermophilus* fue variando de acuerdo al tiempo de crecimiento de la bacteria y a la adición de serina en el medio. Es decir, se encontró que a las 10 y 12 h de crecimiento de la bacteria y en el medio donde fue adicionado serina, existe una concentración de SeC más alta que en los otros tiempos y esto puede deberse a la adición de serina (Martil, 2014).

IX. CONCLUSIONES

El *Streptococcus thermophilus* utilizado en este estudio fue capaz de crecer en medios suplementados con selenito de sodio, que al comparar con otros estudios, reflejó que tiene una tolerancia mayor en algunos casos, que otras bacterias ácido lácticas.

La presencia de serina en medios de cultivo mínimo para el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*, provoca una mejor inserción de selenio inorgánico a la célula para su bioconversión.

La concentración de selenocisteína dentro de las células de *Streptococcus thermophilus* aumenta cuando en el medio se encuentra presente serina junto con el selenio inorgánico.

X. PERSPECTIVAS

Modificar las condiciones experimentales que permitan conocer la concentración de selenocisteína en muestras donde sólo se le adiciona selenito de sodio al medio.

Emplear el *Streptococcus thermophilus* como bacteria iniciadora en una bebida fermentada enriquecida con selenito de sodio y serina.

Evaluar el efecto de la concentración de serina en la absorción de selenio inorgánico en *Streptococcus thermophilus* y en otras BAL.

Determinar la concentración de selenocisteína a partir de la metodología aquí planteada en diferentes BAL que tienen características probióticas.

Determinar la capacidad antioxidante de muestras celulares de diferentes tipos de BAL que contienen selenocisteína.

XI. REFERENCIAS

- Aguilar, M. I. (2006). *HPLC Peptides and Proteins Methods of Protocols*. Humana Press. 9-21.
- 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. *Mensaje bioquímico*. 34, 121-133.
- Alzate, A., Fernández-Fernández, A., Pérez -Conde, M.C., Gutiérrez, A.M. & Cámara, C. (2008). Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 56, 8728-8736.
- Alzate, A., Fernández-Fernández, A., Pérez -Conde, M.C., Gutiérrez, A.M. & Cámara, C. (2010). Selenium-enriched fermented milk: A suitable dairy product to improve selenium intake in humans. *International Dairy Journal*. 20, 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.
- Arnér, E. S. J. (2010). Selenoproteins-whats unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Experiment cell research* 316, 1296-1303.
- Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D. & Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology*. 22, 498-508.
- Brückner, H., Langer, M., Lfipke, M., Westhauser, T. & Godel, H. (1995). Liquid chromatographic determination of amino acid enantiomers by derivatization with o-phthaldialdehyde and chiral thiols applications with reference to food science. *Journal of Chromatography A*. 69, 7229-245.
- Calomme, M. R., Van den Branden, K. & Vanden Berghe, D. A. (1995). Selenium and *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*. 79, 331-340.
- Castillo-Portela, G; Villar-Delgado, J; Montano-Martínez, R., Martínez, C; Pérez-Alfocea, F., Albacete, A; Sánchez-Bravo, J. & Acosta-Echeverría, M

Cuantificación por HPLC del contenido de aminoácidos presentes en el FITOMAS-E ICDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 45 (1), 64-67.

- Crankshaw, M.W. & Grant, G.A. (1996). *Modification of Cysteine: Chemical Modification of Proteins.* Current Protocols in Protein Science. 51,115-118.
- da Silva, M.T.A., Caldas, V.E.A., Costa, F.C., Silvestre, O.H. & Thiemanna, D.A.M.M. (2013). Selenocysteine biosynthesis and insertion machinery in *Naegleriagruberi*. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 188, 87-90.
- Flores-Aguilar, J. F. (2014). *Bioconversión de Selenio inorgánico por bacterias ácido lácticas en un medio enriquecido.* Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo: México
- González-Olivares, L.G., Contreras-López, E., Flores-Aguilar, J.F., Rodríguez-Serrano, G.M., Castañeda-Ovando, A., Jaimez-Ordaz, J., Añorve-Morga, J. & Cruz-Guerrero, A.E. (2016). Consumo de selenio inorgánico por *Lactobacillus ssp.* *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 15 (1).
- Hammel, C., Kyriakopoulos, A., Rosick, U. & Behne, D. (1997), Identification of Selenocysteine and Selenomethionine in Protein Hydrolysates by High-performance Liquid Chromatography of Their o-Phthaldialdehyde Derivatives *The Analyst.* 122, 1359-1363.
- Hutkins, R. & Goh, Y.J. (2014). *Streptococcus thermophilus.* *Encyclopedia of Food Microbiol.* 555-559.
- Khanam, A. & Platel, H. (2016). Bioaccessibility of selenium, selenomethionine and selenocysteine from foods and influence of heat processing on the same. *Food Chemistry.* 194, 1293-1299.
- Kieliszek, M. & Błażejczak, S. (2013). Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition.* 29, 713-718.
- Lamberti, C., Mangiapane, E., Pessione, A., Mazzoli, R., Giunta, C. & Pessione, E. (2011). Proteomic characterization of a selenium-metabolizing probiotic *Lactobacillus rauteri* Lb2 BM for nutraceutical applications. *Proteomic.* 11, 2212-2221.
- Letort, C & Juillard, V. (2001). Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal Applied Microbiology.* 91, 1023-1029.

- Levine, V.C. (1936) Precipitation and color reaction for ascorbic acid specificity of acidified sodium selenite solution. *Experimental Biology Medicine*. 35, 231-235.
- Leyva, R. L. (2015). Propuesta de una técnica para la separación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución y derivatización precolumna con o-ftaldido (OPA). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo: México.
- Li, D., Li, J., Zhao, F., Wang, G., Qin, Q. & Hao, Y. (2016). The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium. *Food Chemistry*. 197, 367-372.
- Lyer, R., Tomar, S.K., Maheswari, T.U. & Singh, R. (2010). *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 20, 133-141.
- Martil, D. A. (2014) *Estudos estruturais da Seril-tRNA Sintetase native e em interação com tRNAs cognatos de Trypanosoma brucei*. Universidad de São Paulo: Basil.
- Metanis, N. & Hilvert, D. (2014). Natural and synthetic selenoproteins. *Current Opinion in Chemical Biology*. 22, 27-34.
- Mistry, H. D., Broughton, F., Redman, C. W. G. & Poston, L. (2012). Selenium in reproductive health. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*.
- Navarro-Alarcon, M & Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment*. 400, 115 -141.
- Palomo, M., Gutiérrez A. M., Pérez-Conde M. C., Cámara C. & Madrid Y. (2014). Se metallomics during lactic fermentation of Se enriched yogurt. *Food Chemistry*. 164, 371-379.
- Peña, R & Circo, S. (2007). Solución automática del método de Talmage y Fitch. *Tecnología Química*. 1, 10-15.
- Pieniz, S., Pieniza,b, Okekea, B.C., Andreazzaa, R. & Brandelli, A. (2011). Evaluation of selenite bioremoval from liquid culture by *Enterococcus species*. *Microbiological Research*. 166, 176-185.
- Pophaly, S. D., Poonam. Singh, P., Kumar, H., Kumar, S. & Singh, R. (2014). Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: A functional food perspective. *Trends Food Science Technology*. 39, 139-145.

- Rayman, M.P. (2004). The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *British Journal of Nutrition*. 92, 557–573.
- Rayman, M.P. (2012). Selenium and human health. *The lancet*. 379, 1256-1268.
- Reeves, M. A. & Hoffmann, P. R. (2009). The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cellular Molecular Life Sciences*. 66 (15) 1-33.
- 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.
- Roberfroid, M. B. (2007). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1660-1664.
- Rother, M. (2012). Selenium metabolism in prokaryotes. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. *Springer*. 457-470.
- Shively, J. E. (1986). Methods of protein microcharacterization. A practical handbook. The Humana Press Inc: USA.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. & Crouch, S. R. (2008). Principios de análisis instrumental. Ed. McGraw Hill: México.
- Sreevani, S., Chandra, S. K. & Pramoda, k. J. (2013). A brief review on probiotic bacteria. *Journal of Current Research in Science*. 3102 (1), 286-293.
- Tamang, J. P., Shin, D., Jung, S., & Chae, S. (2016). Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Frontiers in Microbiology*. 578 (17).
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., (2007). Introducción a la microbiología. 9 na Edición. Pearson Education: España.
- Turło, J. Gutkowska, B. & Malinowska, E. (2007). Relationship between the selenium, selenomethionine, and selenocysteine content of submerged cultivated mycelium of *lentinula edodes* (Berk.). *Acta chromatographica*, No.18
- Vásquez-Ortiz, F., Caire, G., Higuera-Ciaparra, I. & Hernández, G. (1995). High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp. *Journal of liquid chromatography & Related Technologies* 18, 2059-2068.

- Xia, S. K., Chen, L. & Liang, J. Q. (2007). Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 2413-2417.
- Zajšek, K., Kolar, M. & Goršek, A. (2011). Characterisation of the exopolysaccharidekefir produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 64(4), 544-548.
- Zhang, Y Turanov, A.A., Hatfield, D.L & Gladyshev, V.N. (2008). *In silico* identification of genes involved in selenium metabolism: evidence for a third selenium utilization trait. *BMC Genomics*. 1-13.
- Zhuo, P. & Diamond, A. M. (2009) Molecular mechanisms by which selenoproteins affect cancer risk and progression. *Biochimicaet Biophysica*, 1546-1554.

XII. ANEXO

Tabla 5.- Parámetros de regresión de la curva de calibración, intensidad vs concentración de Selenio (mgL^{-1}).

Parámetro	Valor
Desviación estándar residual, SE	20.20
Numero de estándares, n	9
Coefficiente de correlación, r^2	0.9967
Ordenada al origen, $a \pm t s_a$	13.415
Pendiente, $b \pm t s_b$	326.77 ± 13.41
Intervalo lineal (mgL^{-1})	0-3
Límite de detección (mgL^{-1})	0.27

Tabla 6.- Parámetros de regresión de la curva de calibración, intensidad vs concentración de carboximetilselenocisteína (mgL^{-1}).

Parámetro	Valor
Desviación estándar residual, s_e	47496.2531
Numero de estándares, n	4
Coefficiente de correlación, r^2	0.9963
Ordenada al origen, $a \pm t s_a$	36449.879
Pendiente, $b \pm t s_b$	4759318.78 ± 36449.87
Intervalo lineal (mgL^{-1})	0.31-0.62
Límite de detección (mgL^{-1})	0.028



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00180

Matrícula: 2161800908

EFFECTO DE LA PRESENCIA DE SERINA EN MEDIO MÍNIMO, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE SELENOCISTEÍNA POR *Streptococcus thermophilus*

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 20 del mes de junio del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES
DRA. ARACELI CASTAÑEDA OVANDO

siendo los dos primeros asesores del alumno y lectora la tercera, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: JESUS ALBERTO SEGOVIA CRUZ

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JESUS ALBERTO SEGOVIA CRUZ
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

ASESORA

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

ASESOR

DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

LECTORA

DRA. ARACELI CASTAÑEDA OVANDO