

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

García Mora C.<sup>a,\*</sup>, González Olivares L. G.<sup>a</sup>, Castañeda Ovando A., Contreras López, E., Ayala Niño, A.

a Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México

[coralgm19@gmail.com](mailto:coralgm19@gmail.com)

### RESUMEN:

La importancia del selenio (Se) en el metabolismo humano, es atribuida a que en su forma orgánica como selenocisteína, forma parte de enzimas que entre sus funciones tienen que prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno causantes de daños celulares que pueden provocar enfermedades como el cáncer. Se ha demostrado que diversas especies de bacterias ácido lácticas pueden metabolizar algunas especies de Se y transformarlas en selenocisteína. Es por ello que, aprovechando esta capacidad de las bacterias se pueden desarrollar productos que representen una fuente de Se biodisponible de fácil acceso. En el presente trabajo se enriqueció *L. casei* Shirota con  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  usando como medio de cultivo proteínas de suero de leche WPC-80, el cultivo enriquecido fue inoculado en WPC-80 y sometido a fermentación. El hidrolizado fue liofilizado con el objetivo de evaluar el grado de proteólisis y la actividad antioxidante desarrollada después de la fermentación. Los resultados obtenidos demuestran que la bacteria capta del medio el 29.6% del Se. Se determinó que la capacidad proteolítica del microorganismo no disminuye significativamente cuando se enriquece el microorganismo. Además no se encontró diferencia significativa en la actividad antioxidante entre el producto fermentado con lactobacilo enriquecido y el fermentado con microorganismo control.

### ABSTRACT:

Selenium (Se) importance in human metabolism is attributed to its organic form as selenocysteine which is part of enzymes. Among its functions, it prevents the formation of reactive oxygen species that are responsible of causing cellular damage that can cause diseases like cancer. It has been shown that several species of lactic acid bacteria are able to metabolize some Se species and transform them into selenocysteine. That is why taking advantage of this capacity products with bioavailable Se can be developed. In the present project, *L. casei* Shirota was enriched with  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  using WPC-80 whey protein as culture medium, the enriched culture was inoculated in WPC-80 and fermented. The hydrolyzate was lyophilized with the objective to evaluate the proteolytic degree and the antioxidant activity developed after fermentation. The results showed that bacteria capture 29.6% of Se from the environment. It was determined that the proteolytic capacity of the microorganisms did not diminish when the microorganism was enriched. In addition, no significant differences were found in the antioxidant activity between the fermented product with lactobacillus enriched and the fermented with control of microorganisms.

### Palabras clave:

Selenio, seroproteínas, probiótico, antioxidante, hidrólisis, péptidos.

### Key Words:

Selenium, seroproteins, probiotic, antioxidant, hydrolysis, peptides.

**Área:** Microbiología y biotecnología

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad el desarrollo e investigación de los complementos y alimentos funcionales se enfocan principalmente a los probióticos, prebióticos, fibra dietética, vitaminas, minerales, flavonoides, terpenos, carotenoides, péptidos, entre otros (Zamora, 2011). Las proteínas del suero lácteo (seroproteínas) representan aproximadamente el 20% de las proteínas totales de la leche, son proteínas globulares hidrosolubles capaces de ligar algunos cationes, entre ellas se incluyen la  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina, albumina sérica e inmunoglobulinas (Walstra *et al* 1987). Estas proteínas se consideran de alto valor biológico porque en su composición se encuentran aminoácidos azufrados (cisteína y metionina), aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina, valina), lisina y triptófano (CANILEC, 2011). Debido a la composición química de las proteínas del suero de leche, este ha sido utilizado como materia prima en industria de alimentos y además ha servido en diferentes investigaciones para la elaboración de complementos alimenticios y alimentos funcionales sobre todo cuando es sometido a una hidrólisis de proteínas (Damodaran, 2010 & Sgarbieri, 2017).

Las propiedades funcionales atribuidas a las proteínas del suero de leche y sus hidrolizados van desde el incremento en los niveles de glutatión peroxidasa y la prevención de diferentes tipos de cáncer (mama, colon, próstata) (Bounous G, 2000), regulación del sistema inmunológico (Bounous, *et al*, 1989), aumento de los niveles de serotonina en personas vulnerables al estrés (Markus, *et al*, 2002), actividad opioide (Pihlanto-Leppälä, 2001) y antioxidante en algunas fracciones peptídicas (Hernández-Ledesma, *et al*, 2005). Adicionalmente, se sabe que el suero de leche es un medio donde las bacterias ácido lácticas (BAL), entre ellas las probióticas, se desarrollan sin ninguna complicación (Vázquez *et al*, 2009).

Entre los beneficios conocidos de las bacterias probióticas se encuentra que, estimulan el sistema inmunológico, producen vitaminas B2, B6 y B8, favorecen la asimilación de oligoelementos, previenen el cáncer de colon y la proliferación de células tumorales (Parvez *et al*, 2006). Los alimentos funcionales que han sido suplementados con microorganismos probióticos son principalmente las leches fermentadas y productos lácteos, como los quesos o el lactosuero, ya que estos sirven como una excelente matriz de contención del probiótico (Pereira *et al*, 2015).

La capacidad de proteólisis que tienen algunas enzimas y bacterias ácido lácticas donde, se da como resultado producción de péptidos de bajo peso molecular ha permitido que en los últimos años haya incrementado el uso de los péptidos bioactivos como ingredientes funcionales (Nagpal, *et al*, 2011).

Los péptidos bioactivos, son secuencias de aminoácidos que ejercen actividades biológicas cuando son liberados por hidrólisis química o enzimática durante la digestión gastrointestinal o la elaboración de algunos alimentos (Mulero, *et al*, 2011). Estos pueden tener un efecto importante en la regulación y modulación metabólica. Entre las actividades biológicas de algunos péptidos que han sido confirmadas, se encuentra que tienen actividad antihipertensiva, hipocolesterolemiantes, antioxidante, antimicrobiana, inmunomoduladora y antitrombótica (Mulero, *et al*, 2011).

El tipo de péptido obtenido y su actividad biológica depende de la fuente de proteína y condiciones de hidrólisis (Muro *et al*, 2011). Entre las fuentes de proteína animal más importantes se encuentran las de la leche, ovoalbúmina de huevo, carne, músculos de pescados y jalea real (Mulero, *et al*, 2011). Se ha demostrado que los péptidos liberados después la hidrólisis de las proteínas de leche y sus derivados, así como del suero lácteo poseen diversas actividades biológicas, como actividad antimicrobiana, opoide, inmunomoduladora y antioxidante (Muro *et al*, 2011). Virtanen *et al* (2007) demostraron que la fermentación de suero lácteo con bacterias como *Leuconostoc mesenteroides* ssp, *Lactobacillus jensenii* (ATCC25258) y *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) tiende a producir péptidos de bajo peso molecular (4-20 kDa) y a la vez a aumentar la actividad antioxidante de los hidrolizados al final de la fermentación. Adicionalmente, la capacidad antioxidante de un alimento funcional está dada no solamente por los componentes intrínsecos del alimento, si no por aquellas sustancias que pueden adicionarse de manera externa. Dentro de las sustancias más estudiadas, se encuentran oligoelementos como los iones metálicos, tal es caso de la incorporación de Se en productos lácteos (González-Olivares *et al*, 2014).

El Selenio (Se) es un micronutriente esencial en el metabolismo humano (Rayman, 2012). Químicamente se puede encontrar entre otras formas, como selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) y selenio elemental ( $\text{Se}^0$ ). Estas dos especies pueden ser

introducidas al metabolismo de diversos géneros bacterianos y ser transformadas en especies orgánicas de Se como selenocisteína, esta es un aminoácido análogo de la cisteína que a nivel estructural se diferencian únicamente en entre él Se y el S del grupo R (Galano, *et al*, 2013).

En el cuerpo humano existen enzimas como la iodotironin-deiodinasas, tiorredoxin-reductasas y glutatión-peroxidadas (Gpx) que contienen selenoproteínas en su estructura o sitio activo, estas enzimas cumplen con la función de prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno causantes de diversos daños en las células, por lo cual un funcionamiento adecuado de estas enzimas en el organismo puede prevenir enfermedades como el cáncer (Steinbrenner, *et al*, 2013). Las selenoproteínas se caracterizan por proteger a las neuronas del daño oxidativo causado por el cobre y el hierro ya que tienen la capacidad de unir a ellas el metal, de igual manera, se ha asociado un bajo nivel de Se en el plasma sanguíneo y bajos niveles de Gpx con el retraso del desarrollo del sistema cognitivo y neurológico en niños (Steinbrenner *et al*, 2013).

A pesar de que la ingesta diaria recomendada de Se es muy baja, regularmente no es cubierta debido a que el Se presente en los alimentos no siempre se encuentra biodisponible. Es por ello que en los últimos años se han desarrollado diferentes alimentos enriquecidos con Se, ejemplo de estos son el té, sal de mesa, diversos tipos de yogurt, fórmulas lácteas, setas, cebollines, ajo, tunas, pan, trigo, entre otros (Pophaly *et al*, 2014). De esta misma forma se han hecho estudios de incorporación de especies orgánicas de Se en algunos alimentos, siendo los alimentos lácteos los de mayor estudio debido a que las BAL probióticas como está *L. helveticus* y *L. rhamnosus* aparte de mantener sus niveles de sobrevivencia en matrices lácteas, tienen la capacidad incorporar a su metabolismo al Se presente en el medio y convertirlo en Se elemental o Se orgánico (González-Olivares *et al*, 2014 & Pophaly *et al*, 2014).

El objetivo del presente trabajo es determinar la capacidad antioxidante de un concentrado de proteínas de suero lácteo hidrolizado por *Lactobacillus casei* Shirota enriquecido con selenio, a través de pruebas de laboratorio para determinar su posible uso como complemento alimenticio.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Aislamiento de cultivo iniciador**

La cepa pura de *Lactobacillus casei* Shirota se obtuvo a partir de la bebida láctea fermentada Yakult®. Para adaptar la cepa al medio, esta fue inoculada en un concentrado de proteínas de suero lácteo (WPC-80) reconstituido al 1% p/v y lactosa 1% p/v, previamente pasteurizado (70°C/3 min). El cultivo se incubó a 37°C por 24 h.

### **Enriquecimiento *Lactobacillus casei* Shirota con selenito de sodio**

La bacteria *Lactobacillus casei* Shirota fue enriquecida en un medio de WPC-80 con selenito de sodio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) a una concentración de 196 ppm, correspondiente al punto crítico de inhibición de esta bacteria al Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, según Martínez (2016). El cultivo fue incubado a 37°C durante 15 h. tiempo al se presenta la fase de desaceleración para *L. casei* Shirota en un medio MRS suplementado con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> a la misma concentración de Se (Martínez, 2016). Para la obtención de un control se inoculó la misma concentración de bacterias bajo las mismas condiciones a un tubo sin adición de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.

### **Fermentación de concentrado proteico lácteo**

Después de la adaptación de las bacterias al selenio, ambos cultivos se inocularon por separado en un matraz con 90 mL de WPC-80 bajo las condiciones antes mencionadas y se incubó a 37°C durante 24 h.

### **Liofilización**

Posterior a la fermentación, los hidrolizados proteicos fueron liofilizados en una liofilizadora LABCONCO FreeZone6.

### **Estudio de viabilidad de la bacteria**

Se realizó el conteo de bacterias viables antes y después de la fermentación, así como al final de la liofilización. Para llevar a cabo el conteo de microorganismos los sueros liofilizados fueron reconstituidos al 10% en agua estéril.

El conteo de bacterias viables se realizó por la técnica de goteo en placa con agar MRS Difco®. Las placas se incubaron a 37 °C, en condiciones anaeróbicas durante 24 h.

### **Análisis de absorción de selenio**

Se realizó una digestión de la materia orgánica presente en las muestras mediante un sistema de reacción acelerada por microondas utilizando un microondas CEM® (modelo MARS S). Para determinar la cantidad de Se que introdujeron las células a su metabolismo se hizo un análisis de espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) en un equipo Perkin Elmer®, (modelo Optima 8300) para ello se elaboró una curva de calibración de Se de 0 a 3 mg/L. Las condiciones y las mediciones se realizaron según Segovia (2017).

### **Determinación de grupos amino libres por el método de ácido trinitrobencensulfónico (TNBS)**

El método se realizó siguiendo la metodología de González-Olivares *et al* (2014). Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro Thermo scientific (modelo Genesys 10vis) a 340 nm. La curva de calibración se realizó con soluciones de glicina de 50-300 ppm. Las muestras fueron reconstituidas al 10% antes de ser analizadas.

### **Separación de péptidos por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida**

Basados en la metodología de González-Olivares *et al* (2011) con algunas modificaciones, la electroforesis se realizó preparando un gel de separación al 15% de T, y un gel de concentración al 4% de T. Para la preparación de las muestras, cada hidrolizado proteico liofilizado y una muestra de WPC-80 sin ningún tratamiento previo fueron reconstituidos al 0.5% p/v. Se utilizó un estándar de polipéptidos SDS-PAGE Broad-range (Bio-RAD®) para calcular los pesos moleculares. El gel se analizó con el software de análisis de imagen “Image Lab” (Gel-Doc Bio-RAD®).

### **Actividad antioxidante por FRAP**

Para llevar a cabo el análisis se utilizó la metodología descrita por Benzie *et al* (1996) con algunas modificaciones. La curva de calibración se preparó con soluciones de FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O en HCl 40 mM a concentraciones de 0.01 a 0.05 mM. La reacción fue cuantificada a 593 nm usando como blanco solo el reactivo de FRAP. La actividad antioxidante de las muestras se determinó remplazando la solución de Fe<sup>2+</sup> por 250 µL de cada muestra reconstituida al 10%.

### **Actividad antioxidante por DPPH**

Para esta llevar a cabo este ensayo se siguió el método propuesto por Brand-Williams (1995) con algunas modificaciones. Se preparó una curva de calibración de Trolox con concentraciones de 0 a 33 µM. La reacción fue cuantificada a 515 nm usando como blanco solo metanol. La actividad antioxidante de las muestras diluidas se determinó remplazando la solución de trolox con 100 µL de la muestra diluida.

### **Determinación de actividad antioxidante por ABTS**

Para el ensayo de ABTS se siguió el método establecido por Re *et al* (1999) con algunas modificaciones. El ensayo de ABTS implica en un primer término la producción del radical libre ABTS de color verde-azul el cual se caracteriza por tener un máximo de absorción de 0.7 (± 0.02) a 734 nm. Se realizó una curva de calibración con trolox a concentraciones de 0-30 µM. La cuantificación de la actividad antioxidante de las muestras se llevó a cabo bajo el mismo procedimiento remplazando el estándar por 60 µL de muestra diluida.

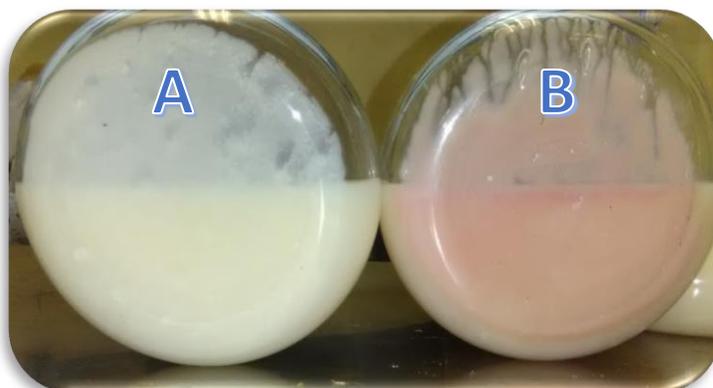
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Enriquecimiento *Lactobacillus casei* Shirota con selenito de sodio**

El color rosa- rojizo de los cultivos lácticos en presencia de Se es indicativo de la reducción del selenito de sodio a selenio elemental y/o especies orgánicas de selenio, mismas formas químicas de selenio que presentan mayor grado de biodisponibilidad para el organismo humano (Xia, *et al*, 2007). Se encontró que al final de la fermentación los matraces presentaron diferencias notables en el color del cultivo lo cual se puede observar en la figura 1. El matraz con el cultivo control (A) conservó su color blanco, mientras que el matraz con el cultivo enriquecido con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (B), se tornó de un color rosa-rojizo. En estudios similares esta misma característica de color se presentó cuando, se hicieron crecer 25 diferentes especies de lactobacillus bajo 4 concentraciones distintas de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> demostrando

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

**Figura 1.** Coloración de cultivos después de la fermentación (A: cultivo control (sin Se) B: cultivo enriquecido con Se)

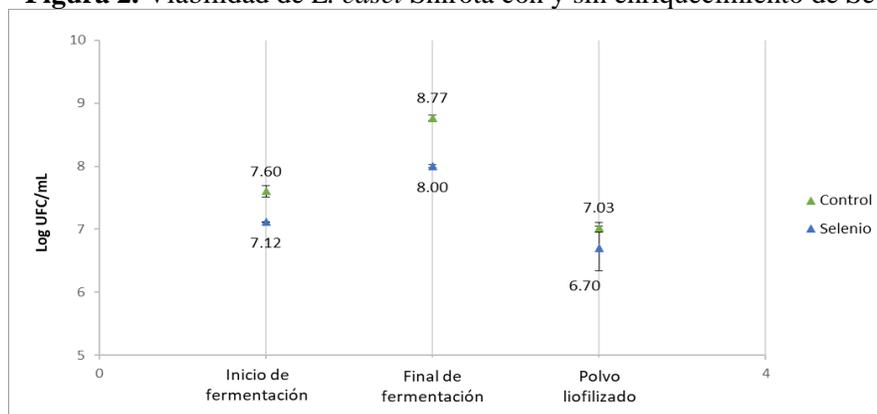


### Viabilidad de *L. casei* Shirota

Diversos estudios han demostrado que la viabilidad de las BAL disminuye de manera significativa cuando se exponen a la presencia de Se, aún cuando tienen la capacidad de transformarlo a su forma orgánica. Es por ello la importancia de saber la concentración del punto crítico de inhibición, para conocer el grado de tolerancia de cada bacteria al metal estudiado.

En la figura 2 se observa que la presencia de Se en el medio de crecimiento disminuye de manera significativa ( $P=0.05$ ) la viabilidad de la bacteria antes y después de la fermentación. Lo mismo sucede en las muestras de hidrolizados proteicos que fueron liofilizadas, donde además se encontró, que la mayoría de las bacterias conservan su viabilidad después del proceso de liofilización. Esto es una ventaja considerando que *L. casei* Shirota es un probiótico. Sin embargo, la disminución de la viabilidad de la bacteria se atribuye principalmente a la presencia de Se en el medio, la cual provoca cierto grado de estrés celular a lo que las bacterias responden detoxificando el medio mientras se adaptan a él. (Andreoni *et al*, 2000).

**Figura 2.** Viabilidad de *L. casei* Shirota con y sin enriquecimiento de Se



Estos resultados son coincidentes con aquellos de Pusztahelyi *et al* (2015). Ellos observaron que la viabilidad de *L. casei* disminuye cuando el medio de desarrollo es enriquecido con 100 y 200 ppm de  $\text{NaHSeO}_3$ . Pero un dato importante es que se comprobó que, del Se absorbido el 80% es promovido a la conversión de selenio orgánico. Por lo tanto, someter a las bacterias a condiciones de fermentación diferentes a las de su desarrollo común, repercute directamente en su metabolismo. Esta repercusión se da en el aumento del tiempo en la fase de adaptación, disminuyendo la capacidad de replicación del microorganismo y su capacidad proteolítica inmediata. Sin embargo,

esto no precisamente repercute en su capacidad de absorción y transformación de Se (González *et al.*, 2016 & Segovia, 2017).

### **Análisis de absorción de selenio**

A partir del análisis de ICP-MS con una curva de calibración de Se (0-3mg/L), se comprobó que cuando la concentración de Se en el medio corresponde a la del punto crítico de inhibición, el porcentaje de absorción por *L. casei* Shirota es de 29.62% al final de la fermentación. La capacidad de *L. casei* S. de absorber al Se presente en el medio es muy semejante a la reportada por Saini *et al.* (2014) para *Lactobacillus reuteri* NCDC77 la cual corresponde al 28.8%. El porcentaje de absorción de selenio por *L. casei* Shirota en medios de fermentación con proteínas de suero de leche, representa una importante ventaja frente a otros microorganismos, como *L. bugarius* y *L. jonsonii*, los cuales absorben el 9.14 y 10.8 % de Se respectivamente según González-Olivares *et al.* (2016).

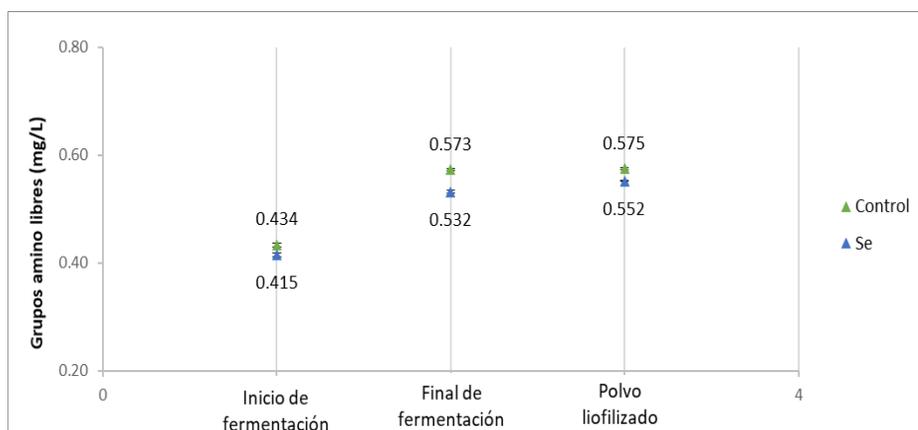
Se sabe que una considerable parte del Se que es introducido en las bacterias es transformado como selenocisteína (Pusztahelyi *et al.*, 2015). De igual manera la incorporación de Se a la célula regularmente se relaciona con un aumento en la producción de enzimas como glutatión peroxidasa, lo cual se demostró cuando una cepa de *L. casei* 431 enriquecida con NaHSeO<sub>3</sub> aumento la concentración de glutatión y glutatión reductasa en 9.1% y 33% respectivamente después de la fermentación en medio MRS (Pusztahelyi *et al.*, 2015). En el mismo sentido, se ha reportado que el 80% del Se acumulado por *L. casei spp casei* está asociado a moléculas de selenocisteína (Calomme *et al.*, 1995).

### **Estudio del perfil proteolítico**

#### **Determinación de grupos amino libres por el método de ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)**

A partir de los resultados obtenidos, se mostró que el estrés provocado por la presencia de Se en el medio, afecta la actividad metabólica de la bacteria. En la figura 3 se observa que, igual que la viabilidad de la bacteria, la producción de grupos amino libres es menor en el medio hidrolizado con la bacteria enriquecida con Se antes y después de la fermentación, así como al final de la liofilización. Sin embargo, la diferencia entre la hidrólisis producida por ambas bacterias no es significativa (P=0.05). En ambos casos se puede observar que la concentración de grupos amino libres aumenta al finalizar la fermentación y permanece prácticamente igual al final de la liofilización, sin embargo, este aumento tampoco representa una diferencia significativa (P=0.05).

La producción de grupos amino libres está directamente relacionada con el grado de hidrólisis proteica en el medio, la cual está relacionada con el metabolismo bacteriano. Esto da como resultado, la liberación de péptidos de bajo peso molecular e incluso de aminoácidos. Además, es sabido que la hidrólisis proteica depende del requerimiento nutricional específicamente de péptidos y de la especificidad del sistema proteolítico de cada bacteria (Kunji *et al.*, 1996 & Savijoki *et al.*, 2006).

**Figura 3.** Concentración de grupos amino libres producidos por *L. casei* Shirota con y sin enriquecimiento de Se.

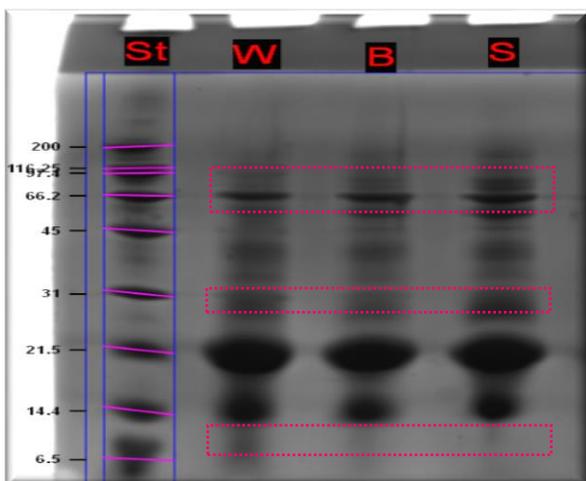
Con los resultados obtenidos se deduce que *L. casei* Shirota no posee gran capacidad para hidrolizar las proteínas del suero de leche o bien su desarrollo en este medio no es dependiente de los aminoácidos libres o péptidos que se hallen en él. Se sabe que *Lactobacillus casei* Shirota, exhibe una menor capacidad de hidrolizar proteínas que otras bacterias lácticas, probablemente debido a su bajo nivel de actividad de dipeptidasas (Requena *et al*, 1993).

#### Separación de péptidos de bajo peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. 4) se evaluó la concentración y pesos moleculares de seroproteínas de WPC-80 y WPC-80 hidrolizado con *L. casei* Shirota y *L. casei* Shirota enriquecido con Se. Los pesos moleculares calculados son comparables con los reportados en bibliografía revelando la presencia de las proteínas de lactosuero lactoferrina, Seroalbúmina, y  $\alpha$ -lactoalbumina, en el WPC-80 (carril W). Análisis similares se han llevado a cabo, considerando a la electroforesis como un método efectivo para la separación de proteínas de leche (Jovanović *et al*, 2005 & Walstra *et al*, 1987). Se presentó evidencia de hidrólisis de proteínas, la cual derivó en la liberación de fracciones peptídicas menores a 6.5 KDa. Sin embargo, no se observó diferencia significativa ( $P=0.05$ ) entre las pruebas de los hidrolizado con bacterias enriquecidas y sin enriquecer (carriles B y S). Se ha observado que las bacterias ácido lácticas son capaces de hidrolizar proteínas de leche generando péptidos de bajo peso molecular, los cuales llegan a tener actividad biológica importante como inhibición de enzima convertidora de angiotensina (péptidos antihipertensivos) entre otras actividades (González-Olivares *et al*, 2011).

Los pesos moleculares de los péptidos liberados, calculados a través del software Image-Lab, durante la hidrólisis se pueden observar en la Tabla I. La importancia de este tipo de péptidos además de su carácter bioactivo, es que al ser liberados se acumulan y algunos de ellos tienen la capacidad de crear un ambiente antioxidante. Esto es de relevancia, ya que se ha encontrado que algunos de los péptidos liberados de proteínas de leche tienen capacidad antioxidante y esta se puede revelar a través de análisis químico (Virtanen *et al*, 2007). Así es que, la capacidad antioxidante no solo será dependiente de la presencia de Se si no de la presencia de algunos péptidos liberados por la bacteria probiótica.

**Figura 4.** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE de muestras reconstituidas al 5% p/v. St=estándar, W= WPC-80, B=Hidrolizado proteico con bacterias control, S= hidrolizado proteico con bacterias enriquecidas



**Tabla I.** Pesos moleculares (KDa) de las fracciones proteicas liberadas por la fermentación

St	W	B	S
PM	PM	PM	PM
200	182.78	155.95	154.22
116.25	96.89	83.82	96.99
97.40	78.44	75.02	80.13
66.19	65.62	63.85	73.84
45	55.16	54.21	62.71
31	44.83	45.19	53.28
21.5	39.47	39.33	45.68
14.4	34.25	33.96	39.18
6.5	28.97	30.13	34.51
	14.54	20.63	20.48
	6.5	14.16	14.84
		6.5	6.5

**Evaluación de actividad antioxidante.**

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

En este estudio, la evaluación de la actividad antioxidante (AA) de los hidrolizados proteicos se realizó mediante los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP. Los resultados obtenidos para cada ensayo se pueden observar en la tabla II. Se determinó que la actividad antioxidante por ABTS y FRAP muestran el mismo comportamiento, donde la AA es menor en los hidrolizados con la bacteria enriquecida con Se que con los hidrolizados con la bacteria control. Por otro lado, los resultados obtenidos por DPPH demuestran que la presencia de Se en el medio de cultivo, aumenta la actividad antioxidante del hidrolizado proteico, pero no de manera significativa (P=0.05). Esta diferencia entre los métodos se debe a que el mecanismo de acción de cada ensayo es diferente. Sin embargo, se puede decir que por medio de los tres ensayos, los hidrolizados proteicos demostraron tener actividad antioxidante, el mecanismo particular de esta aún queda por confirmar. Sin embargo, se atribuye principalmente a la liberación de péptidos de bajo peso molecular liberados después de la fermentación y a la acción de la selenocisteína producida después del enriquecimiento en enzimas como la glutatión peroxidasa.

Virtanen *et al* (2007) Demostraron que diferentes especies de lactobacilos tienen la capacidad de aumentar la capacidad antioxidante del lactosuero después de ser fermentados con estas bacterias. Entre las bacterias con mayor capacidad de inhibir la formación del radical ABTS está *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 con 29% y *Lact. acidophilus* ATCC 4356 con 42% de inhibición. En el mismo sentido, Dalia *et al* (2017) expuso que 4 cepas aisladas del rumen identificadas como *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* al ser enriquecidas con Se tienen la capacidad de introducir parte de este Se a sus proteínas. La capacidad antioxidante del extracto de estas proteínas determinada por el ensayo de ABTS osciló entre 30 y 35 mg equivalentes de Trolox/L.

**Tabla II.** Actividad antioxidante de hidrolizados proteicos

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

A.A.= Actividad antioxidante. D.S. =Desviación estándar

## CONCLUSIÓN

El microorganismo tiene la capacidad de introducir a su metabolismo una concentración considerable del Se presente en el medio y probablemente introducir este selenio en moléculas de selenocisteína. Además la bacteria puede sobrevivir en la matriz al finalizar el proceso de fermentación y liofilización. Por otro lado el producto demostró un aumento en la capacidad antioxidante respecto al concentrado de proteínas de leche convencional. Es así que, con los análisis realizados se puede considerar que este concentrado de proteínas de suero de leche hidrolizado con *L. casei* Shirota enriquecido con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> como un suplemento alimenticio con características probióticas y bioactivas cumpliendo así con el objetivo del trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andreoni, V., Moro, M. L., Cavalca, L., Erba, D., & Ciappellano, S. (2000). Selenite tolerance and accumulation in the lactobacillus species. *Annals of Microbiology*, 50(1), 77-88.
- Benzie, F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power". the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239, 70-76.
- Bounous, G. (2000). whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer research*, 20, 4785-4792.
- Bounous, G., Batist, G., & Gold, P. (1989). Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clin invest med*, 12, 154-161.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, E. M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food science and technology*, 1(28), 25-30. doi:https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Calomme, M., HuK, J., Branden, V. D., & Vanden, B. D. (1995). Seleno-lactobacillus. *Biological Trace Element Research*, 47, 379-383. doi:https://doi.org/10.1007/BF02790140
- Camara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC). (2011). *El libro blanco de la leche y los productos lácteos* (Primera ed.). México, D.F.: Autor.
- Dalia, A., Loh, T. C., Sazli, A. Q., Jahromi, M. F., & Sansudin, A. A. (2017). Characterization and Identification of organic selenium enriched bacteria isolated from rumen fluid and hot spring water. *Microbiology and biotechnology letters*, 45(4), 343-353. doi:doi.org/10.4014/mbl.1712.12010
- Dalia, M. A., Loh, T. C., Sazili, Q. A., Jahromi, F. M., & Samsudin, A. A. (2017). The effect of dietary bacterial organic selenium on growth performance, antioxidant capacity, and selenoproteins gene expression in broiler chickens. *BMC veterinary research*, 13:254. doi:10.1186/s12917-017-1159-4

- Damodaran, S. (2010). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En O. R. Fennema, *Química de los alimentos* (págs. 215-326). España: Acribia.
- Galano, E., Mangiapane, E., Bianga, J., Palmese, A., Pessione, E., Szpunar, J., . . . Amoresano, A. (2013). Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. *Molecular & cellular proteomics*, *12*, 2196-2204. doi:10.1074/mcp.M113.027607
- Gan, F., Chen, X., Liao, F. S., Lv Chenhui, R. F., Ye, G., Pan, C., . . . Huang, K. (2014). Selenium-enriched probiotics improve antioxidant status, immune function, and selenoprotein gene expression of piglets raised under high ambient temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(20), 4502-4508. doi:10.1021/jf501065d
- González-Olivares, G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., G. Rodríguez-Serrano, L. G.-R., & García-Garibay, M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista mexicana de ingeniería química*, *10*(2), 179-188.
- González-Olivares, L. G., Contreras-López, E., Flores-Aguilar, J. F., Rodríguez-Serrano, A., Castañeda-Ovando, A., Jaimez-Ordaz, J., . . . Cruz-Guerrero, A. E. (2016). Inorganic selenium uptake by *Lactobacillus* spp. *Revista mexicana de ingeniería química*, *15*(1), 33-38.
- González-Olivares, L. G., López-Cuellar, Z. L., Añorve-Morga, J., Franco-Fernández, M. J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., . . . Rodríguez-Serrano, G. M. (2014). Viability and proteolytic capacity of *Lactobacillus burgaricus* 2772 and *Lactobacillus rhamnosus* GG during cheese ripening. *Journal of biosciences and medicines*, *2*, 7-12. doi://dx.doi.org/10.4236/jbm.2014.23002
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolome, B., & Amigo, L. (2005). Preparation and antioxidant enzymatic hydrolysates from a-lactalbumin and b-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*, 588-583. doi:10.1021/jf048626m
- Jovanović, S., Barać, M., & Maćej, O. (2005). Whey proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo*, *55*(3), 215-233.
- Kunji, E. R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *70*, 187-221.
- Markus, C. R., Oliver, B., & de Haand, E. H. (2002). Whey protein rich in a-lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *The american journal of clinical nutrition*, *75*, 1051-1056.
- Martínez-Ramírez, X., Rodríguez-Serrano, G. M., Contreras-López, E., Añorve-Morga, J., Jaimez-Ordaz, J., & González-Olivares, L. G. (2017). Crecimiento de bacterias ácido lácticas en presencia de una concentración crítica de inhibición de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. *Investigación y desarrollo en ciencia y tecnología de alimentos*, *2*, 128-1234.
- Mulero, C. J., Zafrilla, R. P., Martínez-Cachá, M. A., Leal, H. M., & Abellán, A. J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e investigación en arteriosclerosis*, *23*(5), 219-227. doi:10.1016/J.ARTERI.2011.04.004

- Muro, U. C., Álvarez, F. R., Riera, R. F., Arana, C. A., & Téllez, J. A. (2011). Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food science and technology international*, 17(4), 293-317. doi:10.1177/1082013211398801
- Nagpal, R., Behare, P., Rana, R., Kumar, A., Kumar, M., Arora, S., . . . Yadav, H. (2011). Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food & function*, 2, 18-27. doi:10.1039/c0fo00016g
- Parvez, S., Malik, K., Kang, S. A., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*, 100, 1171-1185. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x
- Pereira, C., Henriques, M., Gomes, D., Gomez-Zavaglia., & de Antoni, G. (2015). Novel functional whey-based drinks with great potential in the dairy industry. *Food technology & biotechnology*, 53(3), 307-314. doi:10.17113/ft b.53.03.15.4043
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in food science & technology*, 11, 347-356.
- Pophaly, S. D., Poonam, Singh, P., Kumar, H., Tomar, S. K., & Singh., R. (2014). Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: A functional food perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 39, 135-145. doi:10.1016/J.TIFS.2014.07.006
- Pusztahelyi, T., Szilvia, K., István, P., & Prokisch, J. (2015). Selenite-stress selected mutant strains of probiotic bacteria for Se source production. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 30, 96-101. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.11.003
- Rayman, P. M. (2012). Selenium and human health. *The lancet*, 379, 1256-1268. doi:10.1016/S0140-6736(11)61452-9
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*, 26(9), 1231-1237.
- 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. doi:DOI 10.1007/s12011-010-8734-x
- Requena, T., Pelaez, C., & Fox, F. P. (1993). Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 196, 351-355. doi:10.1007/BF01197934
- Saini, K., Tomar, S. K., Sangwan, V., & Bhushan, B. (2014). Evaluation of lactobacilli from Human sources for uptake and accumulation of selenium. *Biological trace element research*, 160, 433-436. doi:10.1007/s12011-014-0065-x
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic system of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 71, 394-406. doi:10.1007/s00253-006-0427-1
- Segovia, C. J. (2017). *Efecto de la presencia de serina en medio mínimo, sobre la producción de selenocisteína por Streptococcus thermophilus*. Tesis de especialidad, Universidad Autónoma Metropolitana, México.

- Steinbrenner, H., & Sies, H. (2013). Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: Implications for disorders in the central nervous system. *Archives of biochemistry and biophysics*, 536, 152-157. doi://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.02.021
- Vázquez, S., Crosa, M. J., Rey, F., & Lopretti, M. (2009). Viabilidad del uso de suero de quesería como base del medio de cultivo de la cepa nativa probiótica *Lactobacillus paracasei* HA9-2. *Revista del laboratorio del Uruguay*(4), 10-14.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*, 106-115. doi:0.1111/j.1365-2672.2006.03072.x
- Walstra, P., & Jenness, R. (1987). *Química y física lactológica*. Zaragoza, España: Acribia.
- Xia, K. S., Chen, L., & Liang, Q. J. (2007). Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(6), 2413-2417.
- Zamora, V. R. (2011). *Elaboración de un alimento funcional a base de Saccharomyces boulardii e inulina*. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Michoacán, México.