

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**TESIS:**

**Obtención de biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae*  
utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio**

Para optar el título profesional de:  
**BIÓLOGO, ESPECIALIDAD: MICROBIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:  
**Bach. Edgar ESCRIBA GUTIERREZ**

ASESORA:  
**Dra. Vidalina ANDÍA AYME**

COASESOR:  
**Dr. Gilmar PEÑA ROJAS**

**AYACUCHO - PERÚ**

**2025**

A Dios, guía eterna. A mis padres Margarita y Víctor, inspiración constante. A mis hermanos Zaida, Fredy y Sandra, amor incondicional. Y al Cuerpo de Bomberos Voluntarios, valentía ejemplar.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela Profesional de Biología, a la Especialidad de Microbiología y la plana de docentes, por sus enseñanzas a lo largo de mi formación universitaria.

A CONCYTEC – PROCIENCIA en el marco de la convocatoria E041-2022-02, Contrato N° PE501079538-2022, por el financiamiento y ser miembro del proyecto.

A la Dra. Vidalina Andía Ayme por su asesoría y constante apoyo durante toda la tesis.

Al Dr. Gilmar Peña Rojas por su orientación y mentoría en las diferentes etapas de la investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
LISTA DE ABREVIACIONES	xii
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Marco conceptual	6
2.3. El selenio	7
2.3.1. Selenio inorgánico	9
2.3.2. Selenio orgánico	9
2.4. Fuentes de selenio en la nutrición y biodisponibilidad	11
2.4.1 Fuentes de origen animal	12
2.4.2. Fuentes de origen vegetal y fúngicos	12
2.4.3. Suplementos de selenio	13
2.5. Metabolismo del selenio	14
2.6. Importancia biológica del selenio	15
2.7. <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	16
2.8. Biotransformación del selenio por microorganismos	17
2.8.1. Biotransformación del selenio por bacterias	17
2.8.2. Biotransformación del selenio por levaduras	17
2.9. Levadura selenizada	21
2.10. Cuantificación y especiación del selenio	22
2.10.1. Determinación de selenio intracelular	23
2.11. Espectroscopía de emisión atómica ICP- OES	23

III.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1.	Ubicación del lugar de estudio	25
3.2.	Tamaño de muestra	25
3.3.	Tipo y diseño de la investigación	25
3.4.	Metodología y recolección de datos	26
3.4.1.	Preparación del medio YEPD y distribución en tubos Falcon	26
3.4.2.	Preparación de la solución de selenito de sodio	27
3.4.3.	Preparación del inóculo	27
3.4.4.	Adición de selenito de sodio	27
3.4.5.	Recuento de colonias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
3.4.6.	Recuperación de la biomasa	28
3.4.7.	Protocolo para la Curva de Calibración	28
3.4.8.	Determinación de selenio total intracelular	29
3.5.	Análisis estadístico	29
IV.	RESULTADOS	31
V.	DISCUSIÓN	36
VI.	CONCLUSIONES	41
VII.	RECOMENDACIONES	42
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	ANEXOS	50

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Características fundamentales del selenio.	9
<b>Tabla 2.</b> Composición del medio líquido YEPD.	26
<b>Tabla 3.</b> Distribución de volúmenes de YEPD para cada tratamiento.	26
<b>Tabla 4.</b> Recuento total de UFC/mL de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes concentraciones de selenito de sodio en 72 h (promedio).	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Esquemas de Frost para selenio y azufre a pH 0 y 14. El valor $nE^{\circ} = 0$ es obligadamente establecido al estado cero-valente.	8
<b>Figura 2.</b> Formas químicas de las principales moléculas selenizadas.	10
<b>Figura 3.</b> Fuentes de selenoaminoácidos y su Metabolismo en mamíferos para la conversión en selenoproteínas	14
<b>Figura 4.</b> Incorporación de selenocisteína a la síntesis proteica	19
<b>Figura 5.</b> Rutas metabólicas de reducción del selenio y su transformación en compuestos orgánicos.	20
<b>Figura 6.</b> Fases analíticas para cuantificar el selenio total y sus diferentes especies.	22
<b>Figura 7.</b> Efecto del selenito de sodio en el crecimiento de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> INSTANT SUCCESS - LESAFFREE® (promedio).	33
<b>Figura 8.</b> Biomasa de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio (promedio).	34
<b>Figura 9.</b> Cuantificación del Selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SUCCESS-LESAFFREE® (promedio).	35

## ÍNDICE DE ANEXOS

	pág.
<b>Anexo 1.</b> Efecto del selenito de sodio en el crecimiento de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> INSTANT SUCCESS - LESAFFREE® (primera repetición).	51
<b>Anexo 2.</b> Efecto del selenito de sodio en el crecimiento de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> INSTANT SUCCESS - LESAFFREE® (segunda repetición).	52
<b>Anexo 3.</b> Efecto del selenito de sodio en el crecimiento de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> INSTANT SUCCESS - LESAFFREE® (tercera repetición).	53
<b>Anexo 4.</b> Prueba de ANOVA para las UFC/mL de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 4 h (promedio).	54
<b>Anexo 5.</b> Prueba de Kruskal - Wallis para las UFC/mL de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 16 h (promedio).	54
<b>Anexo 6.</b> Prueba de Kruskal - Wallis para las UFC/mL de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 28 h (promedio).	54
<b>Anexo 7.</b> Pruebas Post hoc para las UFC/mL de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio (promedio).	55
<b>Anexo 8.</b> Biomasa (g) de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio.	56
<b>Anexo 9.</b> Prueba de ANOVA para la biomasa (g) de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 4 h (promedio).	57

- Anexo 10.** Prueba de ANOVA para la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 16 h (promedio). 57
- Anexo 11.** Prueba de ANOVA para la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 28 h (promedio). 57
- Anexo 12.** Comparación de la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio (primera repetición). 58
- Anexo 13.** Comparación de la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio (segunda repetición). 59
- Anexo 14.** Comparación de la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio (tercera repetición). 60
- Anexo 15.** Cuantificación del selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE®. 61
- Anexo 16.** Prueba de ANOVA para el selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® a las 4 h (promedio). 62
- Anexo 17.** Prueba de ANOVA para el selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® a las 16 h (promedio). 62
- Anexo 18.** Prueba de ANOVA para el selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® a las 28 h (promedio). 62
- Anexo 19.** Comparación del Selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® (primera repetición). 63

<b>Anexo 20.</b>	Comparación del Selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SUCCESS-LESAFFREE® (segunda repetición).	64
<b>Anexo 21.</b>	Comparación del Selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> SUCCESS-LESAFFREE® (tercera repetición).	65
<b>Anexo 22.</b>	Gráfica de la curva de calibración para Selenio (Se) a 196 nm.	66
<b>Anexo 23.</b>	Distribución de volúmenes de YEPD para cada tratamiento de Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> .	67
<b>Anexo 24.</b>	Incubación de los diferentes tratamientos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 30°C sometida a tres concentraciones de selenito de sodio en el medio YEDP.	67
<b>Anexo 25.</b>	Distribución de los diferentes tratamientos con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en los tubos Falcon.	68
<b>Anexo 26.</b>	Recuento de colonias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en UFC/mL a las 16 horas en la concentración 0 de selenito de sodio.	68
<b>Anexo 27.</b>	Recuento de colonias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en UFC/mL a las 16 horas en la concentración 5 de selenito de sodio.	69
<b>Anexo 28.</b>	Recuento de colonias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en UFC/mL a las 16 horas en la concentración 7 de selenito de sodio.	69
<b>Anexo 29.</b>	Recuento de colonias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en UFC/mL a las 16 horas en la concentración 9 de selenito de sodio.	70
<b>Anexo 30.</b>	Biomasa recuperada por centrifugación a (2147 ×g) x 5 min.	71
<b>Anexo 31.</b>	Procedimiento de la ICP-OES en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad -UCSM-Arequipa.	72
<b>Anexo 32.</b>	Informe de ensayo para el análisis del contenido intracelular total de selenio utilizando ICP-OES.	73



## LISTA DE ABREVIACIONES

ICP-OES: Espectroscopía de Emisión Óptica basada en Plasma inducido por Acoplamiento Inductivo.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

YEPD: Medio de Extracto de levadura, peptona y dextrosa

DBCA: Diseño de Bloques Completamente aleatorizado

Se (IV): Selenito en estado de oxidación +4

GSH-Pxe: Glutación peroxidasa con interacción enzimática

SeMet: Selenometionina

SeCys: Selenocisteína

MeSeCys: metilselenocisteína

pKa: Constante de disociación de un ácido

HSe: selenio de hidrógeno

ATCC: American Type Culture Collection

$\gamma$ -Glu-MeSeCys:  $\gamma$ -glutamyl-Se-metilselenocisteína

Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>: Selenito de sodio

Met: Metionina

GPx: Glutación y la peroxidasa

TR: Tiorredoxina Reductasa

ID: Yodotironina Deyodinasa

DMSe: Dimetilseleniuro

DMDSe: Dimetildiselenio

MeSeH: Metilselenol

GSH: Glutación

GSSeH: Glutathioniselenol

GS-SeSG: Selenodiglutación

GSSG: Glutación oxidado

ROS: Especies reactivas de oxígeno

CCD: Policromador combinado con detectores

## RESUMEN

Las levaduras tienen la capacidad para metabolizar selenio inorgánico y biosintetizar selenoproteínas que desempeñan funciones antioxidantes esenciales en organismos superiores. El objetivo de la investigación fue obtener biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS-LESAFFRE® mediante la suplementación del medio YEPD con 5, 7 y 9 mg/L de selenito de sodio, incluyendo un grupo control sin selenio (0 mg/L). Se empleó un diseño en Bloques Completamente al Azar (DBCA). Los cultivos se incubaron en medio YEPD a 30°C bajo agitación (2147 xg) durante 72 h, se realizó el recuento de ( $10^{10}$  UFC/mL), la cuantificación de biomasa y la incorporación de selenio total intracelular. Los análisis estadísticos mediante ANOVA indicaron que no existían diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la producción de biomasa ni en la incorporación de selenio intracelular entre las diferentes concentraciones de selenito. Sin embargo, las pruebas post hoc de Tukey y Dunnett revelaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el crecimiento celular, siendo la concentración de 5 mg/L la que promovió una mayor producción de  $10^{10}$  UFC/mL. En contraste, las concentraciones de 7 y 9 mg/L mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. Estos resultados sugieren que la dosis óptima para la producción de biomasa selenizada sin comprometer la viabilidad celular es 5 mg/L, evidenciando un balance entre la bioacumulación de selenio y la tolerancia metabólica de la cepa.

**Palabras clave:** Biomasa selenizada, *Saccharomyces cerevisiae*, selenito de sodio, crecimiento celular.

## I. INTRODUCCIÓN

Por un largo periodo el selenio (Se) fue catalogado como un elemento tóxico con efectos nocivos para los organismos biológicos y el ambiente. No obstante, investigaciones revelaron que este oligoelemento desempeña funciones biológicas esenciales en animales y seres humanos, lo que transformó radicalmente la perspectiva científica sobre su relevancia nutricional y biomédica (López, 2013). Actualmente, se reconoce al selenio como un componente clave en diversos procesos metabólicos, especialmente por su papel en la modulación del sistema inmunológico, su potente capacidad antioxidante y su potencial efecto protector frente al desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Rayman, 2000). Aunque el selenio no es considerado indispensable para el desarrollo vegetal, este micronutriente es absorbido por las plantas desde el suelo que actúa como su reservorio principal. Este proceso de asimilación ocurre de manera aleatoria, dependiendo de factores como la concentración y biodisponibilidad del selenio en el sustrato edáfico. Dado que la cadena trófica es la vía predominante a través de la cual el selenio llega a los animales y humanos, existe una correlación directa entre los niveles de selenio en los suelos agrícolas y su concentración en los organismos superiores (Rayman, 2012).

En algunos alimentos, el selenio se presenta en formas inorgánicas como selenato, selenito y selenuro como en especies orgánicas, entre las que destacan la selenometionina (SeMet), la selenocisteína (SeCys) y la metilselenocisteína (MeSeCys). Estas últimas se encuentran predominantemente en productos de origen animal, vegetal y en suplementos nutricionales (Rayman et al., 2008). La forma química y la concentración en la que se encuentre dependerá para su biodisponibilidad y bioaccesibilidad (Cabañero et al., 2005; Navarro & Cabrera, 2008). A pesar de su

importancia biológica, se estima que una gran parte de la población no consume las cantidades sugeridas de selenio. Estudios realizados en muestras de plasma sanguíneo en poblaciones de cerca 70 países han demostrado que más del 50% de los individuos presentan deficiencia de este oligoelemento, lo que representa un desafío para la salud pública a nivel mundial (Kieliszek et al., 2016; Rayman, 2012). Ante este panorama, en la última década se ha intensificado el desarrollo de técnicas orientadas a la producción de alimentos funcionales enriquecidos con selenio. Una estrategia prometedora ha sido el uso de microorganismos, particularmente el género *Sacharomyces*, para generar suplementos nutricionales con mayor biodisponibilidad del oligoelemento (He & Yao, 2010). En este contexto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado una notable capacidad para tolerar concentraciones adecuadas de selenio inorgánico y transformarlo en formas orgánicas incorporándose eficientemente a su biomasa. Sin embargo, depende significativamente del tipo de cepa que se utiliza. La levadura selenizada representa una fuente alternativa y efectiva de suplementación, y ha sido objeto de numerosas investigaciones enfocadas en su caracterización bioquímica y nutricional (Rodríguez et al., 2019). El estudio y caracterización del contenido y forma química del selenio en estas matrices biológicas se apoya en técnicas analíticas de alta precisión, como la Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), entre otras. Estas técnicas permiten cuantificar la concentración de selenio total e intracelular, así como evaluar su incorporación y transformación a compuestos orgánicos bioactivos, facilitando así el diseño racional de estrategias de biofortificación y suplementación. La presente investigación evaluó el crecimiento y la capacidad de bioacumulación de selenio en la cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE® cultivada en medio extracto de levadura-peptona-dextrosa (YEPD), enriquecido con selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) en concentraciones de 5, 7 y 9 mg/L. Las condiciones de cultivo se mantuvieron bajo parámetros controlados de temperatura ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y agitación constante (150 rpm) para optimizar la producción de biomasa selenizada. Los objetivos planteados en la investigación fueron:

**Objetivo general**

Obtener biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio.

**Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de las concentraciones de selenito de sodio en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE®.
- Cuantificar la biomasa selenizada *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE®.
- Cuantificar el selenio total intracelular en la biomasa obtenida de *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE®.
- Determinar la concentración óptima de selenito de sodio para obtener biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE®.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Wu et al. (2021) buscaron optimizar la producción de selenoaminoácidos empleando la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* LG6 en un medio enriquecido con glucosa mediante fermentación añadiendo diferentes concentraciones de selenito de sodio. Además, determinaron la tasa de crecimiento, incorporación de selenio intracelular y especiación bioquímica del selenio. Los resultados mostraron una acumulación máxima de selenio intracelular de 17,88 mg/L predominando la forma orgánica metilselenocisteína 58%. A su vez, se observó que concentraciones mayores a 10 mg/L provocaban efectos inhibitorios en el crecimiento celular. Concluyendo que concentraciones menores o iguales a 8 mg/L son efectivas para promover la incorporación de selenio intracelular sin comprometer el crecimiento celular, siendo clave las condiciones del cultivo y el tipo de cepa.

Rodríguez et al. (2019) realizaron la determinación de selenio total y viabilidad celular de *Saccharomyces cerevisiae* con la finalidad de obtener levadura selenizada, empleando el medio YEPD suplementado con selenito de sodio a concentraciones de, 4, 6, 8 y 10 mg/L respectivamente, para hacer la cuantificación intracelular emplearon Espectrofotometría de Masas utilizando almidón-yoduro a una longitud de onda de 590 nm, evidenciando que la concentración 8 mg/L genera mayor biomasa, mayor viabilidad celular y contenido intracelular de  $738 \pm 30$  mg/kg en peso seco.

Rodríguez, (2019) realizó su tesis doctoral con el propósito de cuantificar el selenio total intracelular, la especiación de selenometionina y metilselenocisteína en la biomasa obtenida de *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN RC-212 enriquecidas a concentraciones de selenito de sodio de 2,4,6,8,10 mg/L por 48 h, las técnicas empleadas fueron espectrofotométricas, cromatográficas y electrométricas. Los

resultados demostraron que la mayor producción de biomasa y viabilidad celular (>90%) se obtuvo con 8 mg/L, alcanzando contenidos de  $630 \pm 150$  mg/kg de metilselenocisteína y  $1141 \pm 42$  mg/kg de selenometionina. Concluyó que la concentración 8 mg/L de selenito de sodio resultó ser óptima, promoviendo tanto la acumulación de formas orgánicas de selenio como una elevada tasa de viabilidad y crecimiento celular bajo condiciones aeróbicas.

Zare et al. (2017) investigaron la capacidad de cepas autóctonas de *Saccharomyces cerevisiae* para tolerar y biotransformar selenito de sodio, con el fin de generar biomasa enriquecida en selenometionina. Se cultivaron diferentes aislados en medio suplementado con 25 mg/L de selenito, evaluando tanto la biomasa generada como la acumulación intracelular de selenio orgánico. La cepa S18 destacó por su alta tolerancia y eficiencia biotransformadora, acumulando hasta 3,73 g/L de selenometionina sin comprometer el crecimiento celular. A pesar de la toxicidad del selenito, esta cepa demostró mecanismos adaptativos para su incorporación segura. Se determinó que la concentración empleada permitió un equilibrio adecuado entre productividad celular y enriquecimiento funcional. Este estudio evidencia que la selección de cepas resistentes y la dosificación precisa del selenito son claves para optimizar la producción de biomasa selenizada, con aplicaciones en biotecnológicas en la alimentación.

Oraby et al. (2016) investigó la biodisponibilidad del selenio en *S. cerevisiae* sometidos a crecimiento en un medio compuesto de melaza dispuestos a diferentes concentraciones de selenito de sodio (0,9, 1,8, 3,2 y 3,6  $\mu\text{g Se}/100\text{g}$ ). La biodisponibilidad del selenio-levadura se evaluó midiendo la acumulación de selenio y la actividad del glutatión peroxidasa con interacción enzimática (GSH-Pxe) en los eritrocitos de ratones Sprague Dawley. Los resultados demostraron que la concentración óptima fue de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el medio de cultivo, ya que esta condición permitió una elevada acumulación de selenio orgánico y un adecuado crecimiento celular. Además, evidencio la actividad del glutatión peroxidasa, concluyendo que *Saccharomyces cerevisiae* para panificación es recomendada para generar levadura selenizada y pueda servir como suplemento alimenticio.

Kieliszek et al. (2016) determinaron la capacidad de fijación del selenio a las biomasas de *S. cerevisiae* ATCC MYA-2200 y *C. Utilis* ATCC 9950. El estudio tuvo un enfoque experimental cuantitativo, donde se introdujeron concentraciones de selenito de sodio

(10, 20, 40 y 60 mg/L) en medios experimentales de YEPD líquido por 72 horas. Asimismo, utilizaron el método espectrofotométrico con Variamine Blue como agente cromogénico para determinar el contenido de selenio. Como resultado se observó una eficiente producción de biomasa en ambas levaduras, pero la mayor cantidad de selenio intracelular fue acumulado por *C. utilis* ATCC 9950 en comparación con *S. cerevisiae* ATCC MYA-2200, en condiciones similares, concluyendo que *C. utilis* ATCC 9950 tiene mecanismos adicionales que le permite tolerar a este oligoelemento en su crecimiento.

Kieliszek et al. (2015) examinaron la capacidad de bioacumulación y metabolismo del selenio en *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, y *Yarrowia lipolytica* suministrándoles selenito de sodio entre 10 y 50 mg/L. Los resultados demostraron que la bioacumulación de selenio ocurre a través de dos mecanismos principales: la unión extracelular mediante ligandos de membrana y la acumulación intracelular asociada al transporte de iones a través de la membrana citoplasmática hacia el interior de la célula. Concluyendo que la concentración óptima es de 50 mg/L, porque evidencio el mayor contenido de selenio orgánico. Además, ocurren procesos bioquímicos como oxidación, reducción, metilación, desintoxicación y síntesis de selenoproteínas para sobrevivir a las condiciones del cultivo y al efecto del selenio.

Ponce de León et al. (2002) evaluaron los efectos del enriquecimiento con selenio inorgánico sobre el crecimiento celular de *Saccharomyces cerevisiae*, así como su capacidad para acumular selenio total en condiciones controladas. Para ello, cultivaron de *S. cerevisiae* durante 24 h en medios YEPD y YEPG, suplementados con concentraciones de selenito de sodio (10, 20, 40 y 50 mg/L), a 30 °C y 250 rpm. Los resultados mostraron que la concentración de 10 mg/L favoreció el crecimiento celular, alcanzando una densidad de  $5,4 \times 10^7$  células/mL, lo que indica una mayor producción de biomasa. En contraste, las concentraciones superiores (20, 40 y 50 mg/L) provocaron una inhibición significativa del crecimiento, evidenciando un efecto tóxico dependiente de la dosis. Además, se observó que las células cultivadas con glucosa mostraron un crecimiento más eficiente que aquellas en medio con glicerol.

## 2.2. Marco conceptual

- **Cepa:** representa una subpoblación genéticamente diferenciada dentro de una especie microbiana y caracterizada por rasgos genéticos únicos que a menudo se

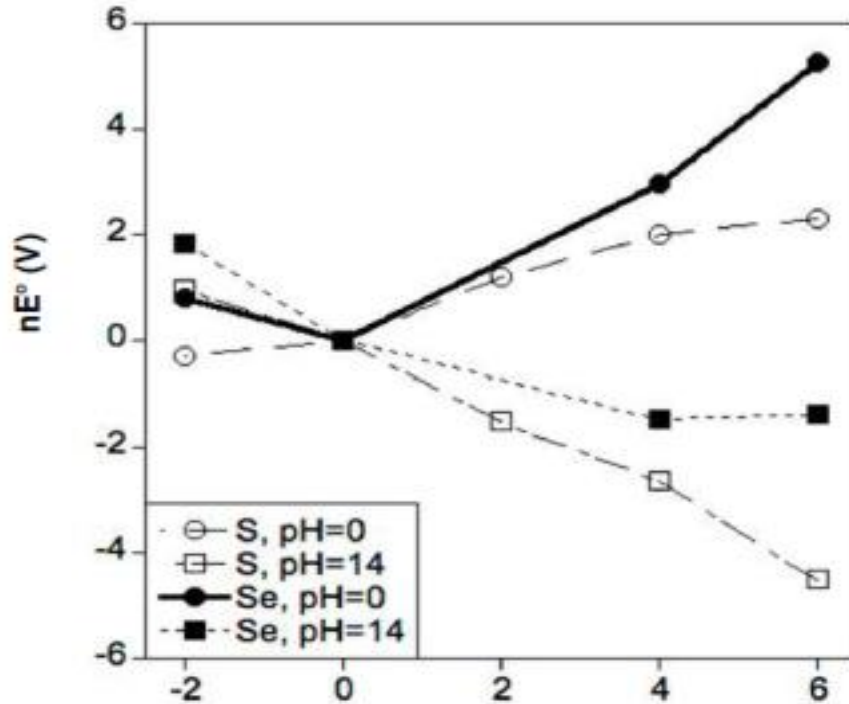
manifiestan en propiedades fenotípicas distintivas, reflejando la diversidad su adaptación evolutiva.

- **Levadura:** hongo unicelular que se reproduce principalmente por gemación y tiene la capacidad de fermentar azúcares. *Saccharomyces cerevisiae* es ampliamente usada por su eficiencia metabólica y seguridad biotecnológica.
- **Biomasa:** cantidad total de células microbianas, como las levaduras, generadas en un cultivo durante un determinado periodo. Su producción es el resultado de una rápida tasa de división celular, generalmente promovida bajo condiciones de fermentación aerobia o anaerobia. Factores como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, el pH, la aireación y la agitación son determinantes para maximizar el rendimiento
- **Selenito de sodio:** sal inorgánica utilizada comúnmente como fuente de selenio en cultivos microbiológicos y como aditivo en suplementos nutricionales, tanto en humanos como en animales. Se presenta como un sólido cristalino blanco e inodoro, y su relevancia en bioprocesos radica en su capacidad de ser absorbido por microorganismos y transformado en formas orgánicas de selenio, como selenometionina o selenocisteína.
- **Selenización microbiana:** proceso mediante donde se suministra una fuente de selenio inorgánico, como el selenito de sodio, a cultivos de microorganismos con capacidad de bioacumulación y biotransformación. Este proceso permite la obtención de compuestos orgánicos con valor biológico funcional. Para su eficacia, requiere el control de la fuente de carbono, temperatura, la aireación y el tiempo de adición al medio.
- **Concentración:** cantidad de soluto presente en un volumen específico de solución. En cultivos microbianos, su control es clave para evitar toxicidad y optimizar la productividad.

### 2.3. El selenio

Es un micronutriente fundamental para diversas formas de vida en la tierra y sus formas orgánicas como SeMet y SeCys son esenciales para el metabolismo. Este elemento se encuentra en el grupo 16 de la tabla periódica con número atómico 34, también conocido como grupo calcógeno. Este grupo está formado por elementos como el oxígeno, selenio, azufre, telurio y polonio radiactivo. Entre estos elementos, el oxígeno, el azufre y el selenio desempeñan funciones esenciales en los seres vivos,

sin embargo, el selenio solo es requerido en ínfimas cantidades necesarias (Rodríguez, 2019).



**Figura 1.** Esquemas de Frost para selenio y azufre a pH 0 y 14. El valor  $nE^{\circ} = 0$  es obligadamente establecido al estado cero-valente. Fuente: (Cupp-Sutton & Ashby, 2016)

El uso del selenio se basa en sus propiedades químicas (Tabla 1), algunas son parecidas a las del azufre. Por ejemplo, la electronegatividad de ambos elementos es similares. Sin embargo, existen diferencias, porque el azufre genera enlaces covalentes más fuertes (elemento-carbono, elemento-elemento y elemento-hidrógeno) en comparación con el selenio. Afirmando que es más fácil oxidar el selenio que azufre, como se aprecia en los diagramas de Frost (Figura 1). Según Cupp-Sutton & Ashby, (2016), los estados de oxidación del selenio, que incluyen -II, 0, IV y VI, son termodinámicamente firmes en agua. En tal sentido, Martens, (2003) indica que el estado de oxidación condiciona su comportamiento químico, porque afecta la solubilidad y su capacidad de circulación en el ambiente. Su distribución está influenciada por el pH del medio, metabolismo microbiano y el potencial redox.

**Tabla 1.** Características fundamentales del selenio.

Propiedades	Valores
Configuración electrónica	[Ar] 3d <sup>10</sup> 4s <sup>2</sup> 4p <sup>4</sup>
Masa atómica promedio (g/mol)	78,96
Radio covalente (pm)	115
Radio Van der Waals (pm)	190
	146 (Se-H)
Longitud de enlace (pm)	196 (Se-C)
	232 (Se-Se)
	334,9 (Se-H)
Longitud de enlace (kJ.mol <sup>-1</sup> )	234 (Se-C)
	197,6 (Se-Se)
	940,9
Energía de ionización (kJ.mol <sup>-1</sup> )	2045
Afinidad electrón (kJ.mol <sup>-1</sup> )	195
Electronegatividad Pauling	2,55
Polarizabilidad (en Å <sup>3</sup> )	3,89
PKa <sub>1</sub> , (H <sub>2</sub> X)	3,89
PKa <sub>2</sub> , (HX <sup>-</sup> )	15,1
PKa <sub>2</sub> , (Cys/Sec)	5,43

Fuente: (Cupp-Sutton & Ashby, 2016)

### 2.3.1. Selenio inorgánico

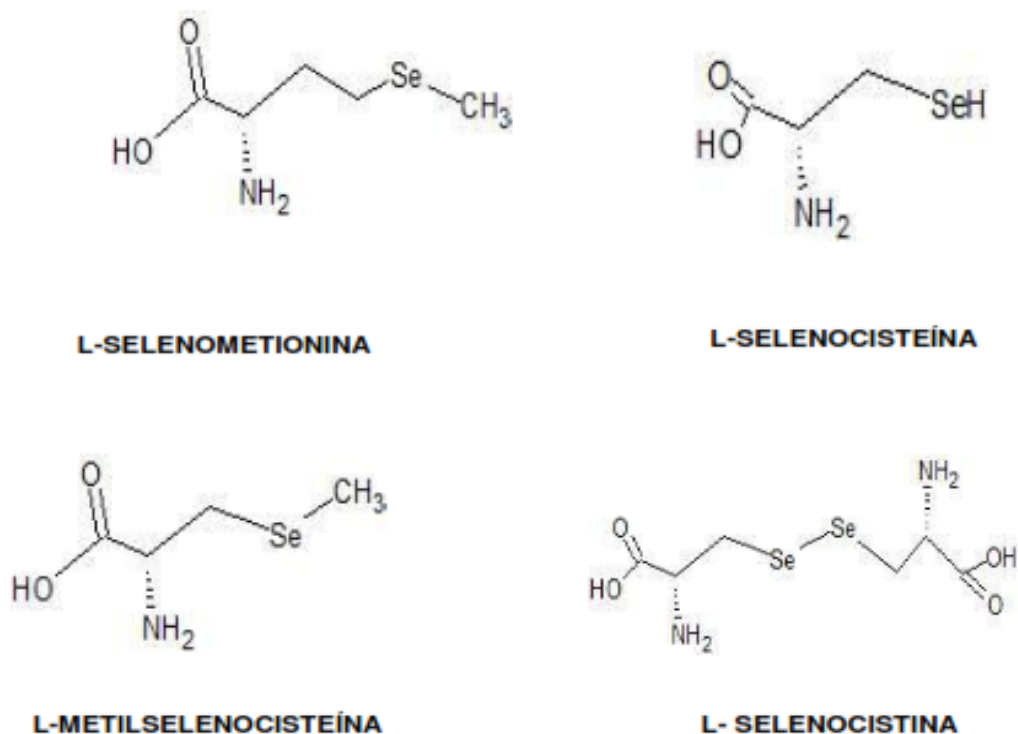
Las formas inorgánicas de selenio más empleadas son: Selenuro (Se<sup>-2</sup>) potencialmente toxico, Selenato (SeO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) (Se VI) moderadamente nocivo, selenito (SeO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) (Se VI), selenito de sodio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) y selenio elemental (Se<sup>0</sup>) no tóxico para el hombre. Las tres últimas formas pueden ingresar al metabolismo de muchas especies de microorganismos así transformar el selenio inorgánico en especies orgánicas bajo la forma de selenoaminoácidos (Galano et al., 2013).

### 2.3.2. Selenio orgánico

Meseko et al., (2013) señalan que las principales formas orgánicas del selenio son los selenoaminoácidos y selenoproteínas, importantes por su elevada biodisponibilidad. (Herrero & Wellinger, 2015) indican que el Se (-II) se manifiesta en

el ambiente en forma metilada y volátil o como compuesto organotóxico en proteínas, especialmente en aminoácidos. Por su parte Weekley et al., (2011), señalan que la selenometionina (SeMet) y la metilselenocisteína (MeSeCys), ambos selenoaminoácidos, están presentes de manera natural en diversos alimentos. También está disponible en suplementos dietéticos. La Figura 2 muestra estructuras de selenomoléculas y formas orgánicas.

Según Suzuki, (2005), la SeMet puede hallarse como residuo de proteínas en forma de aminoácido y en estado libre en alimentos que la acumulan de manera natural. Por otro lado, la SeCys, debido a su alta reactividad por el grupo selenol ( $\text{SeH}^1$ ), rara vez está libre, en su lugar se acumulan formas no reactivas, como SeMet, MeSeCys,  $\gamma$ -glutamil-Se-metilselenocisteína ( $\gamma$ -Glu-MeSeCys), péptidos y como residuo en selenoproteínas en forma de selenoaminoácidos. Asimismo, la SeMet y MeSeCys abundan en levaduras y plantas que acumulan selenio.



**Figura 2.** Formas químicas de las principales moléculas selenizadas.

Fuente: (Cjuno & Rodríguez, 2018)

La selenocisteína (SeCys) es uno de los selenoaminoácidos más reconocidos y participa en funciones proteicas y reacciones redox; sin embargo, no sustituye a la

cisteína en procesos como el plegamiento oxidativo ni en mecanismos enzimáticos ajenos a reacciones redox (Salinas, 2010). Las enzimas que tienen SeCys en el sitio activo son catalíticamente más eficaces que la cisteína debido a diferencias importantes. La SeCys presenta una constante de disociación ácida ( $pK_a = 5,2$ ), lo que implica que a pH neutro su grupo selenol se encuentre en forma desprotonada, como el selenolato con carga negativa. Asimismo, el  $pK_a$  a pH fisiológico confiere a las cadenas laterales de la SeCys cargas negativas a diferencia de la cisteína, además el selenio es más polarizable. Esto lo hace más nucleofílico en un rango de pH más amplio confiriendo mayor reactividad.

Por otro lado, la SeMet es un análogo de la metionina, reemplaza el átomo de azufre por selenio. Este selenoaminoácido presenta dos valores de disociación  $pK_1 = 2,19$  para el grupo carboxilo y  $pK_2 = 9,05$  para el grupo amino (Quijano, 1999). Además, logra incorporarse en proteínas o transformarse en SeCys, después se descompone en selenio de hidrógeno (HSe) por la acción de la  $\beta$ -liasa. Asimismo, puede convertirse de forma directa en metilselenol (MeSeH) por la enzima  $\gamma$ -liasa. A diferencia de la SeMet, la MeSeCys no se incorpora en proteínas y es descompuesta por la  $\beta$ -liasa en metilselenol (MeSeH), evitando así la formación de HSe (Cjuno & Rodríguez, 2018).

#### **2.4. Fuentes de selenio en la nutrición y biodisponibilidad**

La alimentación es el medio principal por el cual el organismo incorpora y asimila el selenio. El departamento de agricultura de los EE. UU sugiere el consumo de 55, 55  $\mu\text{g}/\text{día}$  de selenio para varones y mujeres (USDA, 2000). El valor nutricional del selenio depende de sus especies y concentraciones en las que se encuentre disponible en los alimentos. Las nueces, cereales, vegetales y productos cárnicos poseen selenio incorporado de manera natural, a pesar de contener selenio en su composición el aprovechamiento no es óptimo debido a la biodisponibilidad y bioaccesibilidad, es decir, la unión de selenio inorgánico a cadenas polipeptídicas que contiene SeMet o SeCys lo convierte en una forma con alta biodisponibilidad, en cambio la bioaccesibilidad se refiere a un porcentaje del total que puede ser asimilable (Pedrero & Madrid, 2009).

La asimilación de selenio derivada de los alimentos representa 80%, sin embargo, investigaciones demuestran que las formas orgánicas son más biodisponibles en

comparación con las inorgánicas aumentando la efectividad para unirse a proteínas y tener mayor absorción y retención en la sangre (Rayman, 2004).

#### **2.4.1. Fuentes de origen animal**

La carne de pollo, res y cerdo son alimentos ricos en selenio debido a su composición proteica, los niveles de selenio en estos productos oscilan entre 87,6 y 737 ng/g. otros alimentos de origen animal que podrían presentar mayores contenidos de selenio es el pescado y los huevos. En el caso de la leche, las concentraciones de selenio varían según la especie animal y su origen, siendo reportado en orden descendente: leche humana, de oveja, cabra y vaca (Navarro & Cabrera, 2008). Las principales fuentes de selenio en los distintos grupos cárnicos provienen de los selenoaminoácidos SeMet y SeCys las cuales varían en concentración y forma según la dieta de los animales. En pescados predominan formas orgánicas como la SeMet y especies inorgánicas como selenito y selenato. En caso el caso de huevos se ha identificado SeCys, SeMet y selenito, siendo la Se Met la más predominante en la clara, mientras que la SeCys se encuentra principalmente en la yema. Por otro lado, en la leche de vaca el predominio es de SeCys y selenito (Fairweather-Tait et al., 2011).

#### **2.4.2. Fuentes de origen vegetal y fúngicos**

En alimentos vegetales el contenido de selenio varía significativamente. Las frutas suelen tener bajos niveles de selenio por su escaso contenido proteico, algunos vegetales como la mostaza, la coliflor, las coles de Bruselas, la col rizada, el brócoli, el repollo, la berza, el colinabo, el cebollino, la cebolla y el ajo tienden a tener concentraciones más altas (Dumont et al., 2006). En particular, el ajo y la cebolla, que se consumen frecuentemente en la dieta mediterránea, representan una fuente significativa de selenio en el consumo diario. Por lo general el ajo contiene menos de 0,5 mg/kg de selenio, Sin embargo, si el ajo, la cebolla y el brócoli se siembran en suelos con alto contenido de selenio pueden acumular concentraciones elevadas de este micronutriente con valores entre 140 y 300 mg/kg. Este comportamiento es por la sustitución del azufre por selenio, lo que aumentaría los niveles de selenio en ellas. Las formas predominantes de selenio en las hortalizas incluyen, la SeMet, la MeSeCys, la  $\gamma$ -Glu-MeSeCys y el selenato (Fairweather-Tait et al., 2011).

Manjusha et al., (2007) descubrieron que los hongos pueden contener altos niveles de selenio (1340 ng/g), ya que ciertos tipos de setas tienden a acumularlo, posiblemente debido a su contenido elevado de compuestos azufrados. Las

cantidades de selenio en legumbres y frutos secos varían. Se ha informado que la concentración de selenio en leguminosas oscila entre 24,4 y 443,9 ng/g. Pappa et al., (2006) reportan que las lentejas evidencian mayor contenido. Los frutos secos ricos en proteínas, como las nueces y pistachos, muestran una concentración más elevada de selenio, además las nueces, poseen una concentración que va desde 7 hasta 32,27 ng/g. Asimismo, demostraron que las concentraciones promedio de selenio en el pan tienen rangos entre 70,0 y 131,8 ng/g, también reportaron que el pan integral posee mayor contenido de este elemento. Al respecto Fairweather-Tait et al., (2011) manifestaron que las formas dominantes de selenio en el trigo para pan y su producto son la SeMet, SeCys y selenato (Pappa et al., 2006).

#### **2.4.3. Suplementos de selenio**

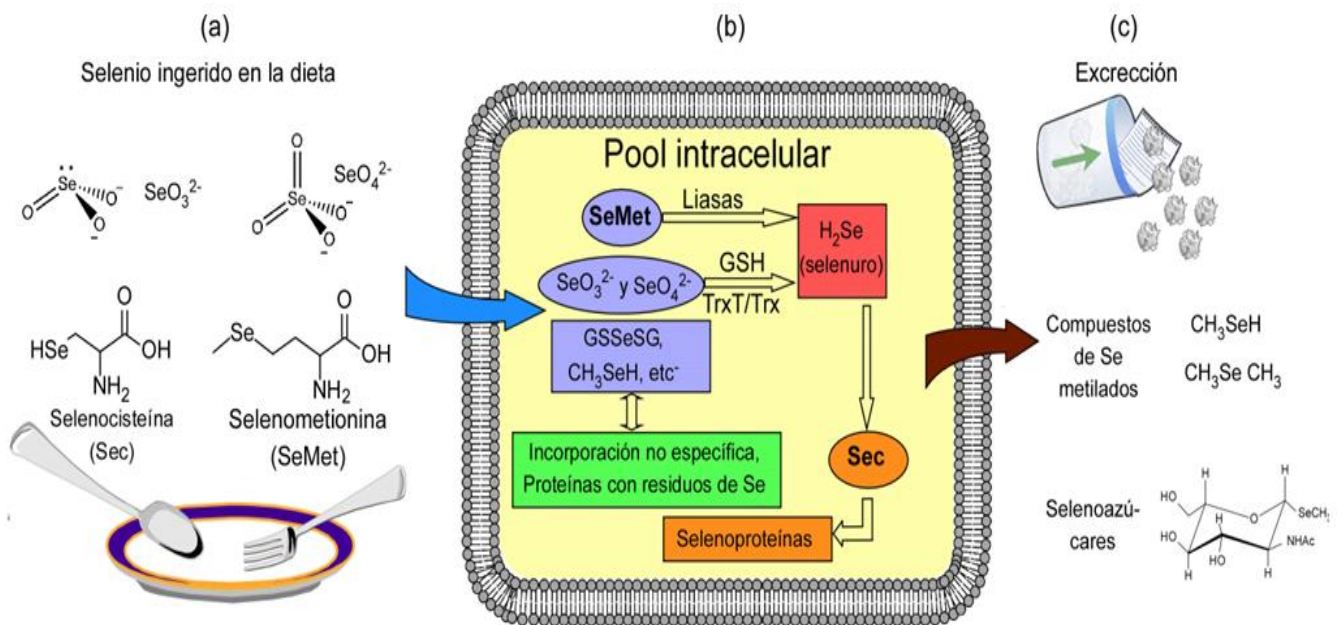
Bajo la Comisión y régimen de la Unión Europea (CE N° 1925/2006), las únicas formas de selenio inorgánico permitidas como suplementos alimentarios son el selenito de sodio, selenato de sodio y selenito de hidrógeno. Sin embargo, la SeMet es la forma de selenio que predomina en alimentos que no han sido enriquecidos (Fairweather-Tait et al., 2011). Debido a la deficiencia de selenio en muchas regiones, se consideró la suplementación a diferentes niveles para asegurar su aporte adecuado a la población. Una estrategia es la aplicación de fertilizantes enriquecidos con selenato o selenito de sodio, lo que aumenta el valor nutritivo a lo largo de la cadena alimentaria (Navarro & Cabrera, 2008).

Otra vía estratégica consiste en la ingesta de suplementos dietéticos formulados con selenio. En este contexto, la industria farmacéutica produce categorías de suplemento basado en este micronutriente: multiminerales y multivitamínicos que contienen selenio inorgánico, junto con otros micronutrientes, vitaminas y suplementos basados en la *S. cerevisiae* que poseen selenio orgánico que tienen mayor biodisponibilidad y bioaccesibilidad frente a suplementos que tienen selenio inorgánico (Navarro & Cabrera, 2008). Esta levadura, rica en proteínas, es capaz de captar selenio, el cual se añade principalmente en forma de selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). Este tipo de selenio se integra en las proteínas de la levadura, predominantemente en forma de SeMet. La levadura enriquecida con selenio no solo se utiliza como suplemento nutricional, sino que también puede reemplazar a la levadura convencional en la panificación. Es importante considerar que la biodisponibilidad del selenio proveniente de suplementos puede verse afectada por diversos factores, entre ellos la

competencia con otros micronutrientes, el consumo de ciertos fármacos, así como la dosis ingerida y el momento en que se realiza la ingesta (Dumont et al., 2006).

### 2.5. Metabolismo del selenio

En los mamíferos, la vía predominante de absorción de selenio es mediante la ingesta de vegetales, las cuales absorben este micronutriente desde el suelo en su forma inorgánica. Una vez dentro de los vegetales, el Se es transformado en compuestos orgánicos, incluyendo aminoácidos como la selenometionina (SeMet) y la selenocisteína (SeCys), además de otras sustancias metiladas de bajo peso molecular. Cabe destacar que la SeMet predomina en cultivos como cereales, legumbres y soya. Curiosamente, aunque las plantas son una fuente fundamental de Se en la dieta humana, pertenecen al único grupo eucariótico conocido que no sintetiza selenoproteínas (Cañari, 2011).



**Figura 3.** Fuentes de selenoaminoácidos y su metabolismo en mamíferos para la conversión en selenoproteínas (Cañari, 2011).

Dentro del organismo, el selenio independientemente de su forma es convertido en seleniuro ( $H_2Se$ ), el cual actúa como precursor para la síntesis de SeCys. Esta conversión puede originarse desde selenato o selenito mediante rutas de reducción que involucran sistemas como glutatión-glutarredoxina o tiorredoxina, o bien a partir de SeMet y SeCys por acción de una liasa. La incorporación de SeCys en las

selenoproteínas está mediada por un mecanismo preciso y regulado a nivel del ARNt. No obstante, también se presentan rutas inespecíficas de integración del selenio, aprovechando su semejanza química con el azufre (S), lo que le permite ingresar en rutas metabólicas similares a las del sulfuro. Cuando la SeCys se encuentra libre, puede ser utilizada por la enzima cisteil-ARNt sintetasa, formando selenocisteil-ARNtCys y siendo incorporada de manera inespecífica en sitios que originalmente correspondían a cisteína (Cys) en ciertas proteínas. Es importante señalar que esta vía alternativa suele estar limitada bajo condiciones fisiológicas normales, debido a que los niveles óptimos de selenio evitan la acumulación de SeCys libre. Finalmente, el exceso de Se en el cuerpo es eliminado principalmente a través de la orina, en forma de compuestos metilados y selenoazúcares, siendo el más abundante el 1-metilseleno-N-acetil-D-galactosamina (Cañari, 2011). La incorporación del Se en las selenoproteínas utiliza un mecanismo único que implica la recodificación del codón UGA. Este proceso requiere la presencia de fragmentos adicionales en el ARNm, como la secuencia de inserción de SeCys (Cañari, 2011). Esta propiedad permite que el selenio se incorpore de forma específica, siendo la selenocisteína considerada el aminoácido número 21 (Rayman, 2012). Asimismo, la SeMet puede incorporarse de forma inespecífica en reemplazo de la metionina durante la traducción proteica, dando origen a las selenoproteínas (Suzuki, 2005).

## **2.6. Importancia biológica del selenio**

El selenio destaca por su capacidad antioxidante y su participación en el funcionamiento adecuado del sistema inmunitario y la glándula tiroides. Asimismo, contribuye en la prevención de diversas enfermedades como el cáncer, infecciones virales, alteraciones cardiovasculares y problemas de fertilidad. Además, ejerce un efecto protector y antagonista frente a elementos tóxicos como el arsénico, mercurio, cadmio y plomo (Rayman, 2000). Este elemento encuentra en diferentes formas metabólicas, tanto orgánicas como inorgánicas, siendo las más relevantes la SeCys y la SeMet que son los selenoaminoácidos más estudiados y se encuentran en mayor porcentaje los cuales serán la base para formar las selenoproteínas. La carencia de selenio tiene un impacto negativo en la salud humana y está asociado con ciertos tipos de cáncer, la enfermedad de Keshan y alteraciones hormonales (Cañari, 2011). En el cuerpo humano, se encuentran diversas enzimas que desempeñan funciones vitales y contienen selenoproteínas en su estructura o sitio activo. Las familias de

enzimas con selenio más destacadas incluyen al Glutati3n Peroxidasa (GPx), Yodotironina Deyodinasas (ID), Tiorredoxina Reductasa (TR) y Selenoproteína P (SeIP) (Lopez et al., 2011). Dichas funciones incluyen la inhibici3n de la generaci3n de especies reactivas de ox3geno, cuya presencia induce a la oxidaci3n celular. En consecuencia, su correcta actividad en el organismo desempeña un rol importante en la prevenci3n de enfermedades como el c3ncer (Steinbrenner & Sies, 2013).

### **2.7. *Sacharomyces cerevisiae***

Existen alrededor de 2,000 subtipos registrados cient3ficamente. Esta amplia diversidad incluye variaciones adaptadas para diferentes aplicaciones industriales y de investigaci3n y clasifican bas3ndose en caracter3sticas morfol3gicas y fisiol3gicas. Entre los aspectos considerados, se encuentran el tamaño y las formas de las c3lulas. Esta levadura tiene importancia a nivel industrial porque sirve para la elaboraci3n de vino, cerveza y el pan. Este microorganismo obtiene su energ3a de manera aer3bica por respiraci3n celular, inclusive tiene la peculiaridad de metabolizar gl3cidos en las condiciones mencionadas y obteniendo como productos el etanol y di3xido de carbono a este proceso se le llama efecto Crabtree (Vieira et al., 2013) o por v3a anaer3bica mediante la fermentaci3n, tambi3n es considerado beneficioso porque tiene capacidad de colonizar el tracto digestivo y actuar como probi3tico frente a bacterias pat3genas (Bouza & Muñoz, 2004). Adem3s, tiene dos mecanismos de reproducci3n, la primera es de forma asexual mediante la gemaci3n y la segunda es sexualmente por medio de estructuras nombradas ascas, que pueden sujetar hasta ocho esporas que al fusionarse generan un nuevo individuo (Ferrer, 2009) . Para que exista un aumento en el n3mero de levaduras debe realizar una etapa de adaptaci3n 3ptima en el medio de cultivo y este debe proporcionarle condiciones f3sicas, qu3micas y nutritivas 3ptimas para su multiplicaci3n, las levaduras tienen la tendencia de reproducirse muy r3pido en tiempos cortos siempre y cuando las condiciones est3n bien controladas y proporcionadas, adem3s permite potenciar investigaciones como la producci3n de biomasa, etanol y CO<sub>2</sub>. (Altamirano, 2013). *S. cerevisiae* tiene la capacidad de sintetizar prote3nas como parte de su fisiolog3a, estas poseen relevancia nutricional y funcional porque ejercen como potenciador de sabor, agente espesante, p3ptido reductor de harinas, como glutati3n peroxidasa (Alp3zar, 2010). Actualmente la industria produce cepas comerciales de *S. cerevisiae* a partir de cultivos puros optimizando sus rasgos mediante investigaci3n y estudiando el mercado de destino,

algunas cepas son para panificación y otras para la producción de etanol, las formas más comunes que expenden son la deshidratada o instantánea, prensada y líquida (Callejo, 2002).

## **2.8. Biotransformación del selenio por microorganismos**

En el entorno natural hay microorganismos con capacidad de asimilar y biotransformar el selenio inorgánico a formas orgánicas. En ciertas ocasiones, este mecanismo opera como defensa frente a la toxicidad de los oxoaniones de selenio ( $SeO_3^{2-}$  y  $SeO_4^{2-}$ ). Por ejemplo, algunas bacterias como la *Anaeromyxobacter dehalogenans* pueden biotransformar el Se (IV), altamente nocivo para ellas, a una especie inocua Se (0) (He & Yao, 2010). En la actualidad la industria de nutraceuticos se usa con mucha frecuencia las bacterias del género *Lactobacillus* y levaduras como la *Sacharomyces cerevisiae* para hacer el proceso de selenización y vender suplementos a base de proteínas con selenio (Otero et al., 2008).

### **2.8.1. Biotransformación del selenio por bacterias**

Las bacterias tienen la maquinaria para biotransformar tipos de selenio inorgánico a formas orgánicas como respuesta a la detoxificación del medio como es el caso de *Pseudomonas fluorescens* K27 reduciendo el Se (IV) y Se (VI) a Se (0) y en algunos casos a Se(-II) por biometilación generando especies como dimetilseleniuro (DMSe), dimetildiselenio (DMDSe) (Hapuarachchi et al., 2004). Ciertas especies del género *Lactobacillus* evidenciaron su capacidad para convertir selenito en formas orgánicas. Estas bacterias Gram positivas son conocidas por sus beneficios para la salud, las cuales incluyen la prevención de tumores y eficiencia del sistema inmunológico (Yazdi et al., 2013). Por tanto, se investigó la mezcla de estas bacterias con selenio para obtener un mayor beneficio para la salud. En este sentido, se ha observado que la fermentación de *Lactobacillus bulgaricus* durante la producción de yogur enriquecido con Se (IV) resultó en la producción de SeCys, SeMet (Alzate et al., 2008).

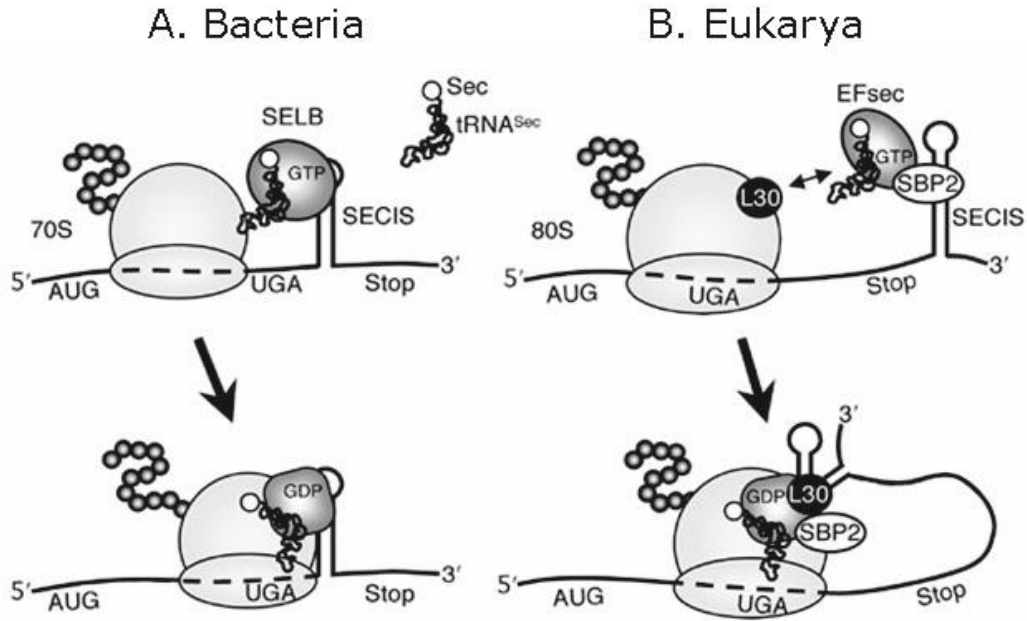
### **2.8.2. Biotransformación del selenio por levaduras**

La levadura más estudiada en el proceso de selenización es *Saccharomyces cerevisiae*, algunas cepas cultivadas en ambientes con bajo contenido de azufre pueden incorporar selenio en su biomasa mediante un régimen de suplementación con selenio, según investigaciones algunos subtipos pueden tolerar medianas y altas concentraciones de selenio inhibiendo su efecto tóxico, pudiendo obtener una biomasa resultante que acumule 1000 µg/g principalmente en forma de

selenometionina, selenodiglutatión y selenocisteína, proporcionando una fuente de selenio adecuada para satisfacer las necesidades nutricionales de animales y humanos (Otero et al., 2008).

Estudios similares reportan que *Saccharomyces cerevisiae* tiene la capacidad de incorporar y tolerar concentraciones elevadas de selenio, hasta 3000 µg Se/g, biotransformando selenio inorgánico en selenoaminoácidos como la selenocisteína y selenometionina. El selenio se incorpora a las proteínas de *S. cerevisiae* o se asocia físicamente a otras macromoléculas, para conformar de manera estructural la pared celular. Aunque la levadura selenizada tiene propiedades nutricionales importantes, la identificación de otras especies de selenio presentes en ella, además de la SeCys y SeMet, ha generado mucho interés. Sin embargo, debido a la alta concentración de selenio y a las variaciones en los métodos de extracción y en los lotes o marcas de la levadura selenizada, la determinación de estas especies es complicada y los resultados pueden variar significativamente. Además, se detectaron mínimas cantidades de SeMet y SeCys, que originan a la metilselenol, que es considerada un compuesto anticancerígeno (Rayman, 2004). El descubrimiento de las selenoproteínas ha revolucionado el entendimiento sobre los aminoácidos considerando a la SeCys aminoácido número 21 a consecuencia de la incorporación del selenio a células capacitadas como las levaduras o bacterias (Figura 4). La SeCys se incorpora al polipéptido en crecimiento en la traducción ribosomal, pero a diferencia de los 20 aminoácidos estándar, la SeCys es codificada por el triplete o codón UGA, que generalmente señala la terminación de la síntesis de la cadena polipeptídica. Este codón UGA se reprograma para codificar SeCys mediante un elemento de inserción de SeCys presente únicamente en los ARNm de las selenoproteínas (Salinas, 2010). Kieliszek et al., (2015), mencionan que el metabolismo del selenio en las levaduras se basa en cambios químicos que resultan en la disminución del estado de oxidación y la formación de seleniuro de hidrógeno. Este intermediario metabólico puede participar en la biosíntesis de proteínas o transformarse en derivados metilados que posteriormente son excretados del organismo. Asimismo, se evidenció que el selenio elemental se acumula dentro de estructuras celulares de la levadura. En relación a esto, (Cupp-Sutton & Ashby, 2016) mencionan que el selenito Se (IV), como fuente de selenio inorgánico, debe reducirse a Se (-II) para incorporarse en aminoácidos.

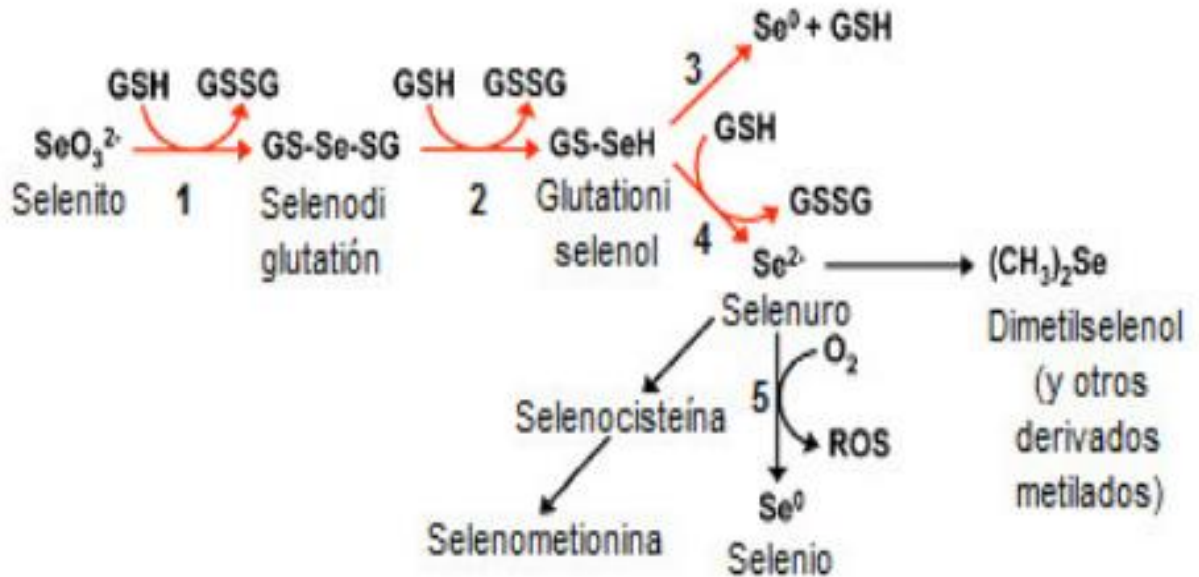
Este proceso implica reducciones bioquímicas multielectrónicas de 6 electrones que generalmente requieren intermediarios inestables.



**Figura 4.** Incorporación de selenocisteína a la síntesis proteica. A. En bacterias. B. En eucariotas (Caban & Copeland, 2006).

Cuando *S. cerevisiae* es expuesta a altas concentraciones de selenito, el efecto pasa de ser beneficioso a tóxico. El principal problema radica en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como subproducto del metabolismo del selenio. Estas ROS, entre ellas el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el anión superóxido ( $O_2^-$ ), provocan un desequilibrio redox intracelular que lleva a daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Pinel et al., 2013). A nivel estructural, las mitocondrias son de los primeros organelos afectados. El estrés oxidativo mitocondrial puede comprometer la producción de ATP, alterar la dinámica mitocondrial y activar vías de muerte celular como la apoptosis. Estudios han mostrado que concentraciones elevadas de selenito interfieren con la función de la cadena de transporte de electrones, reduciendo la viabilidad celular y provocando una disminución significativa en el crecimiento poblacional de la levadura (Spallholz et al., 2004). Por otro lado, el núcleo también se ve comprometido. El exceso de ROS puede inducir daño en el ADN y afectar la integridad del ciclo celular. Se ha observado que *S. cerevisiae* en medios

con altas dosis de selenito presenta fragmentación del ADN, activación de genes relacionados con la reparación del daño genético y detención del ciclo en fase G1 o G2 como mecanismo de defensa (Pinel et al., 2013).



**Figura 5.** Rutas metabólicas de reducción del selenio y su transformación en compuestos orgánicos. Fuente: (Herrero & Wellinger, 2015).

Lindemann et al., (2000) reportaron que el selenito y el glutatión (GSH) reaccionan de manera espontánea, dando lugar inicialmente al selenodiglución. Cuando hay un exceso de glutatión, el selenito puede ser reducido a glutationiselenol (GS-SeH). Esta molécula intermedia puede descomponerse de manera espontánea, liberando selenio elemental  $\text{Se} (0)$  y generando GSH, opcionalmente puede ser reducida por GSH para formar seleniuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{Se}$ ), el cual en presencia de oxígeno se oxida nuevamente a  $\text{Se} (0)$ . La Figura 5 representa las reacciones no enzimáticas involucradas en la conversión de glutatión reducido (GSH) a su forma oxidada (GSSG), específicamente en las etapas señaladas como las reacciones 1 a 4. Por otro lado, la reacción 5, tampoco posee intervención enzimática, sin embargo, conduce a la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS).

### 2.9. Levadura selenizada

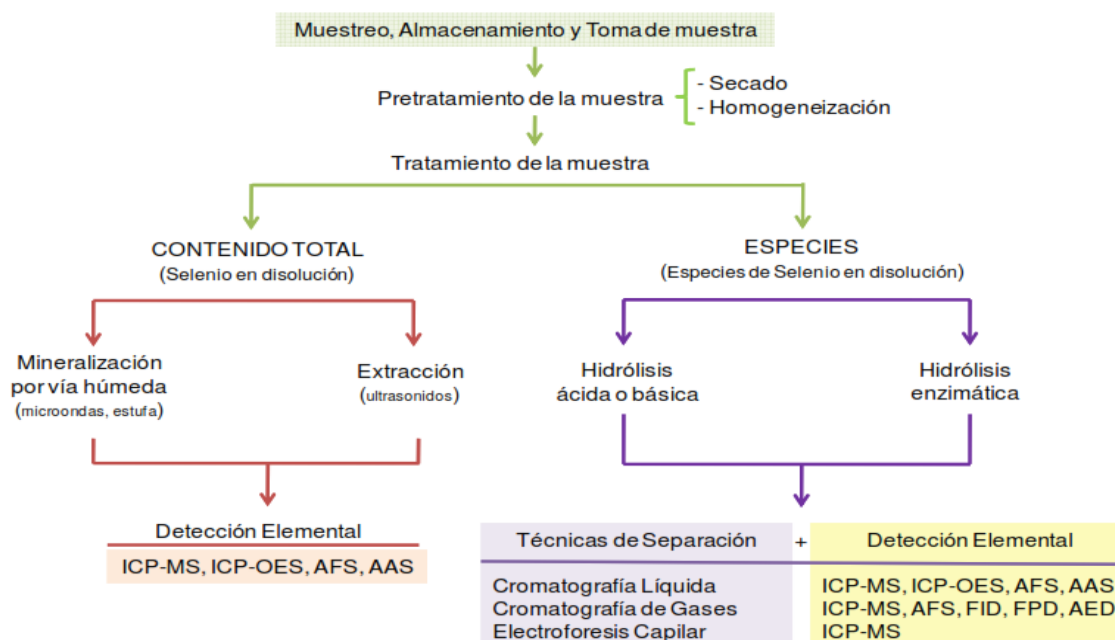
Años atrás se añadía selenio en forma inorgánica a los alimentos para animales y a la dieta en humanos para abordar deficiencias de selenio. Aunque el selenito podía remediar la deficiencia primaria su biodisponibilidad y bioaccesibilidad eran muy

deficientes, el selenio orgánico presente en alimentos como cereales y suplementos se metaboliza con mayor eficiencia. Recientemente, las levaduras se han utilizado como una fuente de selenio orgánico en aditivos alimentarios, debido a que el selenio natural que contienen es fácilmente absorbido tanto por animales como por humanos (Rayman, 2012). Numerosos estudios han evaluado el uso de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida con selenio como fuente biodisponible de este micronutriente, destacando su potencial en la prevención de enfermedades y su actividad anticancerígena (Burbano et al., 2002), (Wood et al., 2000). El protocolo de producción de levadura selenizada implica el cultivo de *S. cerevisiae* en un medio nutricional suplementado con selenito de sodio principalmente. Durante la fase de crecimiento las levaduras incorporan el selenito a moléculas proteicas lo que confiere una alta biodisponibilidad de este elemento (Rayman, 2004); (Ruiz et al., 2003). El procedimiento para la obtención de levadura selenizada requiere un protocolo riguroso y estandarizado, donde el monitoreo de parámetros garantiza la reproducibilidad del producto final y la conservación de propiedades funcionales. Las empresas especializadas en la producción de este suplemento logran que más del 90% del selenio esté unido orgánicamente a la levadura, y se estima que más del 80% de este selenio está unido a proteínas. Sin embargo, cuando otros laboratorios sin la misma experiencia llevan a cabo el enriquecimiento, pueden obtener levaduras con alto porcentaje de selenio inorgánico residual, generando mezcla que baja la calidad de la producción (Rayman et al., 2008). Al respecto Pedrero & Madrid, (2009) señalan que la caracterización y cuantificación de las formas de selenio en el medio intracelular continúa siendo un reto. Estudios demuestran la eficiencia de *S. cerevisiae* para convertir selenio inorgánico en especies organoseleniadas está directamente correlacionada con parámetros fisiológicos de cultivo, no obstante, para hacer la identificación del tipo de selenio y lograr su cuantificación es aún muy tedioso por los procesos sofisticados. Mapelli et al., (2011) señalan que la producción de levadura enriquecida con selenio se considera la forma más común de generar suplementos alimentarios. Sin embargo, es necesario optimizar este proceso biológico para evitar el efecto tóxico que la administración descontrolada de selenio puede tener durante el cultivo de la levadura. Por otro lado, Mapelli et al., (2012) ostentan que el bioproceso selenio-levadura es muy usado para la elaboración de suplementos enriquecidos, sin embargo, el procedimiento debe ser optimizado y

controlado ya que la dosificación de concentraciones altas de selenio puede causar efecto toxico en el crecimiento en el cultivo de la levadura.

## 2.10. Cuantificación y especiación del selenio

La IUPAC define que las especies químicas son las diferentes formas o compuestos moleculares que puede presentar un elemento, mientras que la especiación se refiere específicamente a la distribución cuantitativa de especies en una matriz determinada (Templeton et al., 2000). Para la determinación de muestras que contienen selenio se sigue una secuencia ordenada, las etapas preanalíticas son esenciales (muestreo, almacenamiento, preparación), porque factores como la temperatura, pH, luz y actividad microbiana pueden alterar la concentración y especiación mediante procesos de volatilización, adsorción, precipitación o transformación redox. Además, las concentraciones bajas de metales presentes en trazas en la muestra pueden generar errores significativos. Por lo tanto, se recomienda minimizar al máximo la manipulación de la muestra (Lindemann et al., 2000) .



**Figura 6.** Fases analíticas para cuantificar el selenio total y sus diferentes especies.(Sánchez, 2014).

En la figura 6 se presenta un diagrama que ilustra las diversas fases que pueden llevarse a cabo para cuantificar cantidad total de selenio intracelular como la especiación de las diferentes formas en las que se encuentra. Este proceso es el

enfoque principal en las investigaciones relacionadas con la levadura selenizada (Sánchez, 2014).

### **2.10.1. Determinación de selenio total intracelular**

Los métodos analíticos convencionales para determinar elementos totales dentro de un organismo requieren la eliminación previa de componentes de la matriz. Entre los procedimientos más utilizados destaca la digestión ácida, que utiliza combinaciones de ácidos minerales ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ácidos complejantes (HCl) y con oxidantes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para descomponer la muestra. Esta etapa se optimiza mediante la aplicación de energía térmica, ya sea por sistemas convencionales (placas cas de calentamiento) o sometidos por radiación de microondas (Cabañero et al., 2005).

La digestión por microondas constituye el método de elección en análisis debido a sus ventajas operativas: mayor eficiencia energética, reducción significativa en el consumo de reactivos (principio GREEN) y tiempos de procesamiento menores. La selección del sistema de digestión abierto o cerrado depende críticamente de la volatilidad del analito; para elementos termolábiles (As, Se, Hg), los sistemas cerrados son indispensables ya que previene pérdidas por volatilización mientras permiten alcanzar condiciones termodinámicamente más extremas (80 bar y  $300^\circ\text{C}$ ), optimizando la descomposición de matrices complejas. Alternativamente, para análisis donde la integridad de las especies químicas es prioritaria, pueden emplearse metodologías de extracción asistida con disolventes orgánicos que permiten la liberación selectiva del analito sin degradación molecular significativa. Por ejemplo, se puede aplicar el uso de microondas con ácidos diluidos para procesos de extracción con este propósito. El empleo de la energía ultrasónica mejora significativamente la extracción de metales de matrices sólidas al inducir fenómenos de cavitación que promueven la ruptura de la estructura matricial. Los sistemas más utilizados incluyen sondas de ultrasonidos de alta potencia y baños ultrasónicos de frecuencia controlada. Estas técnicas fueron validadas para la extracción eficiente de especies de selenio en tejido animal, particularmente en muestras avícolas demostrando alta reproducibilidad analítica (Cabañero et al., 2005), tejidos en plantas (Peñas et al., 2012) o levadura selenizada (Ruiz et al., 2003).

### **2.11. Espectroscopía de emisión atómica ICP-OES**

La Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) representa una técnica analítica multielemental que permite cuantificar

elementos traza (desde porcentajes hasta niveles de ppb), excluyendo principalmente halógenos, gases nobles y ciertas tierras raras. El método implica: (1) nebulización de la muestra líquida, (2) excitación atómica en plasma de argón (7000–10000 K), y (3) detección de emisiones características mediante un sistema óptico de alta resolución (policromador con detectores CCD). Su versatilidad abarca el análisis de diversas matrices (catalizadores, alimentos, aguas, muestras geológicas y biológicas), requiriendo pretratamiento mediante digestión ácida asistida por microondas ( $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ ) o fusión alcalina para matrices complejas. La técnica destaca por su amplio rango dinámico (hasta 6 órdenes de magnitud), límites de detección en el orden de  $\mu\text{g/L}$  y  $\mu\text{g/kg}$ , y capacidad para analizar muestras con alta carga matricial. (Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, 2019)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación del lugar de estudio

La investigación se desarrolló en los Laboratorios de Biología Celular y Molecular y el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ubicación geográfica (UTM): Longitud: 634788,67, latitud: 8603575,11, altitud (m.s.n.m): 2791.

Asimismo, para determinación de selenio intracelular total se contrató el servicio del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad - Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica Santa María en la ciudad de Arequipa. Ubicación geográfica (UTM): Longitud: 227096,30, latitud: 8192661,16 altitud (m.s.n.m): 2335.

#### 3.2. Tamaño de muestra

Estuvo constituido por 73 tubos Falcon que contuvieron 45 mL de YEPD inoculados con 5 mL de *Saccharomyces cerevisiae* en fase de crecimiento exponencial distribuidos en cuatro tratamientos con concentraciones de selenito de sodio de 0, 5, 7 y 9 mg/L (Tabla 3). Para el análisis del crecimiento celular (UFC/mL), se usaron 16 muestras con YEPD por tratamiento, totalizando 64 unidades experimentales. Para la determinación de biomasa y selenio intracelular, se asignaron 3 tubos con YEPD por tratamiento con excepción al tratamiento con 0 mg/L, sumando 9 unidades los cuales se obtuvieron del bloque 4h, 16h y 28h respectivamente. Además, el experimento se realizó por triplicado con el fin de disminuir el sesgo experimental y asegurar la confiabilidad de los resultados.

#### 3.3. Tipo y diseño de investigación

Tipo de investigación experimental con un diseño de bloques completamente al azar (DBCA). El objetivo fue obtener biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio (5, 7, y 9 mg/L) y un grupo control de 0 mg/L respectivamente, los tiempos de evaluación fueron 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 64, y 72 h. La hipótesis planteada indica que la menor concentración de selenito de sodio es la más óptima para obtener biomasa

selenizada de *S. cerevisiae*. Se diseñó el experimento en bloques con base en los tiempos de medición para determinar el selenio total intracelular, biomasa producida y el recuento de UFC/mL. Cada bloque estuvo conformado por cuatro tratamientos los cuales se asignaron aleatoriamente para reducir cualquier sesgo y asegurar las diferencias producidas por cada tratamiento. Las repeticiones por tratamiento en cada bloque disminuyeron el error experimental. Gracias a esta metodología, se pudo determinar de manera clara la concentración óptima para maximizar la producción de biomasa selenizada a lo largo de las distintas etapas de crecimiento.

### 3.4. Metodología y recolección de datos

#### 3.4.1. Preparación medio YEPD y distribución en tubos Falcon

Se preparó 3,285 mL de medio YEPD en polvo, disolviendo 50g del medio en 1000mL de H<sub>2</sub>O destilada como indica las especificaciones del fabricante, posteriormente se dispuso el medio dentro de la cámara de flujo laminar para distribuirlo a los 73 tubos Falcon como indica la Tabla 3.

**Tabla 2. Composición del medio líquido YEPD**

Componente	YEPD líquido
Azufre mg/L	21,50 ± 0,10
Carbono g/L	10,44 ± 0,20
Fósforo g/L	0,22 ± 0,01
Nitrógeno g/L	3,27 ± 0,15

Fuente: Kieliszek et al. (2016)

**Tabla 3. Distribución de volúmenes de YEPD para cada tratamiento**

Concentración de Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Volumen de YEPD	Volumen de inóculo	Tubos para recuento	Tubos para la biomasa	Total de tubos
0 mg/L	45 mL	5 mL	16	-	16
5 mg/L	45 mL	5 mL	16	3	19
7 mg/L	45 mL	5 mL	16	3	19
9 mg/L	45 mL	5 mL	16	3	19
		total			73

#### **3.4.2. Preparación de la solución de selenito de sodio**

- Se pesó 1g de selenito de sodio y se disolvió en un matraz que contenía 1L de H<sub>2</sub>O destilada para obtener la solución madre a una concentración de 1000 mg/L selenito de sodio.
- Se realizó cálculos utilizando la fórmula  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$  para obtener las concentraciones adecuadas (250 µL para 5 mg/L, 350 µL para 7 mg/L, 450 µL para 9 mg/L) para su posterior inoculación en los tubos Falcon.
- Finalmente, se almacenó a 4 °C, protegidas de la luz hasta su uso.

#### **3.4.3. Preparación del inóculo**

- Se pesó 0,0814g *Saccharomyces cerevisiae* comercial seca de la marca INSTANT SUCCESS-LESAFFREE®, posteriormente la masa se añadió a 370 mL de YEPD estéril dentro de un matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- Seguidamente el matraz fue colocado en baño maría a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos para activar la levadura, se mezcló el YEPD con la levadura haciendo movimientos circulares.
- Finalmente se colocó en un rotador acondicionado a 30°C a (2147 xg) durante 24 h para obtener el inóculo.

#### **3.4.4. Adición del inóculo y selenito de sodio**

- Se trabajó en la cabina de flujo laminar, seguidamente se adicionó 5 mL de inóculo cultivo de 24 h de *S. cerevisiae* a los 73 tubos Falcon que tuvieron 45 mL con YEPD como muestra la Tabla 3, los 64 tubos sirvieron para hacer el recuento de colonias y 9 tubos para la cuantificación de la biomasa y selenio total intracelular.
- Después de inocular, se colocó los tubos en un soporte acondicionado y puestos en un agitador a 30°C a (2147 xg), luego de transcurrir 5 h de crecimiento, se adicionaron volúmenes de selenito de sodio a los tubos experimentales con el propósito de tener concentraciones de 0, 5, 7 y 9 mg/L.
- Se prolongó la agitación de todos los tubos a 30°C y (2147 xg) hasta consumir 72 h de cultivo. Se realizó 3 repeticiones.

#### **3.4.5. Recuento de colonias de *Saccharomyces cerevisiae***

- Después de 4 horas se retiró 7 tubos falcon, 4 sirvieron para realizar el recuento de UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* de las concentraciones (0, 5, 7 y 9 mg/L) y 3 fueron para determinar la biomasa de las concentraciones (5, 7 y 9 mg/L) respectivamente. Este procedimiento se repitió hasta cumplir las 72 horas.

- En la cámara de flujo laminar con una micropipeta se retiró 1 mL de cada tubo y se llevó a la dilución  $10^{10}$  empleando  $H_2O$  destilada estéril.
- Se inoculó 1 mL de la última dilución a 3 placas de petri para cada concentración y se empleó la técnica por incorporación en agar Saboraud, seguidamente se incubó las placas de petri a  $30^{\circ}C$  x 24 h.
- Este procedimiento se repitió cada 4 h hasta cumplir las 56 h y luego cada 8 h hasta completar las 72 h, no obstante, sólo en los tiempos 4,16 y 28 se retiraron 7 tubos y en los restantes sólo 4.
- Después de 24 h de incubación a  $30^{\circ}C$  se procedió a realizar el recuento de las UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* para cada concentración de selenito de sodio empleando un contacolonias y un marcador indeleble.

#### **3.4.6. Recuperación de la biomasa**

- Se retiró los tubos refrigerados a  $2^{\circ}C$  de los tiempos 4,16 y 28 h respectivamente. En la cámara de flujo laminar se dejó reposar por 30 min a temperatura de ambiente para su sedimentación.
- Se decantó el sobrenadante y se agregó volúmenes de  $H_2O$  destilada estéril para hacer el lavado de los residuos del medio de cultivo.
- Seguidamente se mezcló la biomasa con  $H_2O$  destilada estéril, se decantó a tubos de 6 mL para ser centrifugados a ( $2147 \times g$ ) por 5 minutos, de igual manera se decantó el sobrenadante para obtener la biomasa.
- Se tapó los tubos herméticamente y se pesó la biomasa empleando una balanza de precisión.
- Posteriormente los 27 tubos con la biomasa recuperada fueron refrigerados a  $2^{\circ}C$  para su posterior análisis.

#### **3.4.7. Protocolo para la curva de calibración**

Se construyó una curva de calibración utilizando el equipo Optima 8000 (PERKIN ELMER®, EE. UU), operando a una longitud de onda de 196,0 nm. Se prepararon cinco soluciones estándar de Selenio con concentraciones de 0,00 (blanco), 0,5, 1,0, 2,0 y 5,0 mg/L, a raíz de un patrón de 1000 mg/L. Todas las diluciones se realizaron utilizando la misma matriz ácida empleada en la digestión de muestras (mezcla de  $HNO_3$  y  $H_2O_2$ ). El blanco de calibración (Calib Blank 1), correspondiente a una solución sin analito, fue analizado en duplicado. Las intensidades corregidas obtenidas fueron de -64,3 y -69,5, con una media de -66,9, una desviación estándar

de 3,66 y un %RSD de 5,48%, lo cual se consideró aceptable para establecer la línea base del análisis. A continuación, se aspiraron las soluciones estándar en orden creciente de concentración. Se realizaron dos lecturas por cada estándar, asegurando enjuagues con diluyente entre cada medición. Las intensidades netas y corregidas fueron registradas automáticamente por el software del equipo (WinLab32). Se construyó la curva de calibración ingresando las concentraciones conocidas frente a las intensidades corregidas correspondientes. El software generó la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ), el cual fue superior a 0,995, indicando una excelente linealidad.

#### **3.4.8. Determinación de selenio total intracelular**

El análisis se realizó utilizando un Espectroscopio de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Óptico (ICP-OES), modelo Optima 8000 (PERKIN ELMER®, EE. UU). Se pesaron 0,5 g de muestra y se sometieron a digestión ácida en un vaso de precipitado con 5 mL de  $\text{HNO}_3$  (ácido nítrico), manteniéndose en reposo a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, la mezcla se calentó a 70 °C en una placa calefactora durante 10 min. Tras enfriar, se adicionaron 5 mL de  $\text{HNO}_3$  y 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , repitiendo el calentamiento a 70 °C por 60 min. El proceso se repitió una vez más bajo las mismas condiciones (adición de 5 mL de  $\text{HNO}_3$  y 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , seguido de calentamiento a 70 °C durante 60 min). Finalmente, la solución digestada se enfrió, se filtró y se aforó a 25 mL en un matraz volumétrico. La cuantificación del analito se realizó mediante espectrometría, previa construcción de una curva de calibración, expresando los resultados en mg/Kg.

#### **3.5. Análisis estadístico**

El análisis estadístico correspondió a un diseño en bloque completo al azar concordante con el diseño de investigación, donde los niveles de selenio de sodio desempeñan la función de tratamientos: 0, 5, 7 y 9 mg/L, el bloque corresponde al recuento de colonias cada cuatro horas hasta las 48 horas (0, 4, 8, ..., 56) y cada 8 horas hasta completar las 72 horas y la variable dependiente o respuesta es el análisis de selenio total incorporado a nivel intracelular en la biomasa en sus diferentes etapas de la experimentación. Se aplicó el Análisis de Varianza, pruebas Post hoc de Tukey y Dunnett empleando el software SPSS Statistics versión 27 para determinar la existencia de diferencias significativas en la producción de UFC/mL, biomasa y selenio total intracelular, para lo cual se empleó diferentes concentraciones de

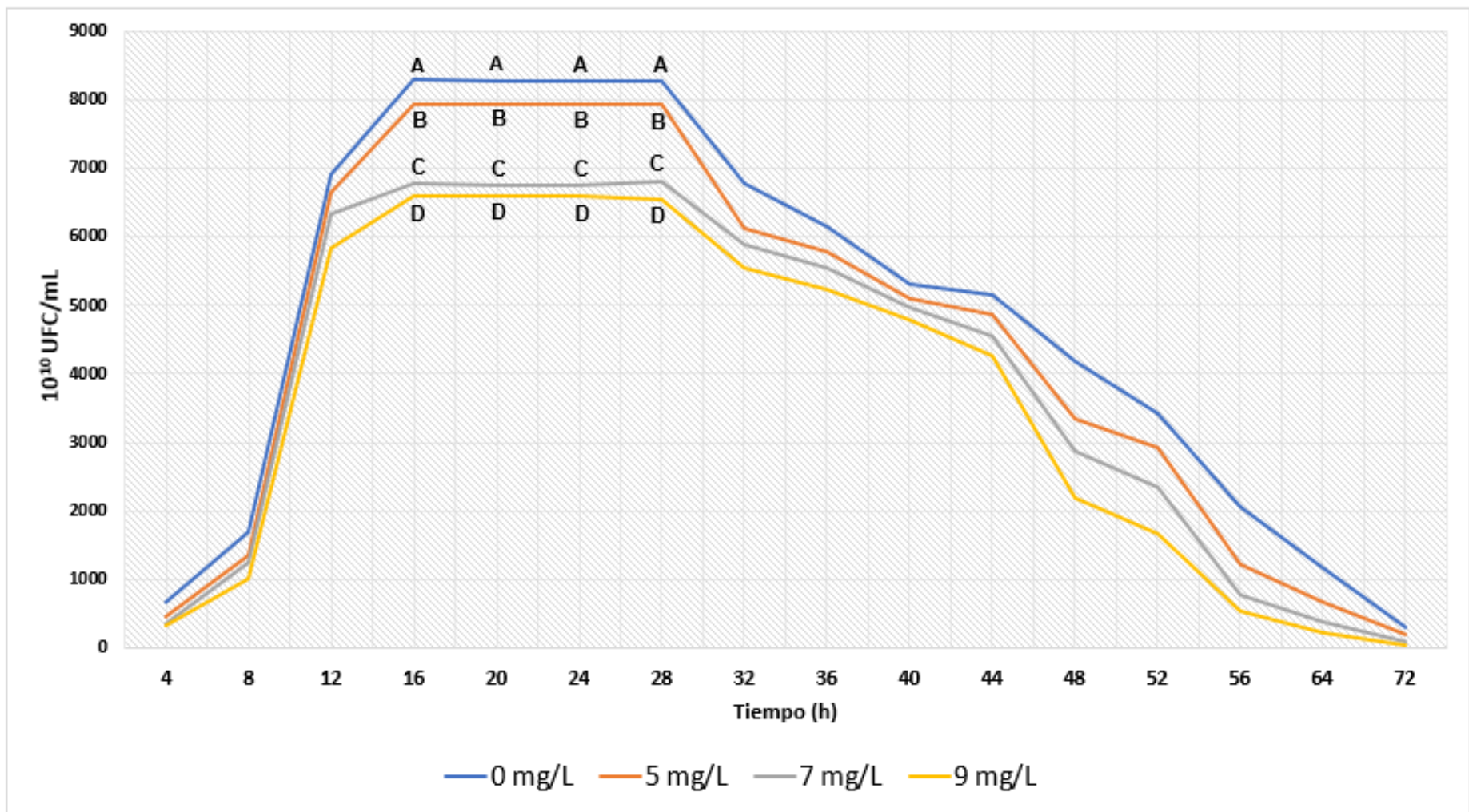
Selenito de sodio, además las pruebas sirvieron para identificar la concentración óptima en la producción de biomasa selenizada en diferentes tiempos.

## **IV. RESULTADOS**

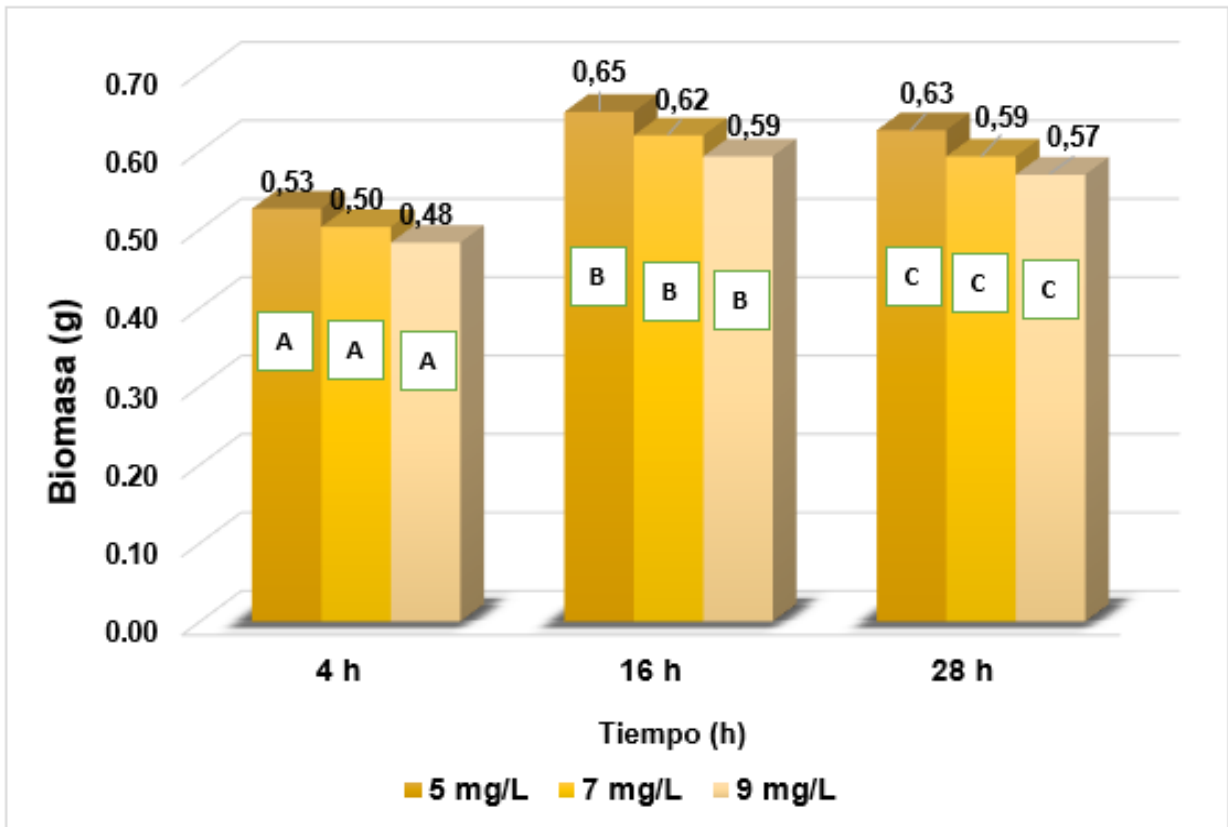
**Tabla 4.** Recuento total de UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentraciones de selenito de sodio en 72 h (promedio).

<b>Horas (h)</b>	<b>0 mg/L PT</b>	<b>5 mg/L PT</b>	<b>7 mg/L PT</b>	<b>9 mg/L PT</b>
<b>4</b>	66x10 <sup>11</sup>	46x10 <sup>11</sup>	35x10 <sup>11</sup>	32x10 <sup>11</sup>
<b>8</b>	17x10 <sup>12</sup>	14x10 <sup>12</sup>	13x10 <sup>12</sup>	10x10 <sup>12</sup>
<b>12</b>	69x10 <sup>12</sup>	67x10 <sup>12</sup>	63x10 <sup>12</sup>	58x10 <sup>12</sup>
<b>16</b>	83x10 <sup>12</sup>	79x10 <sup>12</sup>	67x10 <sup>12</sup>	66x10 <sup>12</sup>
<b>20</b>	83x10 <sup>12</sup>	80x10 <sup>12</sup>	67x10 <sup>12</sup>	66x10 <sup>12</sup>
<b>24</b>	83x10 <sup>12</sup>	79x10 <sup>12</sup>	67x10 <sup>12</sup>	66x10 <sup>12</sup>
<b>28</b>	83x10 <sup>12</sup>	79x10 <sup>12</sup>	67x10 <sup>12</sup>	66x10 <sup>12</sup>
<b>32</b>	68x10 <sup>12</sup>	61x10 <sup>12</sup>	59x10 <sup>12</sup>	55x10 <sup>12</sup>
<b>36</b>	61x10 <sup>12</sup>	58x10 <sup>12</sup>	55x10 <sup>12</sup>	52x10 <sup>12</sup>
<b>40</b>	53x10 <sup>12</sup>	51x10 <sup>12</sup>	50x10 <sup>12</sup>	48x10 <sup>12</sup>
<b>44</b>	52x10 <sup>12</sup>	49x10 <sup>12</sup>	46x10 <sup>12</sup>	43x10 <sup>12</sup>
<b>48</b>	42x10 <sup>12</sup>	33x10 <sup>12</sup>	29x10 <sup>12</sup>	22x10 <sup>12</sup>
<b>52</b>	34x10 <sup>12</sup>	29x10 <sup>12</sup>	24x10 <sup>12</sup>	17x10 <sup>12</sup>
<b>56</b>	21x10 <sup>12</sup>	12x10 <sup>12</sup>	76x10 <sup>11</sup>	54x10 <sup>11</sup>
<b>64</b>	12x10 <sup>12</sup>	68x10 <sup>11</sup>	37x10 <sup>11</sup>	22x10 <sup>11</sup>
<b>72</b>	30x10 <sup>11</sup>	19x10 <sup>11</sup>	11x10 <sup>11</sup>	40x10 <sup>10</sup>

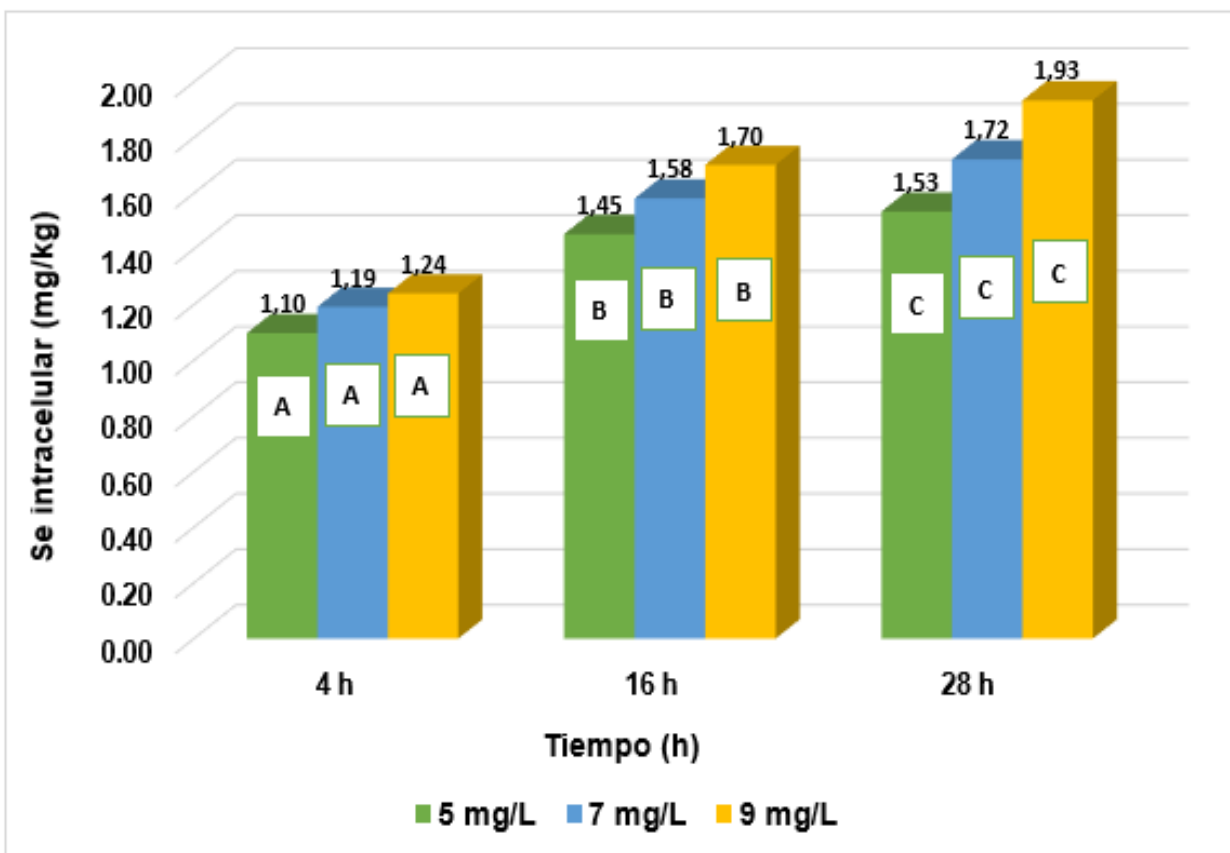
PT: Promedio total.



**Figura 7.** Efecto del selenito de sodio en el crecimiento de *Sacharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESAFFREE® (promedio).



**Figura 8.** Biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio (promedio).



**Figura 9.** Cuantificación del Selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® (promedio).

## V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian que *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS – LESAFFREE® posee la capacidad de producir biomasa selenizada. La levadura tolera y transforma selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) en especies orgánicas bioactivas, principalmente selenoaminoácidos, los cuales tienen un alto valor biológico y funcional (Rayman, 2004; Suzuki, 2005; Rodríguez, 2019).

La Tabla 4 resume el recuento promedio de UFC/mL a lo largo de 72 horas, constituye la base numérica para construir la Figura 7. Las curvas de crecimiento obtenidas permiten identificar el efecto de 5, 7 y 9 mg/L de selenito y un grupo control (0mg/L) mediante tres fases clásicas del crecimiento microbiano: fase exponencial (4–16 h), fase estacionaria (16–28 h) y fase muerte celular (28–72 h). El análisis comparativo entre tratamientos revela que la concentración de 5 mg/L mostró una curva de crecimiento muy próxima a la del control, evidenciando una alta viabilidad celular y una adaptación efectiva al estrés inducido por el selenito. Ambas condiciones (control y 5 mg/L) alcanzaron un máximo de crecimiento entre las 16 y 28 horas, con recuentos de UFC/mL superiores a los observados en las concentraciones de 7 y 9 mg/L, donde se evidenció un efecto más marcado de inhibición celular. La aplicación del análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del  $p < 0,05$ , complementado con pruebas post hoc de Tukey y Dunnett, confirmó diferencias significativas en la producción de UFC/mL entre las concentraciones evaluadas. Estos resultados respaldan que el tratamiento con 5 mg/L de selenito de sodio constituye la dosis óptima entre las concentraciones empleadas, al promover un crecimiento celular próximo al control y evitar la toxicidad observada a mayores concentraciones. Finalmente, el uso del recuento de UFC/mL como indicador de viabilidad permitió una discriminación precisa de células metabólicamente activas, lo que fortalece la interpretación de la curva de crecimiento observada en la Figura 7. La marcada disminución a partir de las 28 h en todos los

tratamientos, especialmente en 7 y 9 mg/L, sugiere una progresiva pérdida de viabilidad celular, atribuida al agotamiento de nutrientes, la acumulación de productos tóxicos derivados del metabolismo del selenio, como el  $\text{H}_2\text{Se}$  y las especies reactivas de oxígeno (ROS), que degradan estructuras celulares importantes, en concordancia con lo reportado por Herrero & Wellinger (2015) y Lindemann et al. (2000).

El recuento de UFC/mL en agar Sabouraud permitió determinar la viabilidad y cuantificar las levaduras metabólicamente activas en la muestra, este enfoque se basa en la capacidad de las levaduras viables para proliferar y formar colonias bajo condiciones de cultivo adecuadas. En contraste, la técnica de densidad óptica, empleada por Rodríguez et al. (2019), Wu et al., (2021) y Zare et al., (2017) para evaluar la viabilidad y realizar el recuento celular, presenta una limitación inherente porque no diferencia entre células vivas y muertas. Al respecto Beal et al., (2020), menciona que, al medir la turbidez de una suspensión, la densidad óptica refleja la biomasa total presente, independientemente de la integridad metabólica o la capacidad reproductiva de las células. Por consiguiente, mientras que la densidad óptica es útil para estimar la concentración celular total o el crecimiento global de una población, el recuento de UFC/mL permanece como el método preferente para evaluar específicamente la proporción de células viables y potencialmente activas (Karamba & Ahmad, 2019; Wang et al., 2021). Asimismo, diversos estudios han demostrado que la relación entre densidad óptica y UFC/mL no es lineal, especialmente a altas densidades celulares o en medios complejos como YEPD, donde el crecimiento celular, la producción de metabolitos y la muerte celular afectan la lectura espectrofotométrica (Sørensen & Jakobsen, 1997; Peñuelas-Urquides et al., 2013). Por tanto, el uso de UFC/mL en este estudio mejora la resolución temporal del crecimiento microbiano como se observa en la Figura 7, lo que fortalece la interpretación de los efectos tóxicos del selenito. Además, Kieliszek et al., (2015) mencionan que compuestos como el selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) pueden ser perjudiciales a altas concentraciones, provocando estrés oxidativo y daño celular, lo que resulta en una disminución de la viabilidad y producción de colonias en 24 h después de la inoculación que Se, dichos resultados se asemejan a nuestra investigación. En relación Rodríguez et al. (2019) reportaron diferencias en el crecimiento y la formación de UFC/mL al utilizar 2, 4, 6, 8 y 10 mg/L, donde se observó un efecto inhibitorio en las concentraciones 8 y 10 mg/L, además mencionan que la tolerancia en el metabolismo depende de la concentración y cepa utilizada. Asimismo, Pinel et al., (2013) indica que, a nivel estructural, las mitocondrias son de los primeros organelos afectados. El estrés oxidativo mitocondrial puede comprometer la producción de ATP, alterar la dinámica

mitocondrial y activar vías de muerte celular como la apoptosis. Estudios han demostrado que altas concentraciones de selenio perjudican la viabilidad celular y provocan disminución de UFC/mL (Spallholz et al., 2004). Por otro lado, el núcleo también se ve comprometido. El exceso de ROS puede inducir daño en el ADN y afectar la integridad del ciclo celular. Se ha observado que *S. cerevisiae* en medios con altas dosis de selenito presenta fragmentación del ADN. El crecimiento celular de levaduras involucra rutas bioquímicas complejas. Inicialmente, el selenito se reduce mediante la acción del glutatión (GSH), generando compuestos como glutationiselenol (GSSeH), que pueden derivar en H<sub>2</sub>Se o selenio elemental (Cupp-Sutton & Ashby, 2016). La acumulación excesiva de estos intermediarios genera una respuesta de detoxificación celular, que incluye la activación de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (Kieliszek et al., 2015; Otero et al., 2008). Cuando la capacidad antioxidante se ve sobrepasada, se desencadena la muerte celular programada, lo que explica la disminución de UFC/mL en tratamientos con 7 y 9 mg/L (Figura 6).

La Figura 8 muestra el promedio de la cuantificación de la biomasa (g) en los tiempos 4, 16 y 28 h, matemáticamente presenta diferencias, sin embargo, al realizar el ANOVA arroja un valor ( $p > 0,05$ ) indicando que las diferentes concentraciones de selenito de sodio no generan un efecto estadístico significativo en la producción de la biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS- LESSAFREE<sup>®</sup>, no obstante, se observa una tendencia clara de mayor rendimiento a las 16 h en el tratamiento de 5 mg/L, reportando el mayor recuento de UFC/mL (Figura 7). Este hallazgo es coherente con estudios previos que reportan una mayor eficiencia de conversión de selenito en formas orgánicas en concentraciones de 5 a 7 mg/L para la obtención de biomasa (Rodríguez et al., 2019; Mapelli et al., 2012). Asimismo, Kieliszek et al., (2015) reportaron que la fase de crecimiento exponencial antes de las 24 h es el óptimo para obtener biomasa activa, estos resultados son similares a nuestra investigación. según Kieliszek et al. (2016), *S. cerevisiae* puede modular sus rutas metabólicas clave (como glicólisis y ciclo de Krebs) frente a la presencia de selenio, lo cual condiciona la eficiencia del crecimiento y el rendimiento en biomasa. Estos cambios metabólicos podrían explicar las ligeras diferencias observadas entre tratamientos, aunque no fueron significativas en este estudio. La cepa comercial usada en este estudio mostró una tolerancia moderada al selenito, lo cual coincide con lo reportado para cepas comerciales panaderas. Sin embargo, cepas autóctonas o modificadas genéticamente pueden tener mayor capacidad de biotransformación, como demostró Zare et al. (2017), este aspecto resalta la necesidad de optimizar la selección de cepas para aplicaciones

biotecnológicas específicas. Al respecto Kieliszek et al., (2016) mencionan que el tipo de cepa de *Saccharomyces cerevisiae* juega un papel significativo en su capacidad para tolerar el selenito. Las diferencias fenotípicas entre cepas comerciales y de laboratorio pueden resultar en variaciones significativas en la tolerancia al selenito de sodio e influir en la producción de biomasa, también reporta que concentraciones mayores a 8 mg/L de selenito generan menor biomasa porque ejercen un efecto tóxico sobre las levaduras. Igualmente Rodríguez et al. (2019) afirman que la *S. cerevisiae* LALVIN Bourgovin RC-212 tiene mayor producción de biomasa selenizada en concentraciones menores a 8 mg/L de selenito de sodio reportando diferencias significativas cuando se emplean mayores concentraciones. Sin embargo, Wu et al. (2021) y Ponce de León et al. (2002) indican que concentraciones mayores de 10 mg/L de selenito de sodio ejercen un efecto inhibitorio en la división celular y conllevan a una menor producción de biomasa, en cambio concentraciones menores a 10 mg/L no manifiestan diferencias significativas.

La Figura 9 representan la cuantificación del Selenio total intracelular en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS-LESAFFREE® con técnica ICP-OES, los puntos de medición fueron a las 4, 16 y 28 h, porque representan la fase exponencial, estacionaria y el inicio de la fase de muerte. Después del ANOVA ( $p > 0,05$ ), indicó que las concentraciones 5, 7 y 9 mg/L de selenito de sodio no generan diferencias significativas en la incorporación del selenito de sodio en el medio intracelular, no obstante, esta estabilización en la acumulación puede estar relacionada con la capacidad máxima de saturación de los sistemas de transporte y detoxificación intracelular (He & Yao, 2010). También es posible que parte del selenio incorporado haya sido transformado en formas volátiles como dimetilseleniuro (DMS<sub>2</sub>) o dimetildiseleniuro (DMDSe), que no quedan retenidas en la biomasa (Hapuarachchi et al., 2004; Kieliszek et al., 2015). En relación Rodríguez et al. (2019) y Ponce de León et al. (2002) concuerdan que el contenido de selenio intracelular puede variar por el tiempo de exposición y las condiciones redox del medio que, por la concentración absoluta del selenito, lo cual coinciden en nuestros resultados. En tal sentido Kieliszek et al., (2016) y Rodríguez et al. (2019), coinciden que la incorporación al medio intracelular implica un proceso de cambios que conducen a la disminución del nivel de oxidación y la generación de seleniuro de hidrógeno. Este compuesto intermediario logra ser empleado en la síntesis de selenoaminoácidos o transformarse en especies metiladas, las cuales logran ser excretadas del cuerpo más adelante. En tal sentido Herrero y Wellinger (2015), el selenito de sodio interactúa con el glutatión (GSH) para originar seleniuro de

hidrógeno y posteriormente generar selenoaminoácidos. Nuestro resultado coincide con los Wu et al. (2021) y Ponce de León et al. (2002) quienes demostraron que la acumulación de selenio total intracelular en *S. cerevisiae* no muestran diferencias significativas en concentraciones menores a 10 mg/L mientras que concentraciones superiores muestran aumento en el contenido de selenio orgánico en la biomasa final. En oposición, Oraby et al. (2016) reportaron que concentraciones debajo 5 mg/L de selenito de sodio, una efectiva incorporación intracelular en *Sacharomyces cerevisiae* formando selenometionina y selenocisteína, Sin embargo, manifiestan que los efectos inhibitorios se evidencian a partir de la concentración 9 mg/L, estos resultados guardan relación con nuestros resultados. Por último, esta investigación es una evidencia para la obtención de biomasa selenizada utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio. Sin embargo, al no evidenciarse diferencias significativas en la cuantificación de la biomasa y el contenido de selenito total intracelular se establece que la concentración 5 mg/L es la óptima porque a través de la curva de crecimiento presenta mayor producción de UFC/mL de *Sacharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS-LESAFFREE® mostrando diferencias significativas frente a las concentraciones 7 y 9 mg/L que generan un efecto inhibitorio en el crecimiento celular, además factores como el tiempo de exposición, la cepa de levadura, y las condiciones del cultivo son importantes en la obtención de levadura enriquecida con selenio. Los resultados sugieren estudios a gran escala y el empleo de técnicas para la especiación de selenio orgánico.

## VI. CONCLUSIONES

- Se logró obtener biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE® utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio, evidenciando su capacidad de tolerar y transformar selenito de sodio en compuestos orgánicos
- Se evaluó el efecto de las concentraciones de selenito de sodio en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE® mediante la producción UFC/mL, determinando que la concentración de 5 mg/L de selenito de sodio promovió mejor crecimiento celular cercano al control.
- Se cuantificó la biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE® en gramos (g), demostrando que las concentraciones utilizadas no difieren significativamente en la producción de biomasa.
- Se cuantificó el selenio total intracelular en la biomasa obtenida de *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE® evidenciando que las concentraciones empleadas no presentan diferencias significativas.
- Se determinó que la concentración de 5 mg/L de selenito de sodio es la más óptima para obtener biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE®, porque genera mayor producción de UFC/mL en comparación con las concentraciones de 7 y 9 mg/L, las cuales mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la levadura.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar análisis adicionales para la especiación de selenoaminoácidos presentes en *Saccharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESSAFREE®.
3. Realizar más investigaciones sobre la selenización en *Saccharomyces cerevisiae* en mayores volúmenes para aplicarlos a nivel industrial.
4. Usar técnicas de modelado matemático para hacer predicciones sobre el crecimiento celular, producción de biomasa e incorporación de selenio en *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Realizar el recuento de UFC/mL con equipos digitales de mayor precisión.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alpizar, D. (2010). Evaluación de diferentes productos alimenticios elaborados con dos derivados de levadura para aumentar su valor nutricional y funcional sin detrimento de su calidad sensorial. San Jose: Tesis para optar el Título Profesional de Licenciatura en Tecnología de Alimentos, UCR.
- Altamirano Cahuancama, C. R. (2013). Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel de Laboratorio a un nivel Piloto [Tesis]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de química, ingeniería química e ingeniería.
- 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 of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8728–8736. <https://doi.org/10.1021/jf8013519>
- Beal, J., Farny, N. G., Haddock-Angelli, T., Selvarajah, V., Baldwin, G. S., Buckley-Taylor, R., ... & Workman, C. T. (2020). Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Communications Biology*, 3(1), Article 512. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01127-5>
- Bouza, E., & Muñoz, P. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*: el fin de la inocencia. *Revista Española de Quimioterapia*, 17(3), 227–231.
- Burbano, X., Miguez-Burbano, M. J., McCollister, K., Zhang, G., Rodriguez, A., Ruiz, P., Lecusay, R., & Shor-Posner, G. (2002). Impact of a selenium chemoprevention clinical trial on hospital admissions of HIV-infected participants. *HIV Clinical Trials*, 3(6), 483–491. <https://doi.org/10.1310/A7LC-7C9V-EWKF-2Y0H>
- Cabañero, A. I., Madrid, Y., & Cámara, C. (2005). Enzymatic probe sonication extraction of Se in animal-based food samples: A new perspective on sample preparation for total and Se speciation analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(2), 373–379. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2798-4>
- Caban, K., & Copeland, P. R. (2006). Size matters: A view of selenocysteine incorporation from the ribosome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(1), 73–81. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5402-y>
- Callejo, M. J. (2002). *Industrias de Cereales y Derivados*. (M. AMV-Mundi prensa, Ed.).

- Cañari Chumpitaz, C. L. (2011). El selenio, un elemento poco conocido con un rol biológico importante. *Revista de Química PUCP*, 25(1–2), 29–33.
- Cjuno H, J. A., & Rodríguez B, C. A. (2018). *Selenomoléculas y su Cuantificación en la Levadura Saccharomyces cerevisiae: Vol. Ed.*
- Cupp-Sutton, K. A., & Ashby, M. T. (2016). Biological chemistry of hydrogen selenide. *Antioxidants*, 5(4), 24–26. <https://doi.org/10.3390/antiox5040042>
- Dumont, E., Vanhaecke, F., & Cornelis, R. (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal Bioanal Chem*, 1304–1323. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0529-8>
- Fairweather-Tait, S. J., Bao, Y., Broadley, M. R., Collings, R., Ford, D., Hesketh, J. E., & Hurtst, R. (2011). Selenium in human health and disease: An overview. *Molecular and Integrative Toxicology*, 14(7), 3–26. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-95390-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-95390-8_1)
- Ferrer, X. (2009). LAS LEVADURAS. <https://www.cuinant.com/elllevat1.htm>
- Galano, E., Mangiapane, E., Bianga, J., Palmese, A., Pessione, E., Szpunar, J., Lobinski, R., & Amoresano, A. (2013). Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in lactobacillus reuteri proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(8), 2196–2204. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.027607>
- Hapuarachchi, S., Swearingen, J., & Chasteen, T. G. (2004). Determination of elemental and precipitated selenium production by a facultative anaerobe grown under sequential anaerobic/aerobic conditions. *Process Biochemistry*, 39(11), 1607–1613. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00298-X)
- He, Q., & Yao, K. (2010). Microbial reduction of selenium oxyanions by *Anaeromyxobacter dehalogenans*. *Bioresource Technology*, 101(10), 3760–3764. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.065>
- Herrero, E., & Wellinger, R. E. (2015). Yeast as a model system to study metabolic impact of selenium compounds. *Microbial Cell*, 2(5), 139–149. <https://doi.org/10.15698/mic2015.05.200>
- Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, C. S. de I. C. (2019). Espectroscopía De Emisión Atómica ICP-OES. *Csic*, 1–3. [https://icp.csic.es/archivos/uapoyo/2020/Descripcion\\_ICP\\_02.pdf](https://icp.csic.es/archivos/uapoyo/2020/Descripcion_ICP_02.pdf)
- Karamba, K. I., & Ahmad, S. (2019). Mathematical relationship of optical density, total viable count and microbial biomass for growth of *Serratia marcescens*. *Journal of*

<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22331.26408>

Kieliszek, M., Błażej, S., Gientka, I., & Bzducha-Wróbel, A. (2015). Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(13), 5373–5382. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6650-x>

Kieliszek, M., Błażej, S., & Płaczek, M. (2016). Spectrophotometric evaluation of selenium binding by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 and *Candida utilis* ATCC 9950 yeast. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.01.014>

Lindemann, T., Prange, A., Dannecker, W., & Neidhart, B. (2000). Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 368(2–3), 214–220. <https://doi.org/10.1007/s002160000475>

Lindemann, T., Hintze, J., & Schnug, E. (2000). Selenium uptake and speciation in yeast: Role of glutathione and enzymatic pathways. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 14(3), 142–150. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(00\)80005-7](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(00)80005-7)

López-Bellido Garrido, F. J., & López Bellido, L. (2013). Selenio y salud; valores de referencia y situación actual de la población española. *Nutricion Hospitalaria*, 28(5), 1396–1406. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.5.6634>

Lopez-Heras, I., Palomo, M., & Madrid, Y. (2011). Selenoproteins: The key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(6), 1717–1727. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4916-4>

Manjusha, R., Dash, K., & Karunasagar, D. (2007). UV-photolysis assisted digestion of food samples for the determination of selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). *Food Chemistry*, 105(1), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.011>

Mapelli, V., Hillestrøm, P. R., Kápolna, E., Larsen, E. H., & Olsson, L. (2011). Metabolic and bioprocess engineering for production of selenized yeast with increased content of seleno-methylselenocysteine. *Metabolic Engineering*, 13(3), 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.03.001>

Mapelli, V., Hillestrom, P. R., Patil, K., Larsen, E. H., & Olsson, L. (2012). The interplay between sulphur and selenium metabolism influences the intracellular redox balance in

- Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 12(1), 20–32.  
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00757.x>
- Martens, D. A. (2003). Selenium Inorganic and Organic. 27, 1–3. <https://doi.org/10.1081/E-EWS>
- Maseko, T., Callahan, D. L., Dunshea, F. R., Doronila, A., Kolev, S. D., & Ng, K. (2013). Chemical characterisation and speciation of organic selenium in cultivated selenium-enriched *Agaricus bisporus*. Food Chemistry, 141(4), 3681–3687.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.027>
- Navarro-Alarcon, M., & Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: A review. Science of the Total Environment, 400(1–3), 115–141.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.024>
- Oraby, M. M., Allababidy, T., & Ramadan, E. M. (2016). The bioavailability of selenium in *Saccharomyces cerevisiae*. Annals of Agricultural Sciences, 60(2), 307–315.  
<https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.10.006>
- Otero, M. A., Saura, G., & Martínez, J. A. (2008). Enriquecimiento de biomasa de levadura con micronutrientes esenciales. ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar, XLII (1–3), 60–68. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120667009>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.007>
- Pappa, E. C., Pappas, A. C., & Surai, P. F. (2006). Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake. Science of the Total Environment, 372(1), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.08.008>
- Pedrero, Z., & Madrid, Y. (2009). Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. Analytica Chimica Acta, 634(2), 135–152.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.026>
- Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Sánchez-Martínez, M. J., Pérez-Corona, M. T., Madrid, Y., Cámara, C., & Vidal-Valverde, C. (2012). Se improves indole glucosinolate hydrolysis products content, Se-methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut. Food Chemistry, 132(2), 907–914.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.064>
- Peñuelas-Urquides, K., Villarreal-Treviño, L., Silva-Ramírez, B., Rivadeneyra-Espinoza, L., Said-Fernández, S., & de León, M. B. (2013). Measuring of *Mycobacterium tuberculosis*

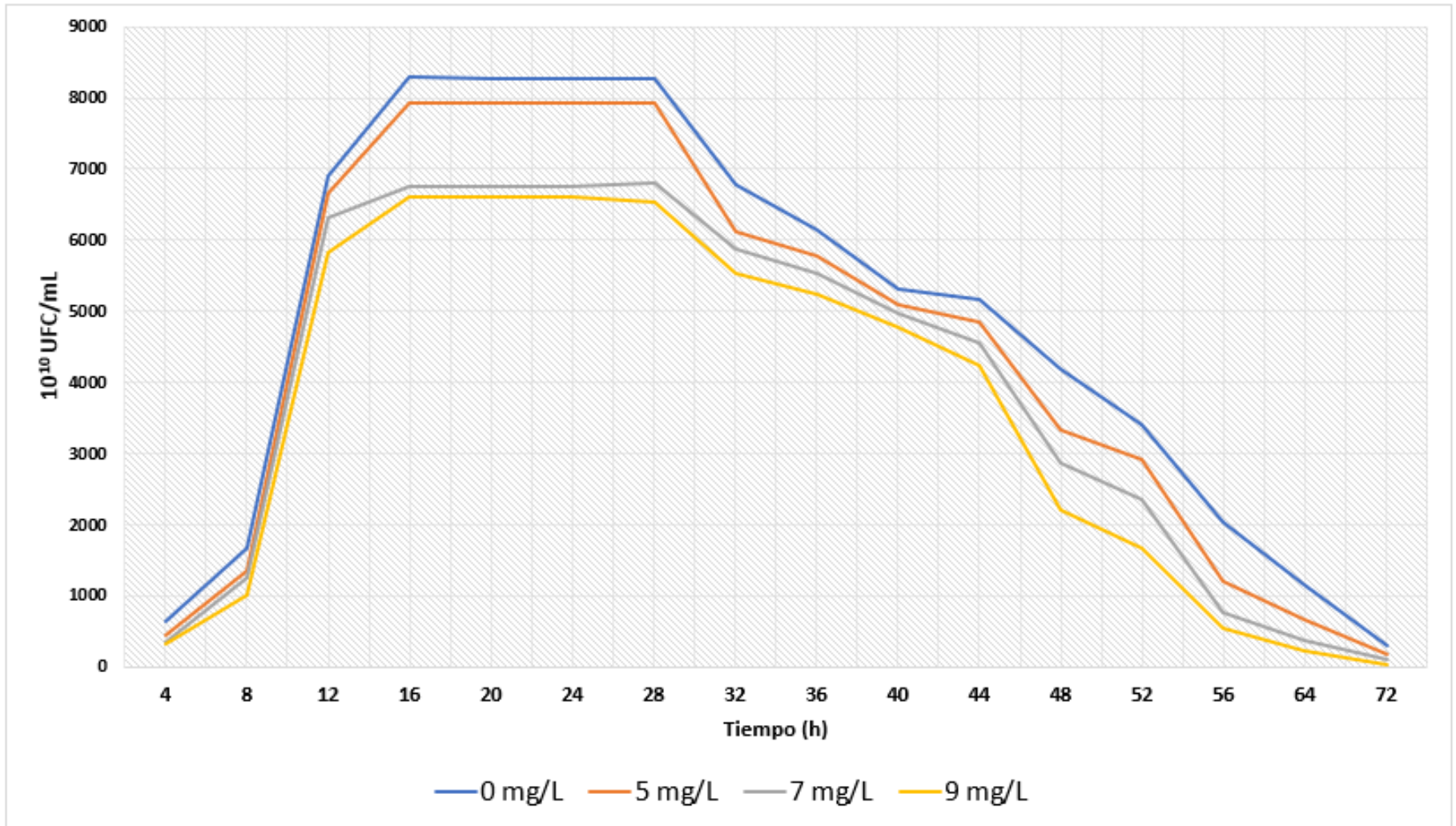
- growth: A correlation of optical density with colony forming units. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 287–289. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000008>
- Pinel, O., Chabert, P., Sarry, J. E., & Fournié, J. J. (2013). Mechanisms of selenite cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of oxidative stress and DNA damage. *Yeast*, 30(8), 315–330. <https://doi.org/10.1002/yea.2967>
- Ponce de León, C. A., Montes-Bayón, M., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A., & Encinar, J. R. (2002). Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: A study of different incorporation methods. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 602–610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01562.x>
- Quijano Nieto, M. A. (1999). Desarrollo de Métodos Analíticos para la Determinación de Selenio y sus Especies en muestras de Alimentos, Aguas y Fluídos Biológicos por ICP-MS [Thesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid.
- Rayman, M. P. (2000). The importance of Selenium on human health. *The Lancet*, 356(9225), 233–241. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673600024909>
- Rayman, M. P. (2004). The use of high-selenium yeast to raise selenium status: ¿how does it measure up? *British Journal of Nutrition*, 92(4), 557–573. <https://doi.org/10.1079/bjn20041251>
- Rayman, M. P. (2012). Selenium and human health. *The Lancet*, 379(9822), 1256–1268. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9)
- Rayman, M. P., Infante, H. G., & Sargent, M. (2008). Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *British Journal of Nutrition*, 100(2), 238–253. <https://doi.org/10.1017/S0007114508922522>
- Rodríguez Best, C. A. (2019). Cuantificación cromatográfica y electrométrica de selenometionina y selenocisteína intracelular de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en función de la concentración de selenito en el medio de cultivo. In Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10686>
- Rodríguez Best, C. A., Ceroni Galloso, M., Villegas Silva, E. F., & Rebaza Cárdenas, T. D. (2019). Selenio total y viabilidad celular en la obtención de selenio-levadura. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 85(4), 518–526. <https://doi.org/10.37761/RSQP.V85I4.264>
- Ruiz Encinar, J., Ouerdane, L., Buchmann, W., Tortajada, J., Lobinski, R., & Szpunar, J. (2003). Identification of water soluble selenium containing proteins in selenized yeast by size-exclusion-reversed-phase HPLC/ICPMS followed by MALDI-TOF and electrospray

- Q-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75(15), 3765–3774. <https://doi.org/10.1021/ac034103m>
- Salinas, G. (2010). BIOQUÍMICA DE LA SELENOCISTEÍNA, EL 21er AMINOÁCIDO, Y ROL DE LAS SELENOPROTEÍNAS EN LA SALUD HUMANA. *Mensaje Bioquímico*, XXXIV, 121–133.
- Sánchez Martínez, M. J. (2014). Biotransformación de selenio en procesos de fermentación y desarrollo de alimentos enriquecidos en selenio, estudios de biodisponibilidad con ensayos in vivo.
- Sánchez Martínez, M. J. (2014b). Biotransformación de selenio en procesos de fermentación y desarrollo de alimentos enriquecidos en selenio, estudios de biodisponibilidad con ensayos in vivo. <https://eprints.ucm.es/29117/1/T35842.pdf>
- Spallholz, J. E., Boylan, L. M., & Larsen, H. S. (2004). Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1031(1), 242–250. <https://doi.org/10.1196/annals.1331.023>
- 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(2), 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.02.021>
- Sørensen, B. B., & Jakobsen, M. (1997). Correlation between CFU and OD600 in yeast growth measurement. *International Journal of Food Microbiology*, 34(3), 209–220. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01236-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01236-5)
- Suzuki, K. T. (2005). Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. *Journal of Health Science*, 51(2), 107–114. <https://doi.org/10.1248/jhs.51.107>
- Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Munteau, H., Van Leeuwen, H. P., & Lobinski, A. R. (2000). Guidelines for Terms Related To Chemical Speciation and Fractionation of Elements. Definitions, Structural Aspects, and Methodological Approaches. *Pure Appl. Chem.*, 72(8), 1453–1470.
- USDA (United States Department of Agriculture). (2000). Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academies Press (US). Food and Nutrition Board.
- Vieira, É. D., Andrietta, M. da G. S., & Andrietta, S. R. (2013). Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 551–558. [www.sbmicrobiologia.org.br](http://www.sbmicrobiologia.org.br)

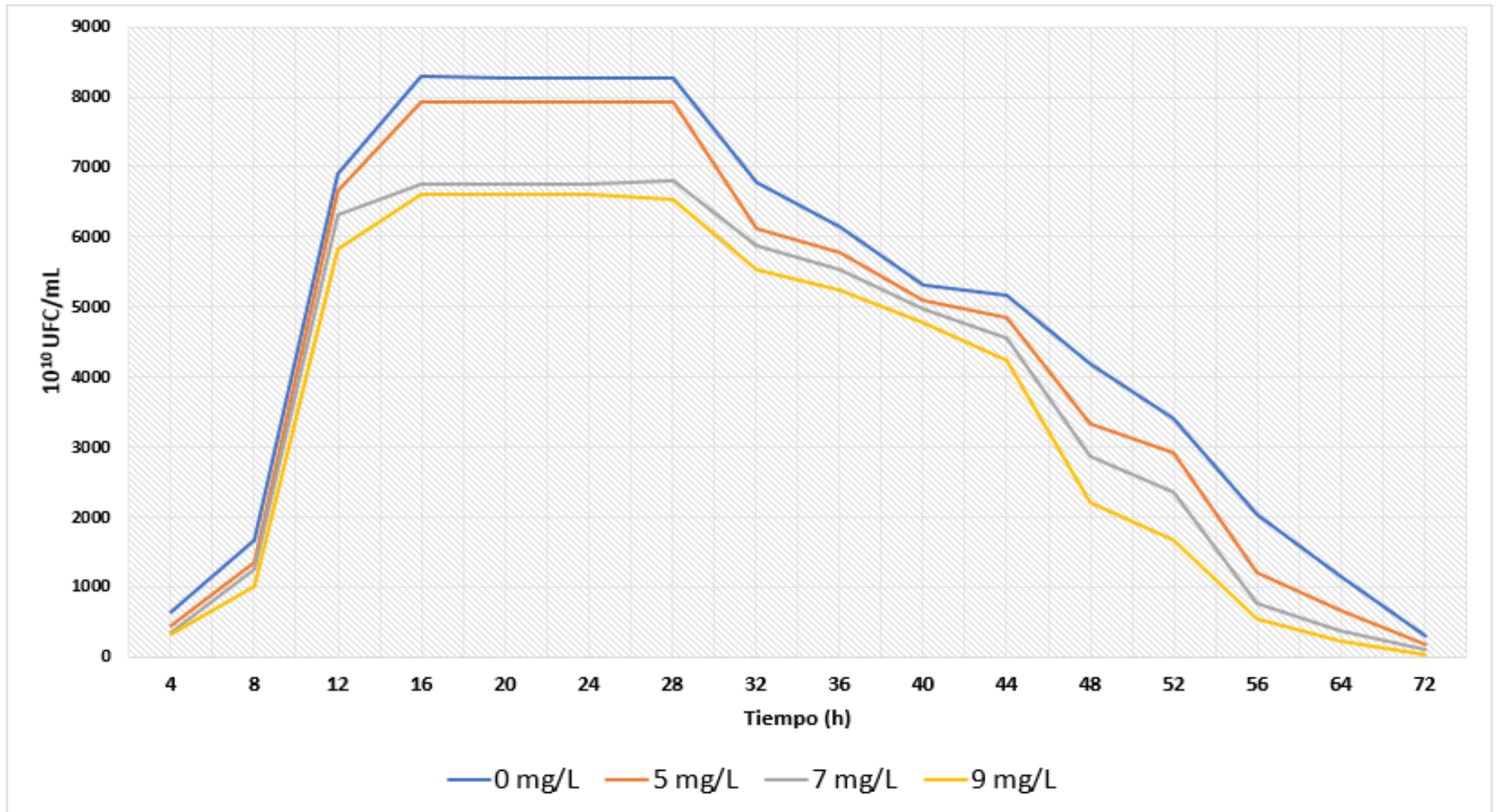
- Wang, R., Lorántfy, B., Fusco, S., Olsson, L., & Franzén, C. J. (2021). Analysis of methods for quantifying yeast cell concentration in complex lignocellulosic fermentation processes. *Scientific Reports*, 11, Article 90703. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89259-5>
- Weekley, C. M., Aitken, J. B., Vogt, S., Finney, L. A., Paterson, D. J., De Jonge, M. D., Howard, D. L., Musgrave, I. F., & Harris, H. H. (2011). Uptake, distribution, and speciation of selenoamino acids by human cancer cells: X-ray absorption and fluorescence methods. *Biochemistry*, 50(10), 1641–1650. <https://doi.org/10.1021/bi101678a>
- Wood, S. M., Beckham, C., Yosioka, A., Darban, H., & Watson, R. R. (2000).  $\beta$ -Carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans. *Integrative Medicine*, 2(00), 85–92.
- Wu, J., Hong, L., & Shi, M. (2021). Production of Methylselenocysteine in *Saccharomyces cerevisiae* LG6 by continuous fermentation. *Bioresource Technology Reports*, 13(January), 100627. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100627>
- Yazdi, M. H., Mahdavi, M., Setayesh, N., Esfandyar, M., & Shahverdi, A. R. (2013). Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient immune responses in vivo and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-21-33>
- Zare, H., Vahidi, H., Owlia, P., Hosseindokht Khujin, M., & Khamisabadi, A. (2017). Yeast enriched with selenium: A promising source of selenomethionine and seleno-proteins. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 130–134.
- Zhang, Y., Wang, Y., Song, H., & Zhou, J. (2022). Biosynthesis of elemental selenium nanoparticles by yeast and their detoxification function. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127075. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127075>

## **ANEXOS**

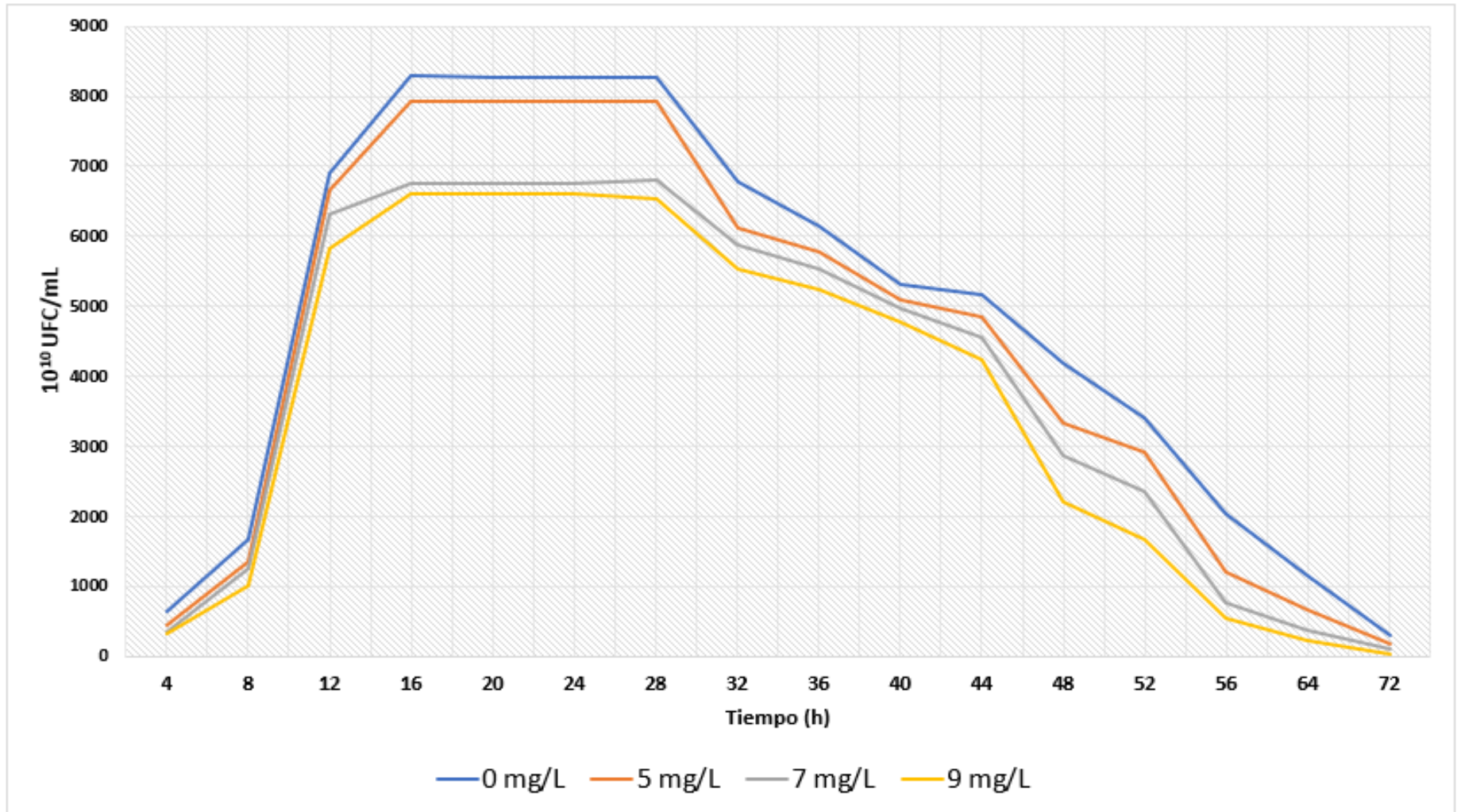
**Anexo 1.** Efecto del selenito de sodio en el crecimiento de *Sacharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESAFFREE® (primera repetición)



**Anexo 2.** Efecto del selenito de sodio en el crecimiento de *Sacharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESAFFREE® (segunda repetición).



**Anexo 3.** Efecto del selenito de sodio en el crecimiento de *Sacharomyces cerevisiae* INSTANT SUCCESS - LESAFFREE® (tercera repetición).



**Anexo 4.** Prueba de ANOVA para las UFC/mL de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 4 h (promedio).

4 h	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	211724.917	3	70574.972	1849.126	0.000
Dentro de grupos	305.333	8	38.167		
Total	212030.250	11			

Nota: IBM SPSS 27

**Anexo 5.** Prueba de Kruskal - Wallis para las UFC/mL de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 16 h (promedio).

	16h
H de Kruskal-Wallis	10.421
gl	3
Sig. asin.	0.015

Nota: IBM SPSS 27

**Anexo 6.** Prueba de Kruskal - Wallis para las UFC/mL de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 28 h (promedio).

	28 h
H de Kruskal-Wallis	10.385
gl	3
Sig. asin.	0.016

Nota: IBM SPSS

**Anexo 7.** Pruebas Post hoc para las UFC/mL de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones selenito de sodio (promedio).

Tiempos (h)	Post Hoc	Comparación de Sig.					
		[0-5]	[0-7]	[0-9]	[5-7]	[5-9]	[7-9]
4	Tukey	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
8	Tukey	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
12	Tukey	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
16	Dunnett	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
20	Dunnett	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
24	Dunnett	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
28	Dunnett	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-C
32	Tukey	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
36	Tukey	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
40	Tukey	A-B	A-C	A-D	B-B	B-D	C-D
44	Tukey	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
48	Dunnett	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
52	Tukey	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
56	Tukey	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
64	Dunnett	A-B	A-C	A-D	B-C	C-D	C-D
72	Dunnett	A-B	A-C	A-D	B-C	C-D	C-D

*Letras iguales no hay diferencia significativa y letras diferentes existe diferencia significativa*

**Anexo 8.** Biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio.

	<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub></b>	<b>Tiempo (h)</b>		
		<b>4 h</b>	<b>16 h</b>	<b>28 h</b>
<b>Primera repetición</b>	5 mg/L	0,52	0,65	0,64
	7 mg/L	0,51	0,63	0,61
	9 mg/L	0,48	0,61	0,58
<b>Segunda repetición</b>	5 mg/L	0,53	0,66	0,63
	7 mg/L	0,51	0,61	0,58
	9 mg/L	0,49	0,59	0,57
<b>Tercera repetición</b>	5 mg/L	0,53	0,64	0,61
	7 mg/L	0,49	0,62	0,59
	9 mg/L	0,48	0,58	0,56
<b>Promedio</b>	5 mg/L	0,53	0,65	0,63
	7 mg/L	0,50	0,62	0,59
	9 mg/L	0,48	0,59	0,57

**Anexo 9.** Prueba de ANOVA para la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 4 h (promedio).

Biomasa a 4h	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0.001	2.000	0.001	1.531	0.290
Dentro de grupos	0.002	6.000	0.000		
Total	0.003	8.000			

Fuente: IBM SPSS 27

**Anexo 10.** Prueba de ANOVA para la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 16 h (promedio).

Biomasa a 16 h	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0.001	2.000	0.001	1.848	0.237
Dentro de grupos	0.002	6.000	0.000		
Total	0.004	8.000			

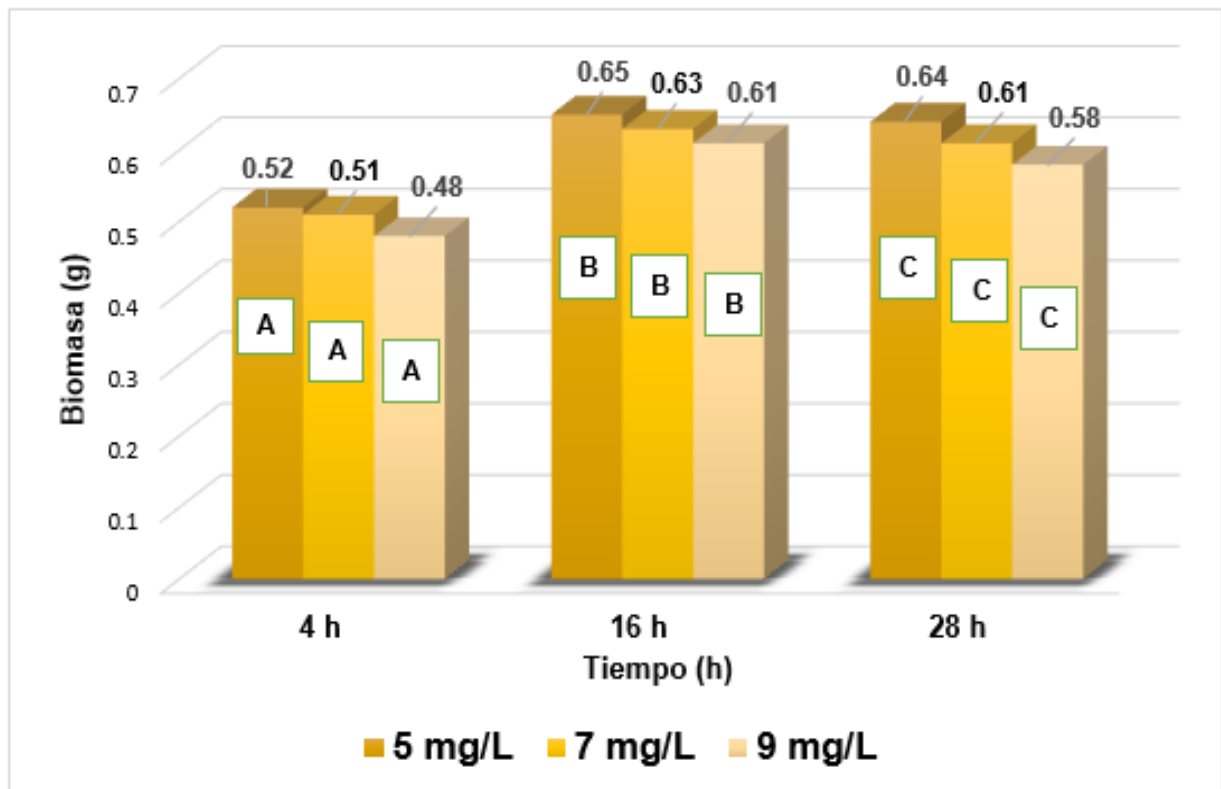
Fuente: IBM SPSS 27

**Anexo 11.** Prueba de ANOVA para la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio a las 28 h (promedio).

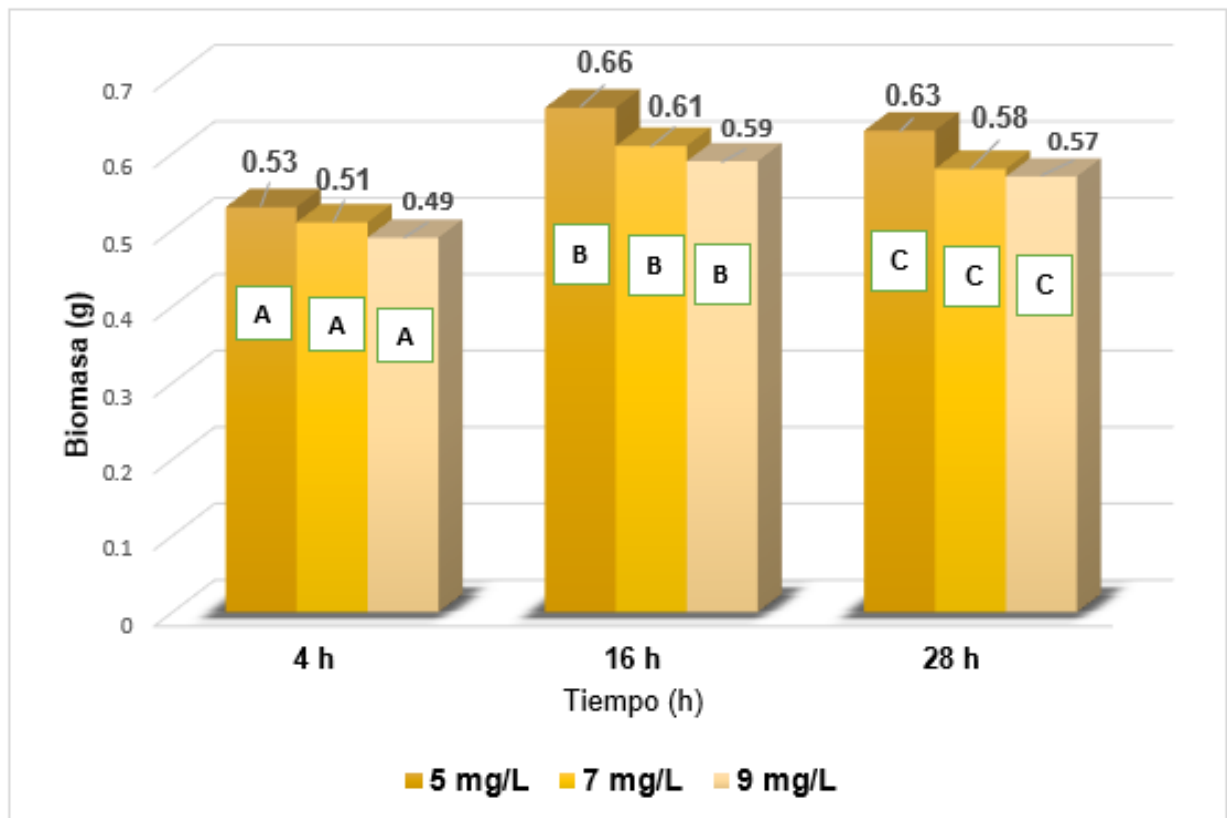
Biomasa a 28 h	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0.001	2.000	0.001	1.021	0.415
Dentro de grupos	0.003	6.000	0.001		
Total	0.004	8.000			

Fuente: IBM SPSS 27

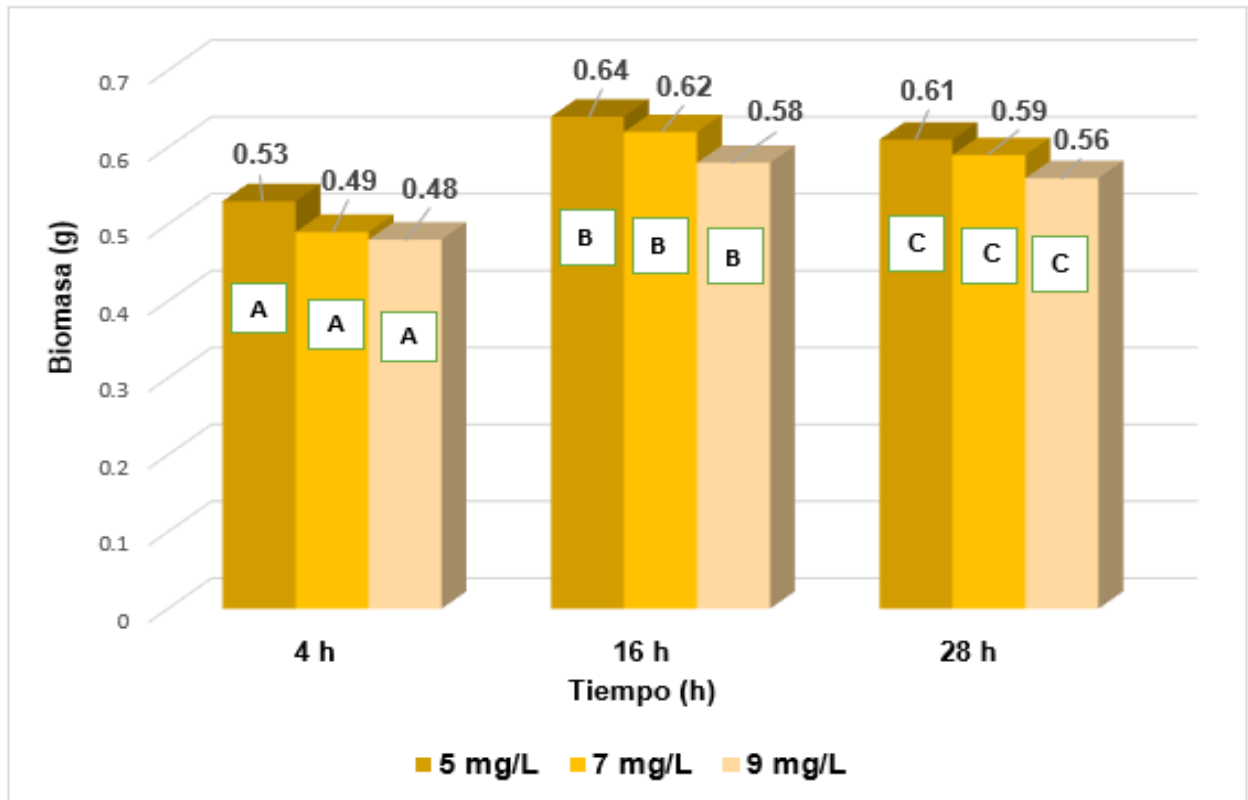
**Anexo 12.** Comparación de la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio (primera repetición).



**Anexo 13.** Comparación de la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio (segunda repetición).



**Anexo 14.** Comparación de la biomasa (g) de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® con diferentes concentraciones de selenito de sodio (tercera repetición).



**Anexo 15.** Cuantificación del selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE®.

	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	Tiempo (h)		
		4 h	16 h	28 h
<b>Primera repetición</b>	5 mg/L	1,16	1,74	1,66
	7 mg/L	1,23	1,85	1,84
	9 mg/L	1,27	1,91	2,15
<b>Segunda repetición</b>	5 mg/L	1,21	1,29	1,37
	7 mg/L	1,37	1,42	1,61
	9 mg/L	1,43	1,51	1,73
<b>Tercera repetición</b>	5 mg/L	0,93	1,33	1,57
	7 mg/L	0,97	1,47	1,72
	9 mg/L	1,02	1,69	1,92
<b>Promedio</b>	5 mg/L	1,10	1,45	1,53
	7 mg/L	1,19	1,58	1,72
	9 mg/L	1,24	1,70	1,93

**Anexo 16.** Prueba de ANOVA para el selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® a las 4 h (promedio).

Selenio intracelular a 4 h	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0.065	2.000	0.032	1.020	0.416
Dentro de grupos	0.190	6.000	0.032		
Total	0.255	8.000			

Fuente: IBM SPSS 27

**Anexo 17.** Prueba de ANOVA para el selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® a las 16 h (promedio).

Selenio intracelular a 16 h	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0.247	2.000	0.123	2.222	0.190
Dentro de grupos	0.333	6.000	0.056		
Total	0.580	8.000			

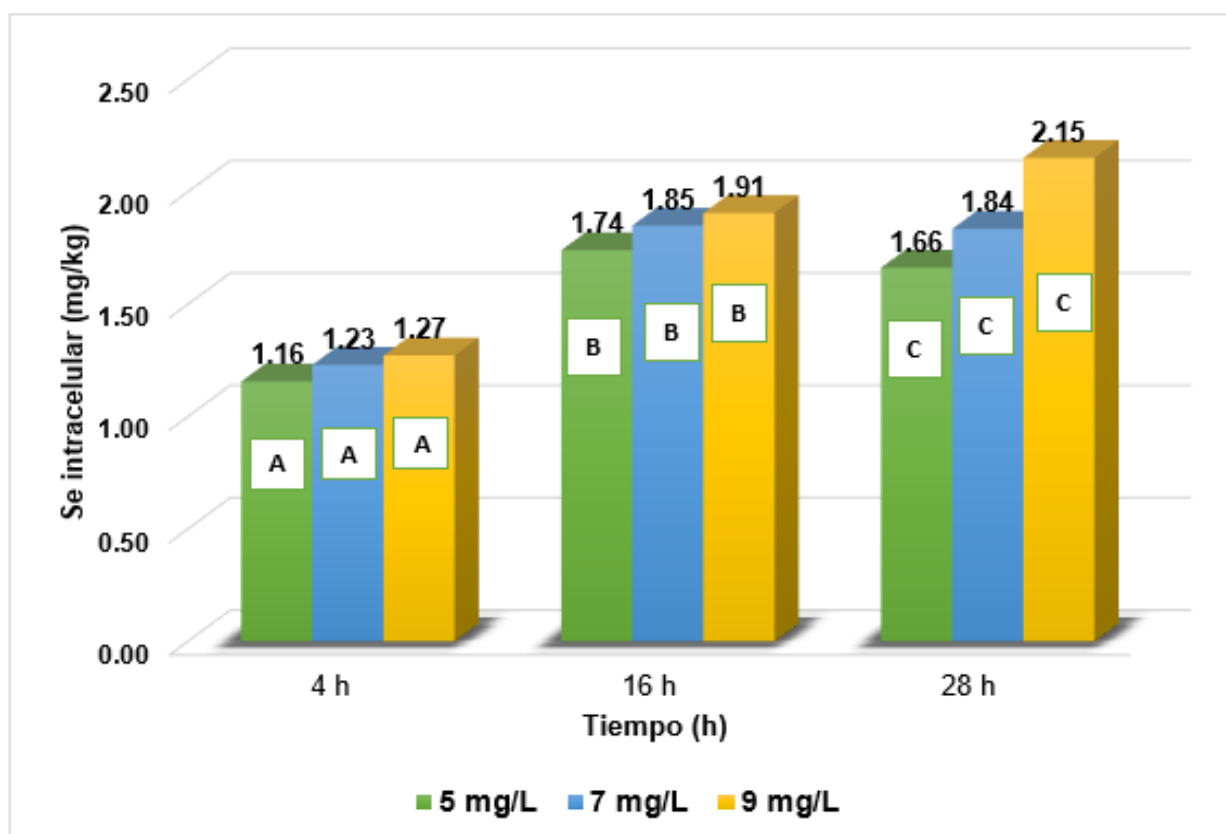
Fuente: IBM SPSS 27

**Anexo 18.** Prueba de ANOVA para el selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® a las 28 h (promedio).

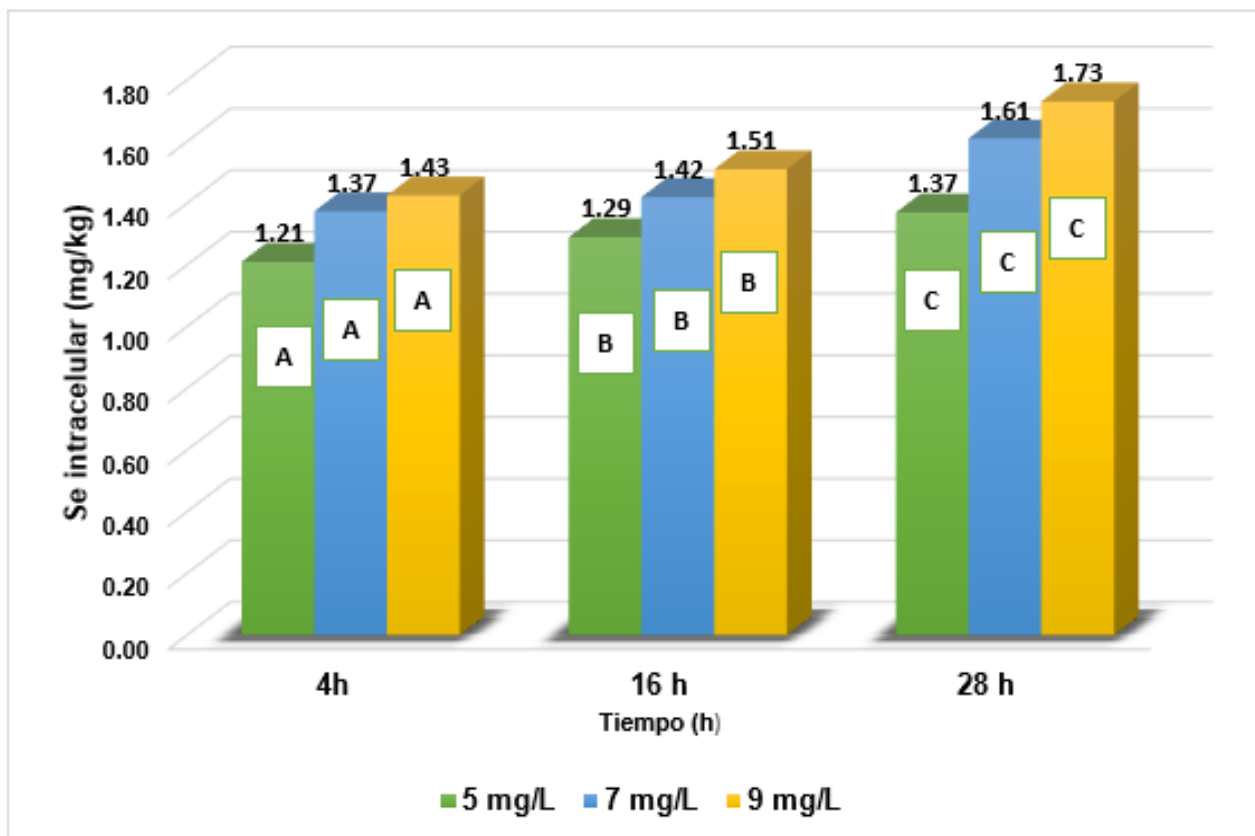
Selenio intracelular a 28 h	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0.744	2.000	0.372	2.819	0.137
Dentro de grupos	0.792	6.000	0.132		
Total	1.536	8.000			

Fuente: IBM SPSS 27

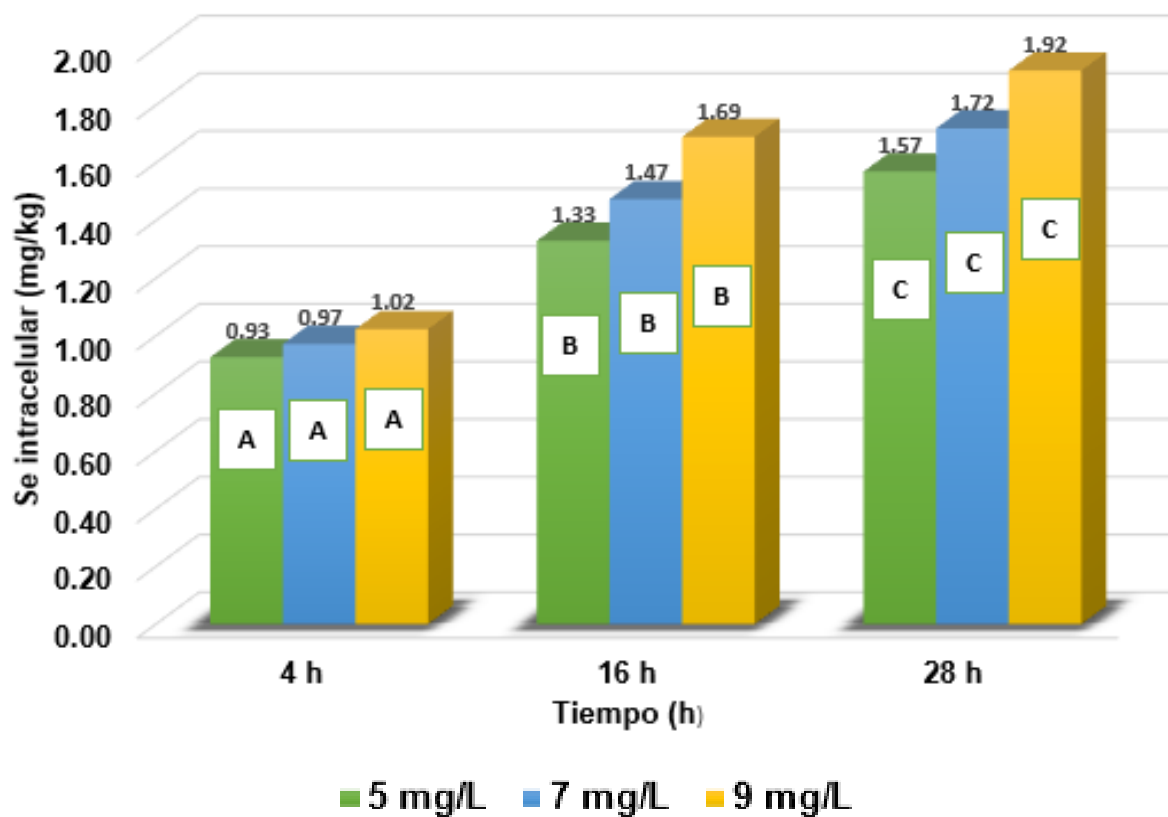
**Anexo 19.** Comparación del Selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® (primera repetición).



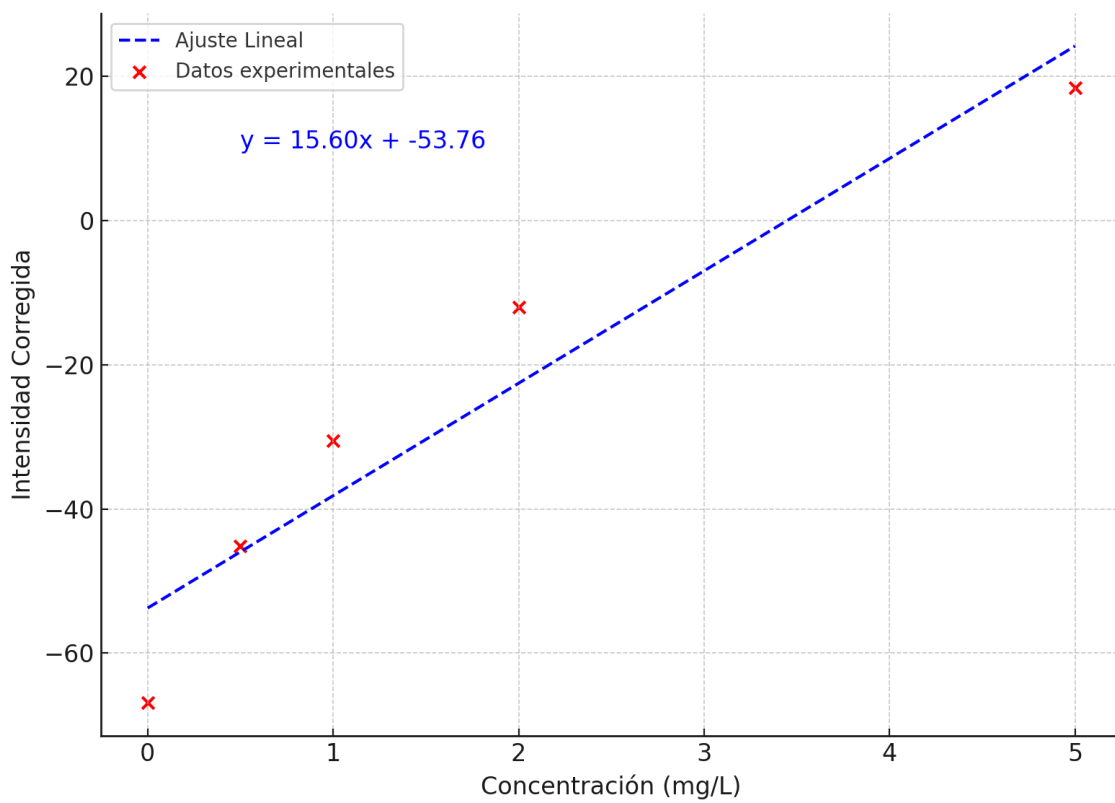
**Anexo 20.** Comparación del Selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® (segunda repetición).



**Anexo 21.** Comparación del Selenio total intracelular (mg/kg) en la biomasa de *Sacharomyces cerevisiae* SUCCESS-LESAFFREE® (tercera repetición).

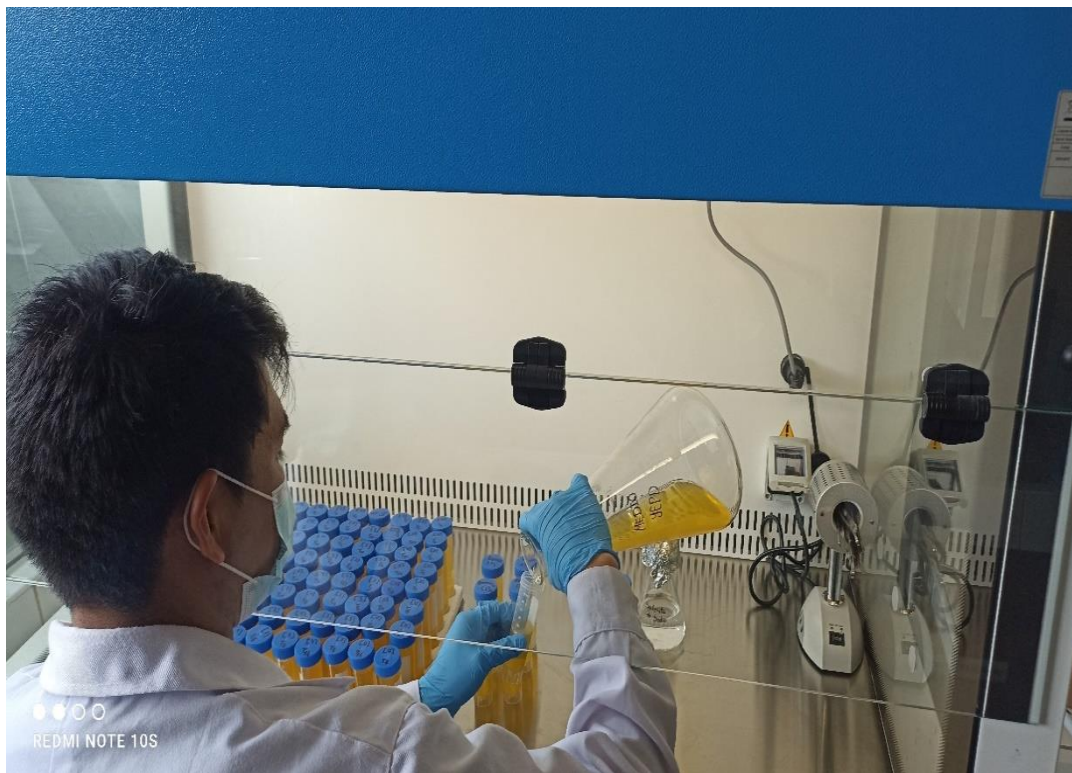


**Anexo 22.** Gráfica de la curva de calibración para Selenio (Se) a 196 nm.



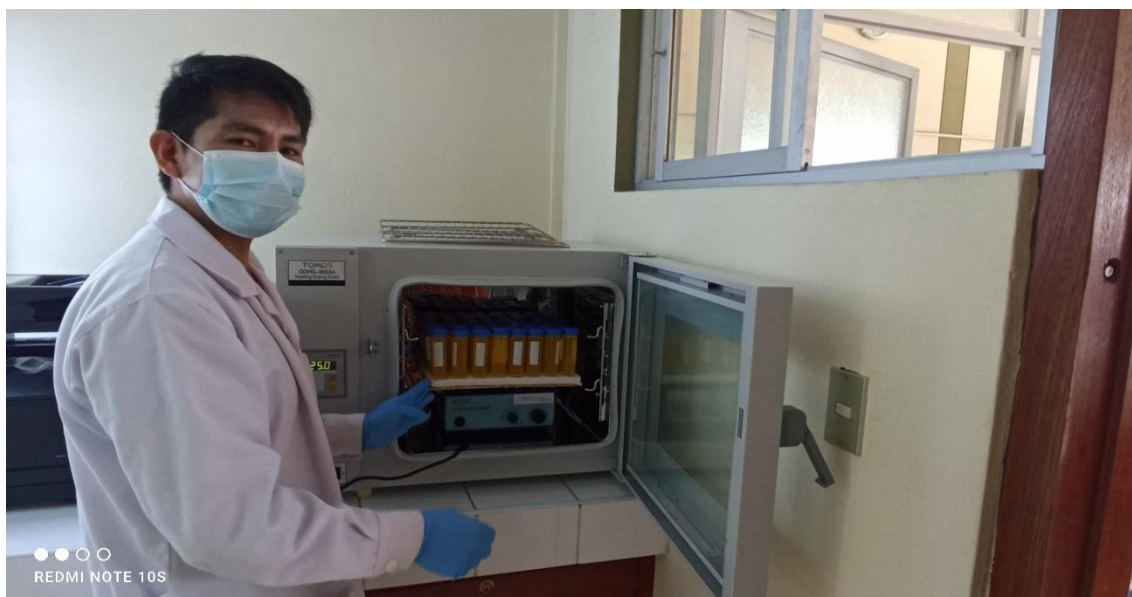
Seq. No.	1	AS Loc:	1	Date:	16/11/2023 10:11:52a.m.
Sample ID:	Calib Blank 1	Conc (Calib)	Conc (Sample)	Net Intensity	Corr. Intensity
<b>Se 196.026</b>					
	[0.00] mg/L				-64.3
	[0.00] mg/L			-69.5	-69.5
<b>Mean:</b>	[0.00] mg/L				-66.9
<b>SD:</b>	3.66 mg/L				
<b>%RSD:</b>	5.48				

**Anexo 23.** Distribución de volúmenes de YEPD para cada tratamiento de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$



Fuente: EEG.Ayacucho.2023.

**Anexo 24.** Incubación de los diferentes tratamientos de *Saccharomyces cerevisiae* a 30°C sometida a tres concentraciones de selenito de sodio en el medio YEDP.



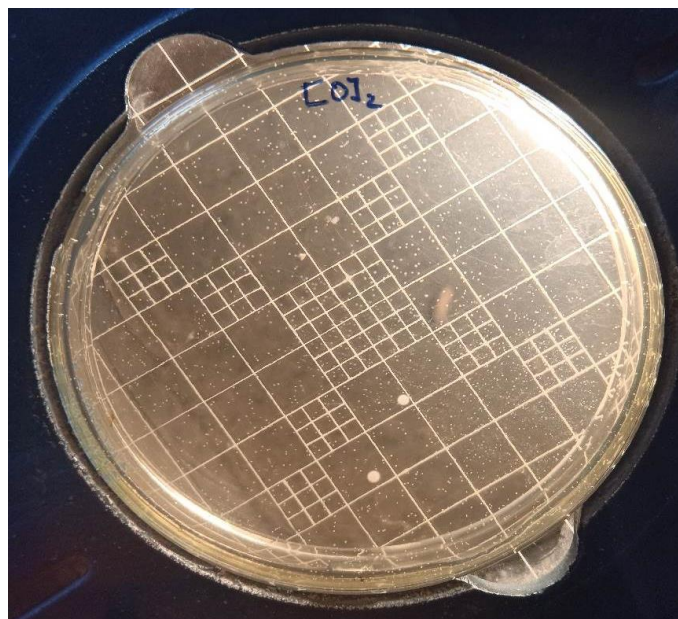
Fuente: EEG.Ayacucho.2023.

**Anexo 25.** Distribución de los diferentes tratamientos con *Saccharomyces cerevisiae* en los tubos falcon.

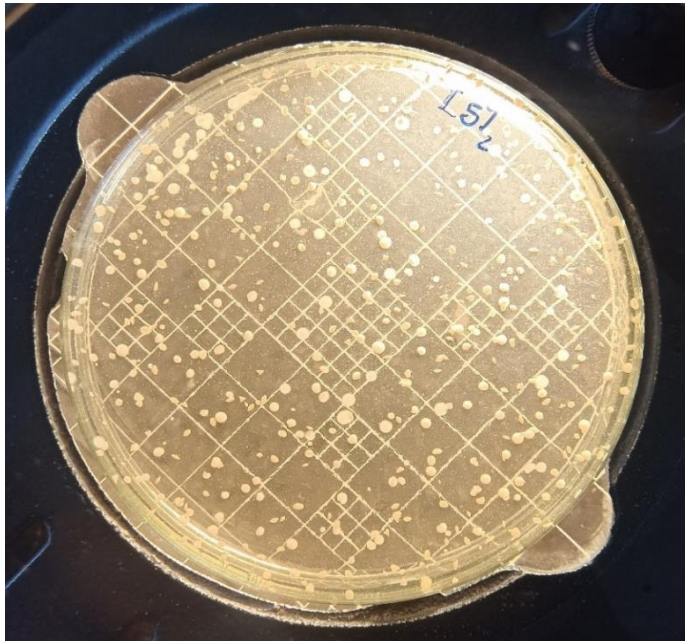


Fuente: EEG.Ayacucho.2023.

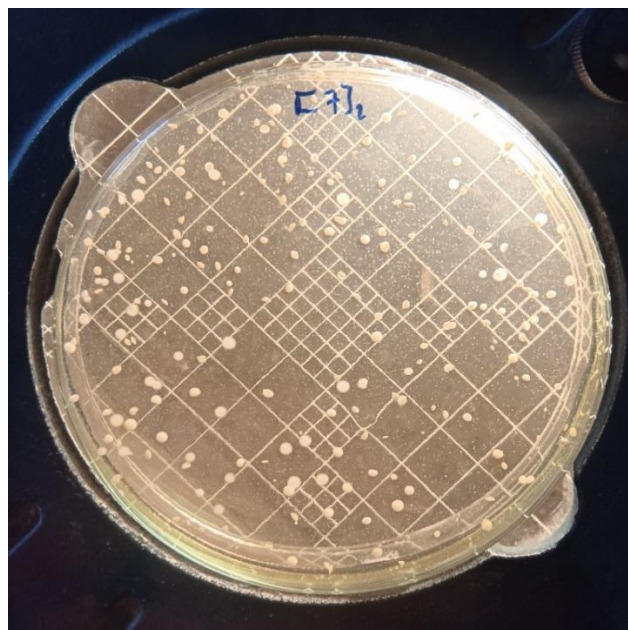
**Anexo 26.** Recuento de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en UFC/mL a las 16 horas en la concentración 0 de selenito de sodio.



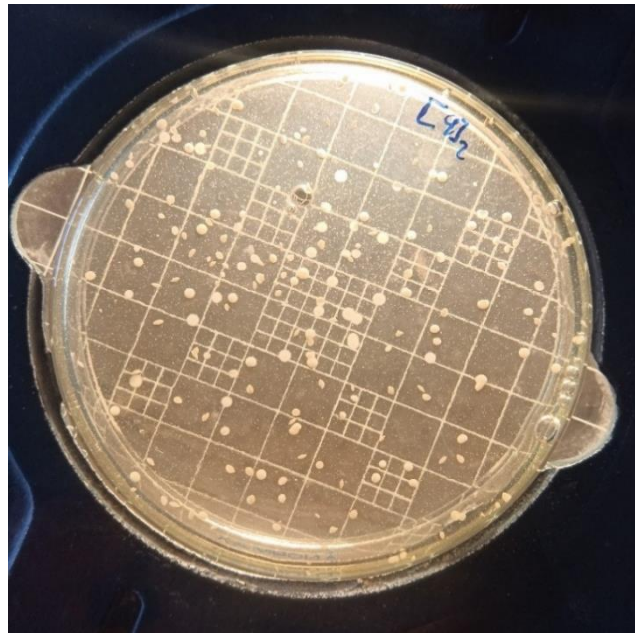
**Anexo 27.** Recuento de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en UFC/mL a las 16 horas en la concentración 5 de selenito de sodio.



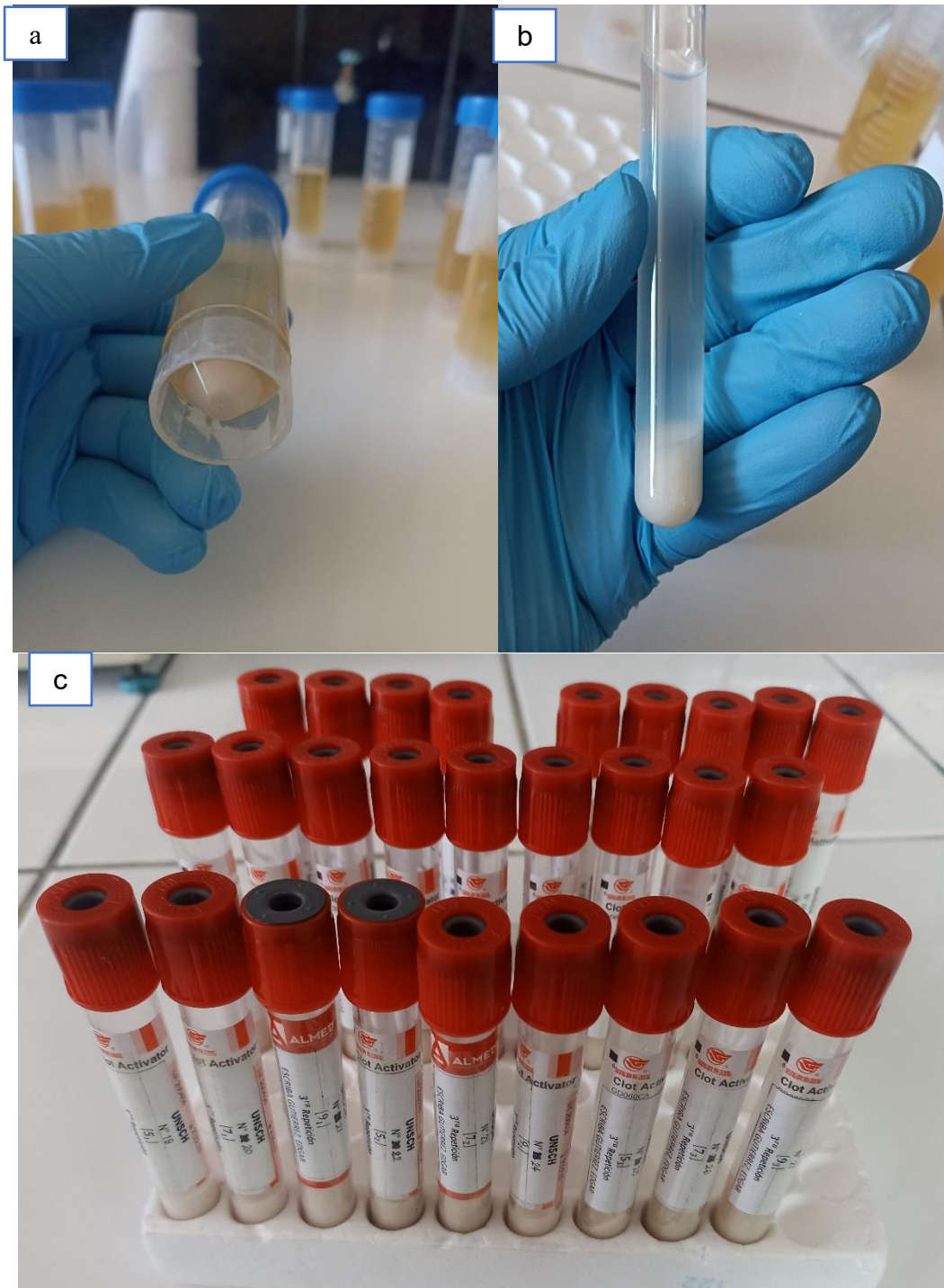
**Anexo 28.** Recuento de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en UFC/mL a las 16 horas en la concentración 7 de selenito de sodio.



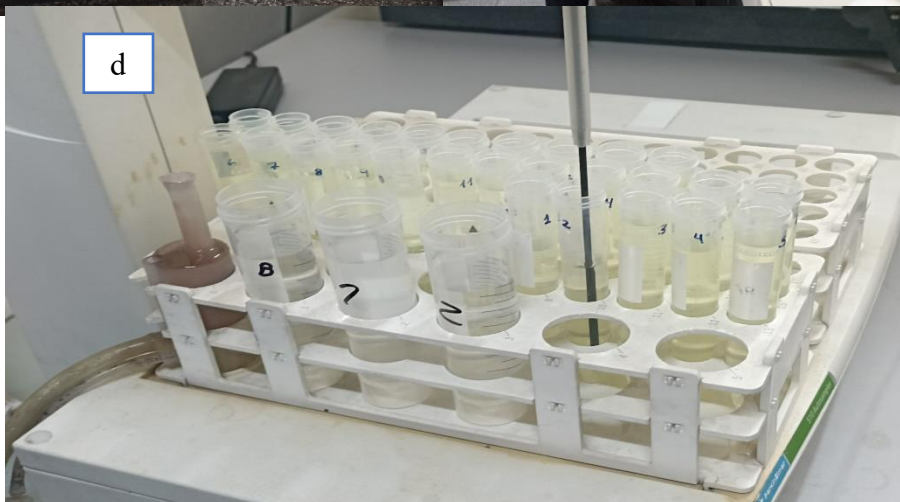
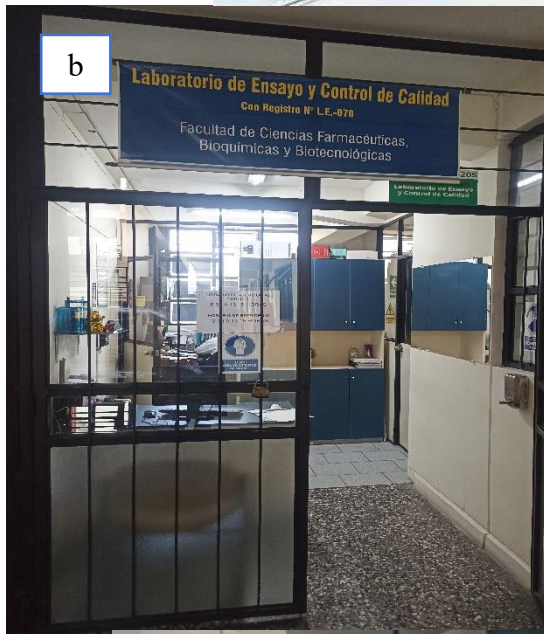
**Anexo 29.** Recuento de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en UFC/mL a las 16 horas en la concentración 9 de selenito de sodio.



**Anexo 30.** Biomasa recuperada por centrifugación a (2147  $\times g$ ) x 5 min.



**Anexo 31.** Procedimiento de la ICP-OES en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad -UCSM-Arequipa.



**Anexo 32.** Informe de ensayo para el análisis del contenido intracelular total de selenio utilizando ICP-OES.



**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umecoleo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 362038 ANEXO 1166  
✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350  
AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO N° ANA15K23.005088**

**INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE**

**Nombre del cliente** : Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga  
**Dirección del cliente** : Portal Independencia N° 72 Tercer Piso  
**RUC** : 20143660754  
**Identificación del contacto** : Edgar Escriba Gutiérrez  
**Descripción de la muestra** : Varios

**INFORMACIÓN DEL ENSAYO**

**Condición del muestreo** : Por el cliente  
**Tamaño de muestra** : Varios  
**Fecha de recepción** : 15/11/2023  
**Fecha de ejecución de ensayo** : 15/11/2023 al 16/11/2023  
**Fecha de emisión de informe** : 16/11/2023  
**Página** : 2 de 2

**OBSERVACIONES:**

- La información proporcionada por el cliente es de responsabilidad exclusiva del mismo.
- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento previo y transporte de la muestra hasta el ingreso al LECC son responsabilidad del solicitante y los resultados emitidos en el presente informe se refieren a la muestra tal como se recibió.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

**Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez**  
CQFDA 00624  
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS  
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umachillo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 84 382038 ANEXO 1166  
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350  
AREQUIPA - PERÚ



INFORME DE ENSAYO N° ANA15K23.005088

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

Nombre del cliente : Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga  
Dirección del cliente : Portal Independencia N° 72 Tercer Piso  
RUC : 20143660754  
Identificación del contacto : Edgar Escriba Gutiérrez  
Descripción de la muestra : Varios

INFORMACIÓN DEL ENSAYO

Condición del muestreo : Por el cliente  
Tamaño de muestra : Varios  
Fecha de recepción : 15/11/2023  
Fecha de ejecución de ensayo : 15/11/2023 al 16/11/2023  
Fecha de emisión de informe : 16/11/2023  
Página : 1 de 2

I. ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO:

ANÁLISIS	UNIDADES	RESULTADO
Muestra 01	mg/kg	1,16
Muestra 02	mg/kg	1,74
Muestra 03	mg/kg	1,86
Muestra 04	mg/kg	1,23
Muestra 05	mg/kg	1,85
Muestra 06	mg/kg	1,84
Muestra 07	mg/kg	1,27
Muestra 08	mg/kg	1,91
Muestra 09	mg/kg	2,15
Muestra 10	mg/kg	1,21
Muestra 11	mg/kg	1,29
Muestra 12	mg/kg	1,37
Muestra 13	mg/kg	1,37
Muestra 14	mg/kg	1,42
Muestra 15	mg/kg	1,81
Muestra 16	mg/kg	1,43
Muestra 17	mg/kg	1,51
Muestra 18	mg/kg	1,73
Muestra 19	mg/kg	0,93
Muestra 20	mg/kg	1,33
Muestra 21	mg/kg	1,57
Muestra 22	mg/kg	0,97
Muestra 23	mg/kg	1,47
Muestra 24	mg/kg	1,72
Muestra 25	mg/kg	1,02
Muestra 26	mg/kg	1,89
Muestra 27	mg/kg	1,92

Código LECC-15INF-002F ED:01

Código: LECC-15INF-002F ED:01 Fecha de Aprobación: 2022-08-16 Aprobación por: DT

### Anexo 33. Matriz de consistencia

**TÍTULO DE PROYECTO:** Obtención de biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio.


PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Cuál será la concentración óptima para obtener biomasa selenizada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ?	<p><b>Objetivo General</b> Obtener biomasa selenizada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio.</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluar el efecto de las concentraciones de selenito de sodio en el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INSTANT SUCCESS - LESSAFREE®.</li> <li>• Cuantificar la biomasa selenizada <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INSTANT SUCCESS - LESSAFREE®.</li> <li>• Cuantificar el selenio total intracelular en la biomasa obtenida de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INSTANT SUCCESS - LESSAFREE®.</li> <li>• Determinar la concentración óptima de selenito de sodio para obtener biomasa selenizada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INSTANT SUCCESS - LESSAFREE®.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antecedentes</li> <li>• Bases teóricas</li> <li>• Selenio y compuestos</li> <li>• Fuentes de selenio en la dieta y biodisponibilidad</li> <li>• Suplementos de Selenio</li> <li>• Relevancia biológica del selenio y sus especies</li> <li>• Biotransformación del selenio por parte de microorganismos: bacterias y levaduras</li> <li>• Selenio-levadura</li> <li>• Determinación de selenio y sus especies en muestras biológicas</li> <li>• Determinación del contenido total de selenio</li> <li>• Espectroscopía de emisión atómica ICP-OES</li> </ul>	<p>La menor concentración de selenito de sodio es la más óptima para obtener biomasa selenizada de <i>S. cerevisiae</i></p> <p>•</p>	<p><b>Variable Independiente</b> Concentración de selenito de sodio en medio YEPD</p> <p><b>Indicadores</b> 0 mg/L, 5 mg/L, 7 mg/L, 9 mg/L</p> <p><b>Variable dependiente</b> Biomasa selenizada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p> <p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuantificación de selenio total intracelular</li> <li>• Cuantificación de la biomasa selenizada</li> <li>• Recuento en UFC/mL</li> </ul>	<p><b>Diseño de investigación</b> Cuantitativo</p> <p><b>Tipo de Investigación</b> Experimental</p> <p><b>Población</b> La población está conformada por los diferentes diseños de biomasa selenizada en la que se evaluó la cantidad de selenio total intracelular.</p> <p><b>Tamaño de muestra</b> La muestra no probabilística es de 73 tubos Falcon que contienen biomasa con contenido de selenio a 0, 5, 7 y 9 mg/L sobre la que se realiza el recuento de colonias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en UFC/mL, desde la siembra hasta la activación de los niveles de selenio de sodio durante un periodo de 0 a 72 horas.</p> <p><b>Técnica</b> Recuento en placa ICP-OES</p> <p><b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> Se aplicará el Análisis de Varianza para el diseño en bloque completo al azar y las comparaciones múltiples de Tukey, se utilizará el programa SPSS versión 25 para los análisis estadísticos.</p>

**UNSCH**FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS****Bach. Edgar ESCRIBA GUTIERREZ****RESOLUCIÓN DECANAL N° 220-2025-UNSCH-FCB-D**

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día miércoles dieciséis de julio del año dos mil veinticinco; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, participando como presidente el Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista, el Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua (miembro – jurado), el Dr. Víctor Luis Cárdenas López. la Mg. Paula García Godos Alcazar (miembro – jurado), la Dra. Vidalina Andia Ayme (miembro – asesor), actuando como secretario docente el Mg. Luis Uriel Moscoso García; para presenciar la sustentación de tesis titulada: **Obtención de biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio**, presentado por el **Bach. Edgar ESCRIBA GUTIERREZ**; el presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio del acto de sustentación, indicando al sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas al sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA	17	17	17
Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ	18	18	18
Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCAZAR	17	15	16
<b>PROMEDIO</b>			<b>17</b>

El sustentante alcanzó el promedio de 17 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso del sustentante y el público al Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las seis con treinta minutos; firmando al pie del presente en señal de conformidad.



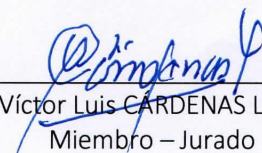
---

Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA  
Presidente




---

Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA  
Miembro - Jurado



---

Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ  
Miembro – Jurado



---

Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCAZAR  
Miembro – Jurado



---

Dra. Vidalina ANDIA AYME  
Miembro – Asesor



---

Mg. Luis Uriel MOSCOSO GARCÍA  
Secretario- Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

Nº 041-2025-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Obtención de biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio**, por EDGAR ESCRIBA GUTIERREZ; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 4%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario Nº 039-2021-UNSCH-CU.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 15 de agosto del 2025.

  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Escuela Profesional de Biología  
Dr. Fidel R. Mujica Lengua  
DIRECTOR

# Obtención de biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio

*por* EDGAR ESCRIBA GUTIERREZ

---

**Fecha de entrega:** 13-ago-2025 05:03p. m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2729259306

**Nombre del archivo:** ESCRIBA\_GUTIERREZ-\_Edgar-\_pregrado-2025\_TURNITIN\_Word\_1.docx (2.5M)

**Total de palabras:** 10968

**Total de caracteres:** 62435

# Obtención de biomasa selenizada de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes concentraciones de selenito de sodio

## INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

1library.co

Fuente de Internet

2%

2

es.scribd.com

Fuente de Internet

1%

3

Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Trabajo del estudiante

<1%

4

doaj.org

Fuente de Internet

<1%

5

idoc.pub

Fuente de Internet

<1%

6

repositorio.unal.edu.co

Fuente de Internet

<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo