

---

# Identificación y caracterización de cepas de *Lactobacillus spp.* potencialmente productoras de ácido $\gamma$ -aminobutírico en cultivos iniciadores naturales de quesería de producción nacional

---

Tutor: Dr. Pablo Zunino  
Co-Tutora: Sofía Fernández

Departamento de Microbiología  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

**Bach. Joaquín Lozano**  
Tesina de Licenciatura en Bioquímica

--

Montevideo, Uruguay  
2019

# Índice

|   |    |
|---|----|
| <b>Agradecimientos</b>                              | 2  |
| <b>Resumen</b>                                      | 3  |
| <b>Introducción</b>                                 | 4  |
| Microbiota intestinal                               | 4  |
| Eje Microbiota-Intestino-Cerebro                    | 6  |
| Probióticos   | 9  |
| Psicobióticos                                       | 11 |
| GABA  | 14 |
| Glutamato decarboxilasa                             | 15 |
| Operón <i>gad</i>                                   | 16 |
| Quesería  | 17 |
| <b>Hipótesis</b>                                    | 20 |
| <b>Objetivos generales</b>                          | 20 |
| <b>Objetivos específicos</b>                        | 20 |
| <b>Materiales y métodos</b>                         | 21 |
| Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo   | 21 |
| Extracción de ADN                                   | 21 |
| Diseño de primers                                   | 21 |
| Amplificación de gen <i>gadB</i>                    | 22 |
| Resistencia a sales biliares y pH bajos             | 23 |
| Amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S | 24 |
| <b>Resultados</b>                                   | 26 |
| Detección de cepas <i>gadB</i> positivas            | 26 |
| Resistencia a pH bajos y sales biliares             | 28 |
| Identificación molecular de cepas candidatas        | 30 |
| <b>Discusión</b>                                    | 33 |
| <b>Conclusiones y perspectivas</b>                  | 36 |
| <b>Bibliografía</b>                                 | 37 |

# Agradecimientos

Quiero agradecerles a mis tutores, Pablo y Sofía por ofrecerme la oportunidad de entrar al Departamento de Microbiología y trabajar en esta nueva línea de investigación del laboratorio. A Pablo que por más ocupado que estuviera siempre se hizo un tiempo para aclararme alguna cosa o para tirarme algún consejo y a Sofía que más que enseñarme como hacer muchas cosas del laboratorio, me enseñó como se debe escribir de manera correcta y clara.

Al toda la colonia, por siempre estar dispuestos a darme una mano o responder alguna duda. En especial a la gente del West-coast, Majo, Fer, Pao, Dani, Guille y Paula que siempre estuvieron y me dieron grandes consejos más allá de lo aplicable al laboratorio.

A mis compañeros de la facultad, los tortugos, Gonza, Rodri y Tincho con los que hicimos la mayoría de la carrera juntos y nos juntamos 4 veces en total. También a todo el resto de los compañeros que conocí a lo largo de esta carrera en esta hermosa Facultad de Ciencias, con los que compartí incontables jornadas de estudio hasta que cerrara la biblioteca y trucos, tambores y risas en los tiempos libres en el patio de la facultad.

También a mis amigos de la vida, Adri, Agus, Rodri, Leo, Diego, Gonchi, Facu y Ori que siempre estuvieron ahí tirándome hacia adelante con todo.

Quiero darle un agradecimiento particular a Alexandra Elbakyan, fundadora de Sci\_hub, gracias a quien esta tesis y una enorme cantidad de trabajos científicos han sido posibles. Su trabajo es un gran avance hacia la democratización de la ciencia.

Por último, a mi familia, a mis padres, que siempre estuvieron dándome apoyo y presionándome siempre para seguir adelante. A mi hermana, quien siempre me aconsejo y apoyo incondicionalmente a lo largo de todo este tiempo. Y a mis abuelos, siempre expectantes de mi avance en la carrera queriendo ayudar en cada paso de esta.

# Resumen

En los últimos años se ha constatado un renovado interés en el estudio de la microbiota intestinal y su posible relación con aspectos vinculados con la salud mental del hospedero. Se proponen distintos mecanismos que median este vínculo, entre los que se encuentra la secreción bacteriana de neuropéptidos como el ácido- $\gamma$ -aminobutírico, (también llamado GABA por su sigla en inglés). Se conoce que la secreción de este compuesto en el caso de las bacterias ácido lácticas ocurre mediante la descarboxilación del ácido glutámico utilizando la enzima glutamato descarboxilasa (GAD por su sigla en inglés).

En este marco, nuestro equipo se dedicó a la caracterización de cepas de *Lactobacillus* spp. provenientes de cultivos iniciadores naturales empleados en la industria quesera de nuestro país. En primer lugar, se analizó la potencial producción de GABA mediante la detección del gen codificante para la proteína (*gadB*) mediante la técnica de PCR a tiempo final, utilizando *primers* diseñados a partir de regiones conservadas del gen en distintas especies de *Lactobacillus* spp. Luego se caracterizó la capacidad de supervivencia de las cepas en condiciones similares a las encontradas en el tracto gastrointestinal mediante análisis de viabilidad a pH bajos (pH=2) y en presencia de sales biliares. Por último, se seleccionaron cepas potencialmente productoras de GABA que resistieron a las condiciones de pH y presencia de sales biliares y se identificaron mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S.

De una colección de 101 cepas se determinó que 44 de ellas contenían el gen *gadB*. De éstas, 25 lograron resistir a pH bajos y presencia de sales biliares. Se determinó que estas cepas, 19 pertenecen al grupo *Lactobacillus plantarum* (conformado por las especies *L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. pentosus*) y 6 al grupo *Lactobacillus casei* (conformado por las especies *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*). A partir de estos resultados se seleccionaron cepas candidatas para futura caracterización de su capacidad para colonizar el tracto gastrointestinal y producir GABA tanto in vitro e in vivo.

# Introducción

## Microbiota intestinal

La microbiota intestinal es una gran comunidad microbiana (aproximadamente  $10^{14}$  microorganismos) que reside en el intestino y vive en simbiosis con su hospedero (Collins et al., 2012). En dicha comunidad predominan las bacterias, aunque también se encuentran arqueas, virus, hongos y protozoarios. La microbiota intestinal está compuesta por más de 1000 especies de bacterias y más de 7000 cepas, las cuales pertenecen principalmente a los filos Bacteroidetes y Firmicutes y en menor cantidad Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia (Dinan et al., 2012).

La microbiota intestinal (MI) contribuye con la salud del hospedero de varias maneras. Las principales son la digestión de polisacáridos complejos (Hooper et al., 2010), la protección del hospedero frente a patógenos a través de varios mecanismos, como la exclusión competitiva y la producción de péptidos antimicrobianos, y la estimulación de la respuesta inmune (Dunne et al., 1999).

Se cree que la digestión de polisacáridos complejos fue el impulsor detrás de la evolución de la relación entre los mamíferos y los microorganismos que forman la microbiota intestinal. Esto les ha otorgado a los mamíferos un metagenoma adaptable que codifica para una gran diversidad de enzimas sacarolíticas que le permiten al huésped obtener nutrientes de alimentos que no puede digerir con sus propias enzimas (Hooper et al., 2010).

Existe una gran variabilidad en la composición de la microbiota intestinal, incluso a nivel interpersonal, que es influida por factores tanto intrínsecos como la variabilidad genética entre individuos y la edad, así como extrínsecos como infecciones, enfermedades y principalmente la dieta (Claesson *et al.*, 2011; Salonen *et al.*, 2014).

Existe asimismo una íntima relación entre la microbiota y las células del tejido intestinal, incluyendo células epiteliales, células inmunes y nerviosas. Se ha demostrado que las bacterias de la microbiota intestinal pueden modular algunas

funciones de las células del hospedero. Por ejemplo, en comparación con ratones criados en ambientes estériles, sin la posibilidad de generar una microbiota intestinal propia (ratones *germ-free*), se determinó que la microbiota intestinal estimula la maduración de las células del epitelio entérico llevando a una mejor absorción de nutrientes por cambios en la expresión de proteínas canales de membrana Na<sup>+</sup>/glucosa, además de proteínas de transporte de lípidos y lipasas (Hooper *et al.*, 2001). A su vez, la microbiota puede estimular varios procesos como la reparación del tejido epitelial a través de la activación de los receptores tipo Toll (TLR), que generan señales que reclutan células mieloides, las cuales estimulan la proliferación del tejido epitelial. Además, se ha visto que ciertas bacterias pueden activar la rama antiinflamatoria del sistema inmune, ya sea por la inducción de la expresión de citoquinas antiinflamatorias (como IL-10) o por la diferenciación de linfocitos T<sub>reg</sub>. Esto se vio con ratones gnotobióticos a los cuales se administró un cóctel de bacterias y se pudo observar una expansión de la población de linfocitos T<sub>reg</sub> de los cuales una fracción expresaban IL-10 (Hooper *et al.*, 2012).

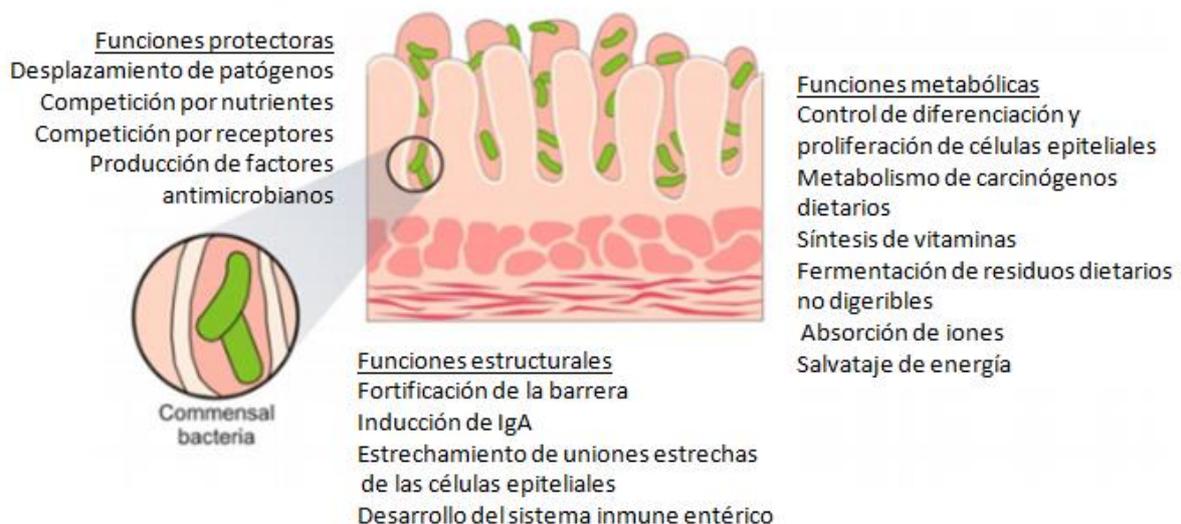


Figura 1: Funciones de la MI. Modificado de Grenham *et al* 2011

A su vez, esta interacción se da en la dirección contraria ya que la composición de la microbiota intestinal puede ser regulada a través de la acción del sistema inmune entérico del hospedero. Una de estas formas de regulación es la estratificación de la MI causada por la capa de mucina secretada por las células caliciformes, que recubre el epitelio intestinal. Esta capa de mucus separa a la MI del epitelio intestinal y su grosor y tipo de estratificación varían a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI).

En el colon, forma una barrera más gruesa, con una capa de mucus fija y otra laxa donde reside la mayor parte de la población bacteriana (Johansson *et al.*, 2008). En otras zonas del intestino en las cuales la capa de mucina no se encuentra tan desarrollada, la estratificación se da en parte por proteínas antimicrobianas secretadas por células epiteliales bajo el control de receptores de tipo Toll (Brandl *et al.*, 2007).

Otro agente que cumple un rol en la estratificación es la inmunoglobulina A, secretada por linfocitos B residentes en las placas de Peyer, activados por células dendríticas que censan a las bacterias capaces de atravesar la capa de mucus luminal y las células epiteliales (Macpherson *et al.*, 2004).

## Eje Microbiota-Intestino-Cerebro

Además de la relación entre la microbiota con las células epiteliales e inmunes del tejido intestinal, también existe una relación con el sistema nervioso. Sudo y col. (2004) observaron que ratones *germ-free* respondieron de forma exacerbada a pruebas de respuesta ante el estrés inducido en comparación con controles normales. Esta respuesta exacerbada pudo ser revertida a través de una recolonización bacteriana intestinal. Sakar y col. (2016) explicaron que estos resultados sobre el comportamiento podrían ser a causa de modificaciones en el eje Microbiota-Intestino-Cerebro (eje M-I-C). Éste se define como el canal de comunicación bidireccional entre la microbiota intestinal y el cerebro que abarca al sistema nervioso central, el sistema neuroendocrino y neuroinmune, el sistema nervioso autónomo y el sistema nervioso entérico (Grenham *et al.*, 2011).

Los sistemas digestivo y nervioso se encuentran relacionados debido a que durante la embriogénesis ambos tejidos se originan de la cresta neural y se desarrollan en conjunto influenciándose entre ellos mediante señales moleculares (Chen *et al.*, 2013).

En el centro de este eje M-I-C se encuentra el sistema nervioso entérico, cuyo brazo efector integra señales para generar respuestas fisiológicas como la secreción y la motilidad intestinal, además de modular la actividad inmune, ya que la mayoría de

las células inmunes tienen receptores para neurotransmisores. Su brazo aferente recibe señales de los nervios sensoriales entéricos y las envía al cerebro. Señales químicas como la presencia de endotoxinas bacterianas y citoquinas proinflamatorias generan impulsos nerviosos que indican al cerebro el estado de infección bacteriana a nivel entérico (Furness *et al.*, 2012).

El sistema nervioso autónomo se encarga por su parte de inhibir o estimular la función intestinal, dependiendo del contenido intestinal generado por el catabolismo de alimentos por parte de los microorganismos de la MI y la digestión. Este sistema está íntimamente conectado con el sistema límbico, responsable de los instintos y comportamientos. Esta comunicación provee el circuito neural necesario para explicar la relación entre el comportamiento y la función intestinal tanto en salud, así como en enfermedad (ej. síndrome de colon irritable) (Collins *et al.*, 2012).

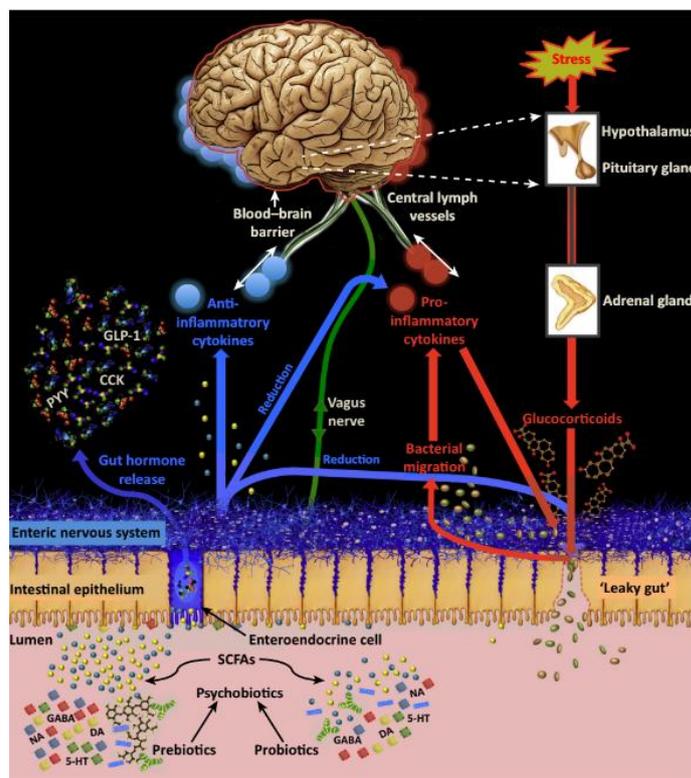


Figura 2: Esquema grafico del eje microbiota-intestino-cerebro y sus distintas vías de señalización bidireccional, extraído de Sarkar *et al* 2016.

Los microorganismos de la MI influyen en este eje a través de varios mecanismos, como la estimulación de la secreción de citoquinas antiinflamatorias por las células del hospedero. Se conoce que la exposición crónica a altos niveles de citoquinas

pro-inflamatorias puede llevar a desórdenes neuropsiquiátricos y depresión (Cyran *et al.*, 2012; Dowlati *et al.*, 2010; Logan *et al.*, 2005).

Otros mecanismos no se basan en la estimulación de células, sino en la generación de metabolitos secundarios, que llevan a cambios en el sistema nervioso del huésped. Algunos de estos metabolitos secundarios son neurotransmisores. La serotonina es un neurotransmisor neuromodulador fundamental del sistema nervioso humano. Por otra parte, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio de la sinapsis. La secreción de estas moléculas por parte de las bacterias suele ser parte del catabolismo de los aminoácidos, siendo el triptófano el precursor de la serotonina y el ácido glutámico el del GABA (Wall *et al.*, 2014).

La secreción bacteriana de serotonina es responsable de la mayor parte de su concentración en sangre. Se ha observado que en ratones normales los niveles de serotonina fueron 2.8 veces más altos en comparación con ratones *germ-free* (Sarkar *et al.*, 2016). El GABA secretado por bacterias es esencial en casos de humanos que padecen de ansiedad o depresión, neuropatologías que se asocian a desequilibrios en los niveles de GABA en sangre (Misra *et al.*, 2017).

Otros metabolitos producidos por la MI que llegan a influir en este eje son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), productos del metabolismo de polisacáridos complejos. Estos AGCC que incluyen al acetato, butirato, lactato y propionato (Qin *et al.*, 2010), se absorben a nivel del intestino delgado y son dirigidos principalmente al tejido muscular esquelético y al hígado, aunque algunos llegan al cerebro, donde atraviesan la barrera hematoencefálica activando áreas específicas del cerebro (Dockray *et al.*, 2014).

Los AGCC también estimulan a las células enteroendocrinas a liberar péptidos hormonales como el PYY (péptido tirosina-tirosina), el GLP-1 (*glucagonlike peptide-1*) y la colecistoquinina, los cuales inhiben la motilidad intestinal y disminuyen el tránsito, mejorando así la absorción de nutrientes (Zhang *et al.*, 2009). A su vez, estas hormonas tienen la capacidad de modificar neuronas de forma epigenética al penetrar la barrera hematoencefálica, generando una cascada de señalizaciones

que llega a generar modificaciones como deacetilaciones en sus histonas (Stilling *et al.* 2014).

Modificaciones en este eje afectarían la homeostasis en el resto del organismo y por lo tanto se han abierto nuevos campos de estudio para diversos problemas en la salud.

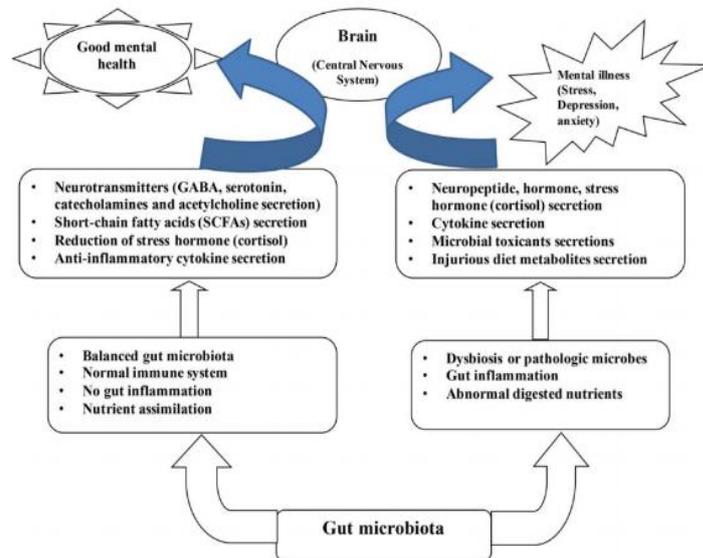


Figura 3: Mecanismos de acción a través de los cuales la MI puede llegar a afectar la salud mental. Extraído de Misra *et al.* 2017

## Probióticos

En el 2013, la *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) organizó un encuentro de expertos de distintas áreas asociadas a los probióticos y sus aplicaciones, para generar una actualización del conocimiento y ajustar el concepto de probiótico, establecido por la Organización Mundial de la Salud junto con la Organización para la alimentación y agricultura en el 2002 (FAO/WHO *et al.*, 2002). En dicha instancia se definieron los probióticos como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero (Hill *et al.*, 2014).

El uso de probióticos es una práctica ampliamente utilizada tanto en seres humanos como en animales (Ducatelle *et al.*, 2015). Principalmente se han utilizado cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* debido a distintas

características intrínsecas de estos géneros, como considerarse bacterias de tipo GRAS (*generally regarded as safe*) por cumplir con la normativa de seguridad para su consumo establecida por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los EEUU. (Wessels et al., 2004). Se los considera parte de la microbiota normal de los mamíferos (Reid et al., 1999) y poseen características deseables en productos comerciales como la capacidad de resistir distintos procesos de conservación (ej. liofilización) (Vinderola et al., 2017).

Reid y colaboradores (2019), establecieron una serie de requerimientos mínimos para la evaluación de un microorganismo para ser llamado probiótico en concordancia con lo establecido por la ISAPP.

- Los microorganismos deben estar vivos y en números suficientes cuando se administran.
- Los microorganismos deben estar identificados genéticamente a nivel de cepa, utilizando la terminología actual.
- Se deben realizar estudios de tamaño y diseño apropiados utilizando la cepa en el huésped al que está destinado el probiótico (tanto humanos como especies animales).
- Cepas que muestren dar un beneficio con respecto a alguna condición, pueden no ser probióticos para otra aplicación.
- Cepas que son probióticas para humanos, pero están estudiadas en modelos animales deben aclarar su designación como probióticos para humanos bajo testeo experimental.

Los probióticos generalmente son aislados de la microbiota de individuos sanos de la misma especie a la cual se desee administrar, ya que se considera que están adaptados a las condiciones presentes dentro del tracto gastrointestinal (TGI) (Fuller et al., 1989; Morelli et al., 2000; Vazquez Zeballos et al., 2014).

También existen numerosos trabajos en los cuales se han aislado bacterias con potencial probiótico de distintas fuentes, principalmente de alimentos fermentados como yogures y quesos. Se ha visto que, en estos ambientes, las bacterias aisladas pueden tener distintas características y una mayor variedad de genes que le

permitan adaptarse a la variabilidad del ambiente en el que viven (Parvez *et al.*, 2006; Gueimonde *et al.*, 2004; Maragkoudakis *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2011).

Los mecanismos de acción propuestos para los probióticos son muy variados y generalmente son cepa-específicos. Muchos se basan en la modulación de la MI de forma de generar cambios en las vías de comunicación entre ésta y el hospedero, generando cambios a nivel sistémico que llevan a una mejora en la salud del mismo.

Si el objetivo es la administración oral, se busca que las cepas resistan la acción de sales biliares y medios ácidos para sobrevivir al tránsito gastrointestinal (Bezkorovainy *et al.*, 2001). También se procura que muestren una adhesión tanto a mucus como a las células del epitelio intestinal con el fin de ver si son capaces de permanecer en el lumen intestinal para cumplir su función y competir por sitios de colonización con posibles patógenos (Izquierdo *et al.*, 2008; Vinderola *et al.* 2017).

## Psicobióticos

Debido a los avances de las últimas dos décadas en cuanto al esclarecimiento de los mecanismos intrínsecos de funcionamiento del eje M-I-C y el avance en la caracterización de probióticos, surge el concepto de psicobióticos. Según Dinan y colaboradores (2013) se definen como microorganismos que, al ser ingeridos en cantidades adecuadas, producen un beneficio en la salud de pacientes que padecen de alguna enfermedad psiquiátrica. En 2016, Sarkar y colaboradores expandieron esta definición y plantearon que no sería necesaria la condición de la enfermedad psiquiátrica para tener efectos sobre la salud mental del hospedero.

Existe una gran variedad de mecanismos de acción a través de los cuales los denominados psicobióticos podrían ejercer su función. La mayoría de estos ya fueron nombrados en la sección sobre la comunicación entre la microbiota y el cerebro a través del eje M-I-C (Wall *et al.*, 2014).

Debido a la novedad de la temática, la mayoría de la evidencia se encuentra en estudios en modelos con roedores en los cuales se han visto los efectos que pueden

llegar a tener sobre trastornos como la depresión y la ansiedad (Desbonnet *et al.*, 2008; Bravo *et al.*, 2011; Logan *et al.*, 2005).

En uno de estos estudios, Bravo y col. (2011) analizaron los mecanismos de acción de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* en ratones. En este estudio, la administración de esta cepa causó una reducción en niveles de ansiedad en el test de puente elevado (un modelo de evaluación de comportamientos de tipo-ansiedad), y una reducción de la elevación inducida por estrés de corticosterona en sangre. A su vez, se determinó que en estos ratones hubo un aumento en receptores de GABA (GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>) en células del sistema nervioso central. Alteraciones en estos receptores se han relacionado con comportamientos de ansiedad y depresión en modelos animales (Cyran *et al.*, 2005). Posteriormente se repitió el mismo experimento, pero realizando una vagotomía (corte del nervio vago). En este caso no se observó ninguno de los efectos tipo-ansiolítico ni aumento en la expresión de receptores, lo que indicaría que la vía por la cual los psicobióticos ejercen sus efectos es principalmente a través del nervio vago (Bravo *et al.*, 2011).

Desbonnet y col. (2008; 2010) analizaron el efecto de la ingestión crónica de una cepa de *Bifidobacterium infantis* en ratones bajo un modelo de tipo-depresión inducida por separación maternal temprana. En este modelo, los ratones separados de la madre respondieron de manera negativa en el test de nado forzado (un modelo de evaluación de comportamientos de tipo-depresión), y mostraron un aumento en la expresión de ciertas citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Tras el tratamiento con *B. infantis*, se revirtió el comportamiento tipo-depresivo en el test de nado forzado, disminuyeron los niveles de citoquinas proinflamatorias y aumentó la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10.

Entre éstos y otros trabajos sobre la temática, se ha visto que la utilización de una cepa bacteriana para tratar distintas neuropatologías es algo viable, aunque su mecanismo de acción es cepa-específico y debe ser caracterizado. También es común que cepas con claro efecto en modelos animales, no se traduzca en efectos en humanos. Esto probablemente se deba a diferencias en la composición de la MI, la fisiología de las redes neurales del nervio vago y el grado de desarrollo del sistema nervioso en seres humanos en comparación con especies animales (Kelly *et al.*, 2017).

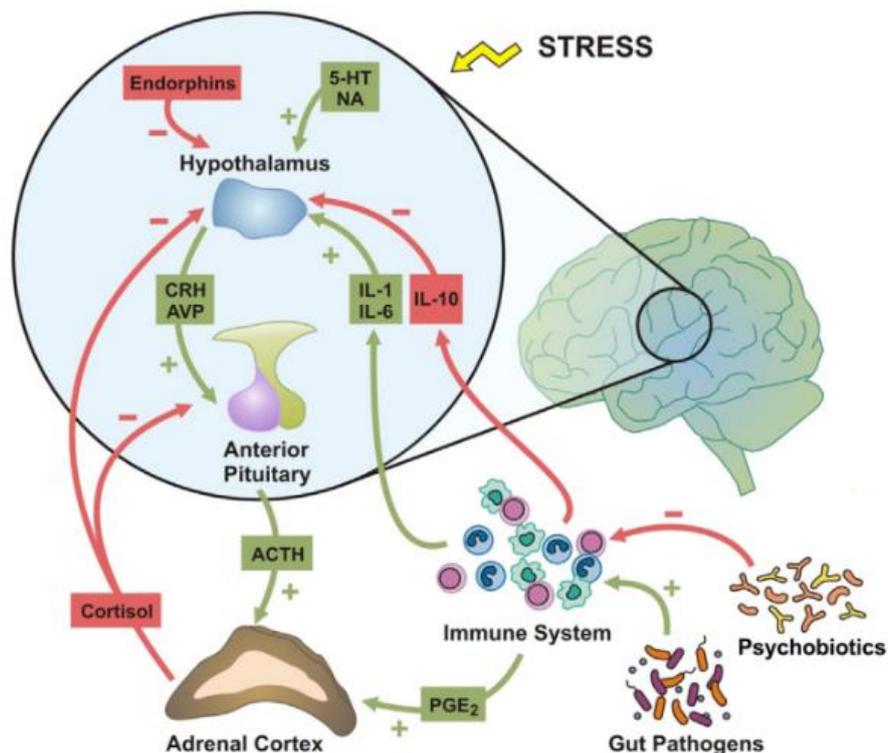


Figura 4: Esquema de posible mecanismo de acción de psicobióticos a mediante la modulación del sistema Inmune elevando la expresión de citoquinas antiinflamatorias e inhibiendo el eje hipotalámico-pituitario-adrenal, activado en situaciones de estrés. Extraído de Dinan *et al* 2013

Debido a esto, los ensayos clínicos hasta el momento son pocos y no poseen una gran profundidad. Aun así, ciertos trabajos han mostrado resultados prometedores con una mejora en pacientes que consumieron de forma oral alimentos fermentados con microorganismos con potencial psicobiótico y mostraron un decaimiento en niveles de ansiedad y estrés (Selhub *et al.*, 2014; Akkasheh *et al.*, 2016; Pinto-Sánchez *et al.*, 2017).

Otros estudios analizaron el efecto de formulaciones probióticas (*Lactobacillus helveticus* R0052 y *Bifidobacterium longum*) en los niveles de estrés, ansiedad, depresión y el humor en general de 55 voluntarios masculinos y femeninos (Messaoudi *et al.*, 2011). Los individuos ingirieron la formulación diariamente por 30 días y se les realizaron pruebas analizando los niveles de ansiedad, depresión y estrés, además de analizar la cantidad de cortisol en orina (indicador fisiológico de estrés). Se vio así que hubo una disminución en los niveles de estos comportamientos y los valores de cortisol urinario disminuyeron, tanto en los individuos sanos, así como los que, en las mediciones iniciales, mostraron índices

de depresión y ansiedad. Esto evidenciaría la actividad de estos microorganismos como psicobióticos. Experimentos posteriores del grupo buscaron efectos deletéreos de esta formulación y no encontraron que se generaron disfunciones en la memoria y el aprendizaje ni generó adicción, lo cual afirma la inocuidad del producto (Messaoudi *et al.*, 2011).

También se evidenció que existió un cambio en la conectividad neuronal entre ciertas regiones del cerebro durante una tarea de reconocimiento emocional en mujeres sanas que consumieron crónicamente lácteos fermentados adicionados con la cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subesp *lactis* I-2494 (Tillish *et al.*, 2013). De esta forma se mostró la relación entre la MI con la función cerebral, pero como en la mayoría de los trabajos realizados en humanos no se esclarece sobre posibles mecanismos de acción.

## GABA

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico o GABA por sus siglas en inglés, es un aminoácido no proteico de estructura simple, con una cadena de cuatro carbonos con un grupo carboxilo en un extremo y un grupo amino en el otro (Dhakal *et al.*, 2012).

Se encuentra en todos los dominios de la vida, desde bacterias hasta mamíferos superiores, y cumple distintas funciones de acuerdo con el organismo. En mamíferos funciona como el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (Ting Wong *et al.*, 2003), manteniendo el equilibrio entre señales excitatorias e inhibitorias.

Además de esto, a esta molécula se le han atribuido una gran variedad de actividades biológicas, como la mejora de la respuesta inmune en el cerebro, ya que la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> presentes en las neuronas, reduce la actividad de distintas señales proinflamatorias dentro de la célula (Crowley *et al.*, 2016). También se ha visto que, en pacientes con ansiedad y depresión, los niveles sanguíneos y cerebrales de GABA y de sus receptores en ciertas neuronas, se encuentran significativamente disminuidos (Kauleff *et al.*, 2007; Misra *et al.*, 2017; Möhler *et al.*, 2012).

Existen trabajos que afirman que este compuesto inhibe el crecimiento tumoral en ratones bajo un modelo de estrés, principalmente por la reducción del estrés inducido (Al-Wadei *et al.*, 2011). A su vez, se ha visto que la ingestión de alimentos conteniendo GABA podría generar efectos de tipo hipotensor (Nishimura *et al.*, 2016; Inoue *et al.*, 2003), antidepresivo (Ko *et al.*, 2013; Misra *et al.*, 2017) y antiestrés (Nakamura *et al.*, 2009).

En ciertas cepas de los géneros bacterianos *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, la producción de este compuesto se relaciona con un mecanismo de resistencia a pH bajos. Se produce al descarboxilar al ácido glutámico liberando uno de sus grupos carboxilo como una molécula de CO<sub>2</sub> y consumiendo un protón citoplasmático, disminuyendo así la acidez dentro de la bacteria (Su *et al.*, 2011; Selhub *et al.*, 2014). Esta reacción está catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa.

Se han realizado varios trabajos de búsqueda de bacterias ácido lácticas con producción de GABA en alimentos fermentados como yogurt, kimchi, quesos, vegetales, frutas y pescados entre otros (Kim *et al.*, 2009; Komatsuzaki *et al.*, 2005; Siragusa *et al.*, 2007; Franciosi *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2014). En estos trabajos se vio que bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. fueron los principales productores GABA.

## Glutamato descarboxilasa

La enzima glutamato descarboxilasa cataliza la descarboxilación irreversible del ácido glutámico a GABA, y utiliza piridoxal fosfato como cofactor para su función. Se encuentra distribuida tanto entre eucariotas como en bacterias y arqueas (Siragusa *et al.*, 2007).

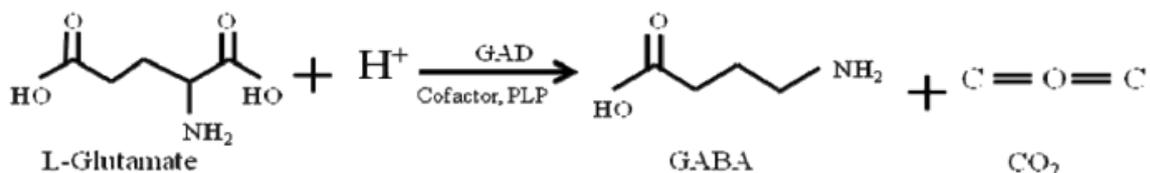


Figura 5: Reacción catalizada por la glutamato descarboxilasa extraída de Dahkal *et al.*, 2012

Como se mencionó anteriormente, en bacterias, la actividad de esta enzima cumple su función dentro de un mecanismo de resistencia a pH bajos, ya que descarboxila el L-glutamato, consumiendo así un protón citoplasmático (Teixeira *et al.*, 2014). Hasta el momento, se ha observado que las cepas del género *Lactobacillus* spp. que expresan la enzima pertenecen a las especies *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus futsaii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus senmaizukei* (Wu *et al.*, 2018).

Se considera que este mecanismo es esencial para lactobacilos que crecen en medios ácidos como los encontrados en alimentos fermentados ácidos y en procesos de fermentación de lácteos, donde el medio se acidifica a medida que avanza el proceso de fermentación, ya que mejora la competitividad en estos nichos (Su *et al.*, 2011).

Las características bioquímicas de esta enzima varían según la cepa, pero en líneas generales, su pH óptimo es de 3,8 a 4,5 (Teixeira *et al.*, 2014) y dependiendo de la especie si su isoforma funcional es un dímero o un tetrámero. Por ejemplo, en *L. paracasei* se ha visto que se presenta en forma de dímero y en *L. brevis* se ha visto como tetrámero (Komatsuki *et al.*, 2008; Hiraga *et al.*, 2008).

## Operón GAD

En lactobacilos, la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) funciona en conjunto con una proteína canal antiporter glutamato-GABA llamada GadC que cataliza el paso de una molécula de glutamato del medio externo, expulsando una molécula de GABA. Esto aumenta la disponibilidad de glutamato para que GAD pueda cumplir su función e impide la inhibición por exceso de producto. Este funcionamiento en paralelo de estas enzimas solo es viable a pH bajos ya que a pH neutros la enzima GAD se encuentra inactiva en el citoplasma y cuando el pH externo baja, ésta se transporta hacia la membrana para trabajar en conjunto con la proteína canal activando este sistema de resistencia a medios ácidos (Feehily *et al.*, 2012).

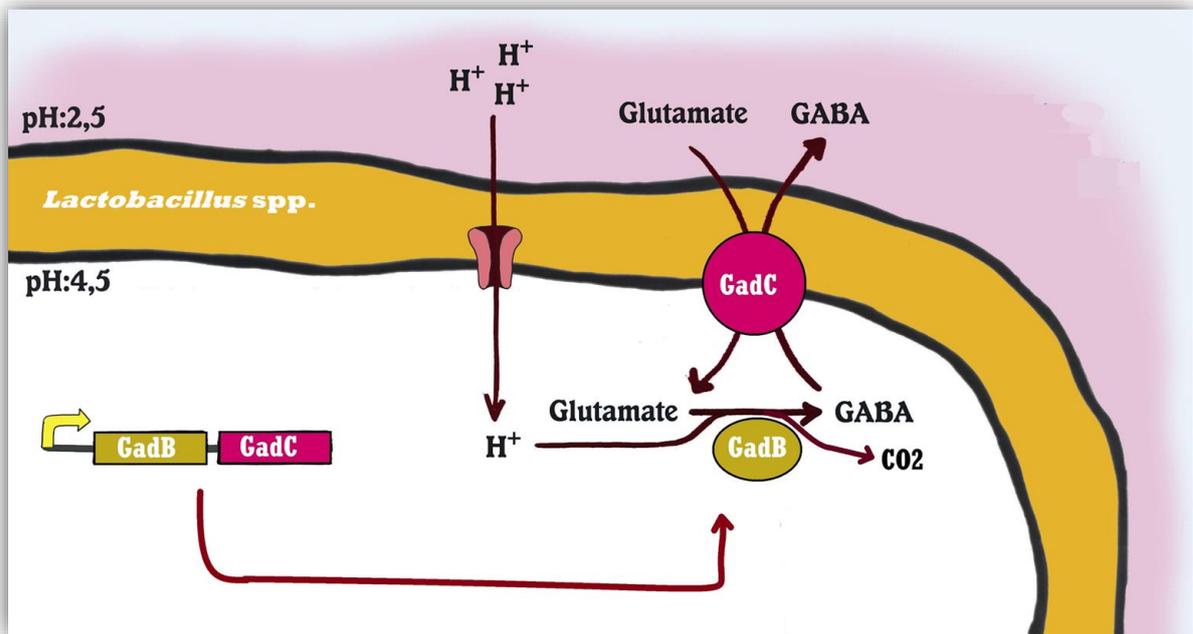


Figura 6: Ilustración de la estructura y funcionamiento del operón GAD en lactobacilos. Modificado de [tiny.cc/c3bdfz](http://tiny.cc/c3bdfz)

Los genes codificantes para estas dos enzimas se encuentran codificados en el operón *gad*, el cual es activado en situaciones de estrés ácido. En estudios metagenómicos de la MI se vio que estos genes se encuentran ampliamente distribuidos en estas poblaciones y están presentes en bacterias de los filos: Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria (Yunes *et al.*, 2016).

Este mismo estudio dio evidencia de que en *Lactobacillus spp.* de la MI, este operón se encontraría en una zona variable del genoma y podría ser intercambiado entre cepas por transferencia horizontal, llegando incluso a perderlo (Yunes *et al.*, 2016). Esto explicaría por qué ciertas cepas tienen múltiples copias de *gadB* y *gadC*, mientras que otras cepas de la misma especie contienen sólo una copia de la enzima y ninguna de la proteína canal.

## Quesería

La quesería artesanal es una gran industria a nivel nacional, generando 10000 toneladas de queso al año por 800 productores. Aproximadamente un 40% de los quesos producidos son los denominados quesos de pasta dura o semidura, también denominados quesos grana, como los quesos *Parmigiano* de Italia. Este tipo de

quesos se caracteriza por la utilización de cultivos iniciadores complejos llamados sueros fermento naturales (SFN), que junto con la microbiota natural de la leche (la cual se utiliza sin pasteurizar) son responsables de las características de estos (Gatti *et al.*, 2014).

Los SFN son asociaciones de microorganismos integrados por bacterias ácido lácticas dominantes y microorganismos no lácticos contaminantes, como las levaduras (Gatti *et al.*, 2014; Reinheimer *et al.*, 1995; Reinheimer *et al.*, 1996). Se considera que los SFN utilizados en la quesería artesanal podrían ser una fuente rica de microorganismos con potencial probiótico, ya que su población principal son bacterias ácido lácticas, como los lactobacilos, ampliamente caracterizados por tener propiedades probióticas (Maragkoudakis *et al.*, 2006; Morelli *et al.*, 2000; Vinderola *et al.*, 2016).

En nuestro país, el uso del SFN se encuentra muy extendido en comparación con el uso de iniciadores comerciales. Sin embargo, se conoce muy poco de su composición y de su potencial tecnológico (Fraga *et al.*, 2013; Reginensi *et al.*, 2013).



Figura 7: A) Agregado de SFN en el proceso de fabricación del queso. B) Adición del suero de la elaboración diaria al SFN original. C) Tanques de enfriado de SFN. Cortesía de Álvaro González Revello.

La obtención de SFN se basa en la mezcla de un cultivo original de SFN con el suero resultante de la elaboración diaria del queso, dejando enfriar gradualmente el producto a lo largo de varios días. De esta forma, ciertas cepas provenientes de la microbiota nativa de la leche son seleccionadas y la composición microbiana puede variar con el tiempo y entre los SFN de distintos productores, generando así diferencias en las propiedades de sus quesos (Bottari *et al.*, 2010; Gatti *et al.*, 2014).

A pesar de esta variedad entre productores, existe una microbiota base en los SFN, establecida por las condiciones de acidez y cambios de temperatura dados durante el proceso de fabricación del queso y la generación del nuevo SFN. Esta microbiota base está compuesta principalmente por especies de *Lactobacillus* spp. termófilos homofermentativos y en menor medida por heterofermentativos y *Streptococcus thermophilus* (Beresford *et al.*, 2001; Parente y Cogan *et al.*, 2004).

Los SFN utilizados en la quesería artesanal son una fuente rica en microorganismos con potencial producción de GABA. La presión selectiva del mismo proceso de fabricación del queso en la que se liberan grandes cantidades de aminoácidos por la proteólisis de las proteínas de la leche y la acidificación del medio, selecciona bacterias con mecanismos de resistencia a medios ácidos como lo es el operón *gad* (Feehily *et al.*, 2012; Siragusa *et al.*, 2007).

En trabajos previos realizados en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. Se aislaron bacterias del ácido láctico aisladas de SFN de productores de San José y Colonia, utilizados para la producción de quesos artesanales de tipo Grana y se determinaron sus características biotecnológicas.

A partir de esta colección es que se realizaron los ensayos enmarcados en esta tesina de grado.

# Hipótesis

La comunidad bacteriana de los sueros fermento naturales incluye microorganismos con potencial producción de GABA y cualidades básicas para su uso como probióticos.

## Objetivos generales

Identificar las cepas potencialmente productoras de GABA de una colección de aislamientos de *Lactobacillus* spp. provenientes de queserías artesanales y determinar su capacidad de resistir condiciones de acidez y sales biliares.

## Objetivos específicos

- 1) Poner a punto una reacción de PCR a tiempo final para la detección del gen *gadB* en *Lactobacillus* spp.
- 2) Identificar cepas *gadB+* por PCR a tiempo final.
- 3) Analizar la capacidad de estas cepas de resistir condiciones de medio ácido y sales biliares.
- 4) Identificar las cepas *gadB+* que muestren resistencia a medio ácido y sales biliares mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen ribosomal 16S.

# Materiales y métodos

## Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo

En este trabajo se utilizaron aislamientos de *Lactobacillus* spp. (n=101) pertenecientes a la colección del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Leche de la Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay). Estas cepas habían sido previamente aisladas de SFN provenientes de cinco queserías artesanales elaboradoras de queso tipo Grana, ubicadas en la zona de San José y Colonia, Uruguay.

Los cultivos de rutina se realizaron en placas con medio Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Merk, EU) a 37°C en microaerofilia. Para su almacenamiento las cepas fueron congeladas a -80 °C en caldo MRS adicionado con 20% de glicerol.

## Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de colonias crecidas en medio MRS agar (Merk, EU) utilizando el kit comercial GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. Finlandia), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La calidad y concentración del ADN extraído se analizó utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc. Finlandia) y el producto final fue almacenado a -20°C.

## Diseño de *primers*

Para la detección de *gadB* se diseñaron *primers* a partir de zonas conservadas del gen en distintas especies de *Lactobacillus* spp. disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI).

Estas secuencias fueron alineadas utilizando el software libre MEGAX™, mediante un alineamiento múltiple, identificando zonas conservadas en las cuales diseñar los

*primers* para la amplificación. Estos fueron diseñados con degeneraciones en su secuencia debido a la variabilidad del gen.

Las características fisicoquímicas de estos cebadores, además de su capacidad de formar heterodímeros y homodímeros fueron analizadas utilizando los softwares Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) y Vector NTI (Thermo Fisher Scientific, EU).

Una vez diseñados, estos *primers* fueron sintetizados por Macrogen Inc. (Corea del Sur).

## Amplificación de gen *gadB*

Se realizó una puesta a punto de la reacción de PCR para la amplificación del fragmento del gen *gadB* utilizando los *primers* previamente diseñados. Las secuencias de éstos fueron 5'-CYGGYTATCAAGTTTGYTGGGA-3' (GadF2) y 5'-CCDGGATAAACYAADCCRTAYTTG-3' (GadR2), cuyo tamaño esperado de amplicón de aproximadamente 375 pares de bases.

La puesta a punto fue llevada a cabo modificando levemente la temperatura de *annealing* del ciclado, además del agregado de albúmina de suero bobino (BSA) y realizando cambios en las concentraciones de los *primers*.

Las condiciones finales para la reacción fueron las siguientes: *buffer* de PCR 1X, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 8μM de mix de desoxinucleótidos trifosfato (New EnglandBioLabs™ Inc., EU), 0,72μM de cada *primer*, 1U de Platinum™Taq ADN polimerasa (Invitrogen™, Life Technologies), 0,12μg/mL de BSA y templado de ADN a una concentración entre 1 y 5 μg/mL. La reacción se realizó en un termociclador SimpliAmp ThermalCycler (Applied biosystems, Life Technologies) siguiendo el siguiente ciclado: un paso de desnaturalización inicial de 8 min a 95°C, 35 ciclos de 45 s a 95°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C, y un paso final de extensión de 8 min a 72°C.

Para confirmar la correcta amplificación del fragmento de 375 pb, se corrieron 4µL de cada mezcla de reacción en un gel de agarosa 1% en TBE 0.5X, a 110V en una cuba de electroforesis Mini-sub™ (Bio-Rad, EU).

El producto amplificado se observó mediante tinción con GelRed (Biotium™, EU) según las indicaciones del fabricante en un transiluminador de luz UV DigiDoc-It™ ImagingSystem (UVP). Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen™, Life Technologies).

Una vez puesta a punto la reacción, se confirmó la correcta amplificación mediante la secuenciación del amplicón en Macrogen Inc. (Corea del Sur).

## Resistencia a sales biliares y pH bajos

Las cepas que mostraron amplificación para el gen *gadB* fueron seleccionadas para evaluar su tolerancia a sales biliares y pH bajos siguiendo la metodología descrita por Fernández y col. (2018).

Brevemente, un cultivo *overnight* (18 horas) en caldo MRS de cada aislamiento, fue centrifugado (10 minutos a 10.000xg) y lavado dos veces con *buffer* fosfato salino (PBS). Luego se resuspendió en PBS para obtener una concentración aproximada de  $3 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) utilizando como estándar la densidad óptica de una solución McFarland 1.

Esta suspensión fue sembrada al décimo en las siguientes soluciones: caldo MRS ajustado a pH 2, caldo MRS ajustado a pH 7 conteniendo 0.3% de sales biliares (Sigma-Aldrich, USA), caldo MRS como control (pH 5,6). Los cultivos fueron incubados a 37°C por 2 horas para evaluar la resistencia a pH 2 y por 4 horas para la resistencia a sales biliares. Para determinar el nivel de resistencia se realizaron recuentos en placa antes de la incubación y al final y se compararon dichos valores restando la cantidad de UFC de ambos recuentos, se consideró resistente a las bacterias cuya disminución en la viabilidad fuera de menos de 3 órdenes de

magnitud. Los recuentos en placa se realizaron en MRS agar en microaerofilia a 37°C por 48 horas.

## Amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S

Para identificar las cepas se realizó la amplificación por PCR de un fragmento del gen ribosomal 16S utilizando los *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (Lane *et al.*, 1991).

Las condiciones para una reacción fueron las siguientes: *buffer* de PCR 1X, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 8μM de mix de desoxinucleótidos trifosfato (New EnglandBioLabs™ Inc., EU), 0,24μM de cada primer, 1U de Platinum™ Taq ADN polimerasa (Invitrogen™, Life Technologies) y templado de ADN a una concentración entre 1 y 5 μg/mL. La reacción se realizó en un termociclador SimpliAmp ThermalCycler (Applied biosystems, Life Technologies) siguiendo el siguiente ciclado: un paso de desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 1:30 min a 72°C, y un paso final de extensión de 10min a 72°C.

Para confirmar la correcta amplificación del fragmento, se corrieron 4μL de cada producto en un gel de agarosa 1% en TBE (Tris 5,4g, ácido bórico 2,75g, 2ml EDTA 0,5M pH 8,0 por litro), a 110V en una cuba de electroforesis Mini-sub™ (Bio-Rad, EU).

Las bandas se visualizaron mediante tinción con GelRed (Biotium™, EU) según las indicaciones del fabricante, se analizaron en un transiluminador de luz UV DigiDoc-It™ ImagingSystem(UVP), Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen™, Life Technologies).

Los productos de amplificación se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se procesaron con el programa BioEdit y compararon con aquellas disponibles en las bases de datos del GenBank (NCBI) mediante el programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997).

Para analizar las relaciones filogenéticas entre estas cepas se realizó un árbol de máxima verosimilitud (Tamura *et al.*, 1993) utilizando las secuencias obtenidas, y otras de referencia de distintas especies de *Lactobacillus* spp. y secuencias de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus lutetiensis*, que conformaron el *outgroup*.



Debido a la baja conservación de este gen entre especies, los mismos se tuvieron que diseñar con varias degeneraciones en su secuencia, siempre teniendo en cuenta que no se perdieran las propiedades necesarias para que este par de *primers* fuera funcional (características fisicoquímicas y formación de heterodímeros y homodímeros) (Tabla 1).

| Cebador | Secuencia 5'-3'          |
|---------|--------------------------|
| GadF2   | CYGGYTATCAAGTTTGYTGGGA   |
| GadR2   | CCDGGATAAACYAADCCRTAYTTG |

Tabla 1: Secuencia de los *primers* diseñados para amplificar el gen *gadB* en *Lactobacillus* spp.

Para poner a punto el ciclado de PCR se emplearon distintas temperaturas de *annealing*. Debido a la naturaleza degenerada de los cebadores, esta temperatura debió ser relativamente baja, ya que alguna de las combinaciones de nucleótidos tiene menor porcentaje CG, por lo que tienen una menor temperatura de *annealing*. Se consideró la temperatura óptima a la temperatura máxima a la que se dio amplificación del tamaño esperado (375 pb) sin ninguna amplificación secundaria (fig 9).

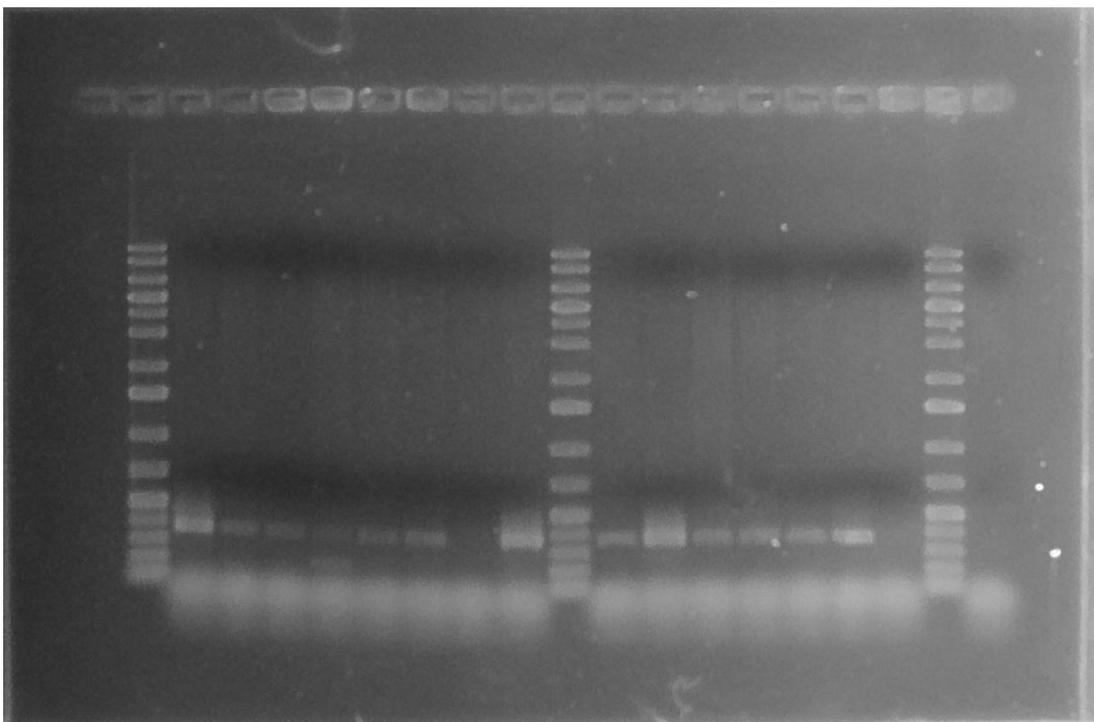


Figura 9: Gel de agarosa 1% mostrando la amplificación del fragmento de 375pb del gen *gadB* de *Lactobacillus* spp.

Finalmente, el ciclado se fijó en un paso de desnaturalización inicial de 8 min a 95°C, 35 ciclos de 45 seg a 95°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C, y un paso final de extensión de 8 min a 72°C.

De las cepas analizadas, 44 mostraron amplificación del tamaño esperado con este protocolo. Estas cepas provienen de SFN de tres productores, ubicados en los departamentos de San José y Colonia.

Para verificar que el producto de amplificación fuera la región esperada de *gadB* se secuenciaron los amplicones de tres cepas. La secuenciación y posterior tratamiento de los cromatogramas obtenidos, dio como resultado a secuencias de 296 bases de largo, las cuales se compararon con secuencias disponibles en las bases de datos del GenBank (NCBI) mediante el programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997). Todas mostraron una identidad del 100% con genes *gadB* de la especie *Lactobacillus plantarum*.

## Resistencia a pH bajos y sales biliares

Para determinar la resistencia a pH bajos y sales biliares de las distintas cepas se tomó como criterio que la disminución en viabilidad fuera de menos de 3 órdenes de magnitud luego de la incubación. De las 44 cepas *gadB+*, 25 mostraron resistencia en ambas condiciones.

A 14 cepas no se les pudo realizar el ensayo debido al pobre crecimiento a 37°C. Esto podría deberse a la metodología utilizada para su aislamiento, ya que se realizó mediante una incubación a 42°C. Debido a esto, no tendrían la capacidad de sobrevivir en condiciones del TGI, por lo que se descartaron del ensayo.

El recuento de UFC/mL antes y después del tratamiento fue convertido a unidades log<sub>10</sub> y se calculó la diferencia entre ambos resultados (tabla 2).

| Cepa             | <sup>a</sup> Resistencia a pH=2 por 2 h | <sup>a</sup> Resistencia a 0,3% de sales biliares por 4 h | <sup>b</sup> Grupo  | Productor |
|------------------|---|---|---------------------|-----------|
| 17B              | 0,19                                    | 1,26  | <i>L. casei</i>     | 1         |
| 16               | 1,30                                    | 0,26  | <i>L. casei</i>     | 1         |
| 19A              | 0,11                                    | 0,45  | <i>L. casei</i>     | 1         |
| 17A              | 0,25                                    | 2,65  | <i>L. casei</i>     | 1         |
| 28B              | 1,10                                    | N   | -                   | 1         |
| 58               | N                                       | 2,06  | -                   | 2         |
| 117              | 0,32                                    | 2,40  | <i>L. casei</i>     | 2         |
| 119A             | -0,15                                   | -0,26   | <i>L. plantarum</i> | 2         |
| 121              | 0,12                                    | -0,10   | <i>L. plantarum</i> | 2         |
| 119B             | 0                                       | -0,29   | <i>L. plantarum</i> | 2         |
| 128B             | 0,87                                    | 4,56  | <i>L. casei</i>     | 2         |
| 130B             | 2,06                                    | 4,21  | <i>L. casei</i>     | 2         |
| 140              | 0,30                                    | 2,22  | <i>L. rhamnosus</i> | 3         |
| 131A             | 1,49                                    | N   | -                   | 3         |
| 132B             | -0,31                                   | -0,07   | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 142A             | 0,28                                    | -0,19   | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 143              | 1,73                                    | 1,11  | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 146              | -0,75                                   | -1,18   | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 145              | 1,72                                    | 1,40  | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 147              | 0,33                                    | -0,23   | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 148              | -0,13                                   | -0,23   | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 149 <sup>a</sup> | 0,60                                    | 0,87  | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 149B             | 0,80                                    | 0,82  | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 150              | 0                                       | -0,18   | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 155              | 0,02                                    | -0,02   | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 153              | 0,09                                    | 0,14  | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 162A             | 0,04                                    | 0,19  | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 162B             | -0,61                                   | -0,25   | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 164B             | -0,38                                   | -0,59   | <i>L. plantarum</i> | 3         |
| 165              | 0,10                                    | -0,17   | <i>L. plantarum</i> | 3         |

Tabla 2: a) Disminución de células viables (log 10 inicial UFC – log 10 final UFC) luego de la exposición a los tratamientos. N = no se detectaron UFC. b) Especie del aislamiento determinado por secuenciación de 16S

## Identificación molecular de cepas candidatas

La identificación de las cepas candidatas que presentaron el gen *gadB* y mostraron resistencia a ambas condiciones, se realizó mediante la amplificación, secuenciación y análisis de secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S. En todos los casos se logró amplificar un único fragmento de aproximadamente 1500 pb, correspondiente al tamaño esperado (figura 10).

Una vez obtenidas y procesadas las secuencias se compararon con las de las bases de datos del NCBI y el Ribosomal Database Project (RDP), donde se vio que de las 25 cepas candidatas, 19 poseían un alto grado de similitud (>97%) al grupo *Lactobacillus plantarum* y 6 al grupo *L. casei*. Estos resultados se confirmaron con la construcción de un árbol de máximo verosimilitud con las secuencias obtenidas en este trabajo y secuencias bajadas de las bases de datos públicas, que incluían particularmente cepas *type* (Figura 11) y dos secuencias que conformaron el outgroup. A su vez, se realizaron dos árboles más, solo con secuencias de los grupos filogenéticos mencionados para determinar las relaciones dentro de los mismos (Figura 12).

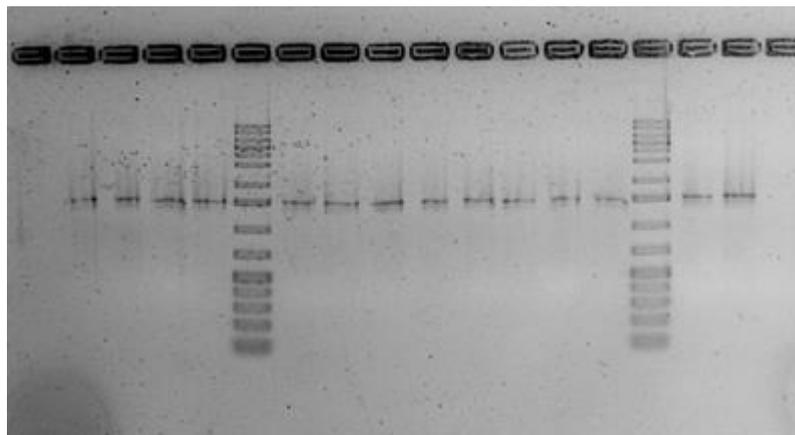


Figura 10: Gel de agarosa 1% mostrando la amplificación del fragmento de aprox. 1460pb del gen ribosomal 16S de cepas candidatas

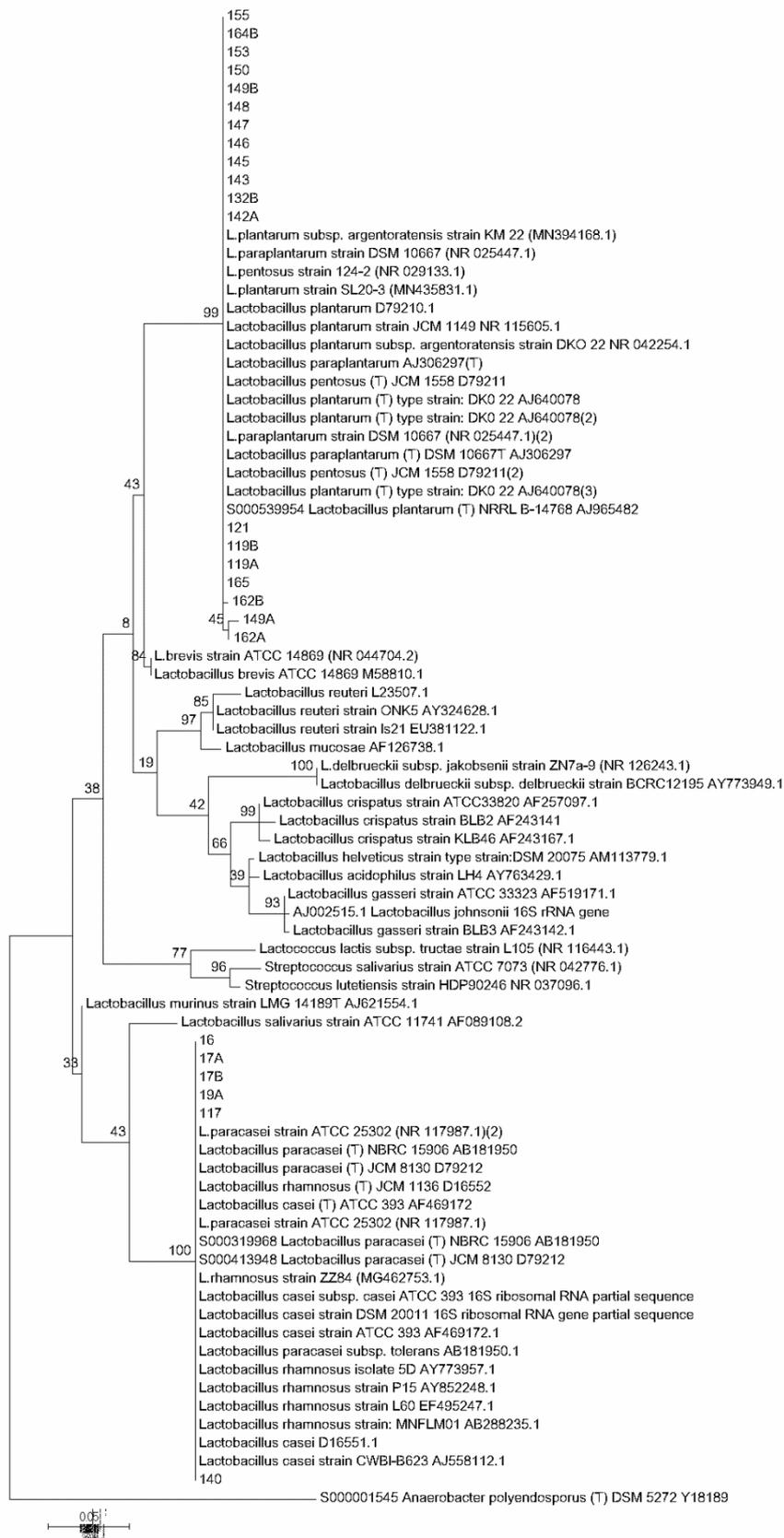


Figura 11: Relaciones filogenéticas entre las cepas candidatas y cepas de referencia, basado en las secuencias del gen ribosomal 16S. Las secuencias alineadas se analizaron con el método de Máxima Verosimilitud y los valores del bootstrap (500 réplicas), utilizando un modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros.

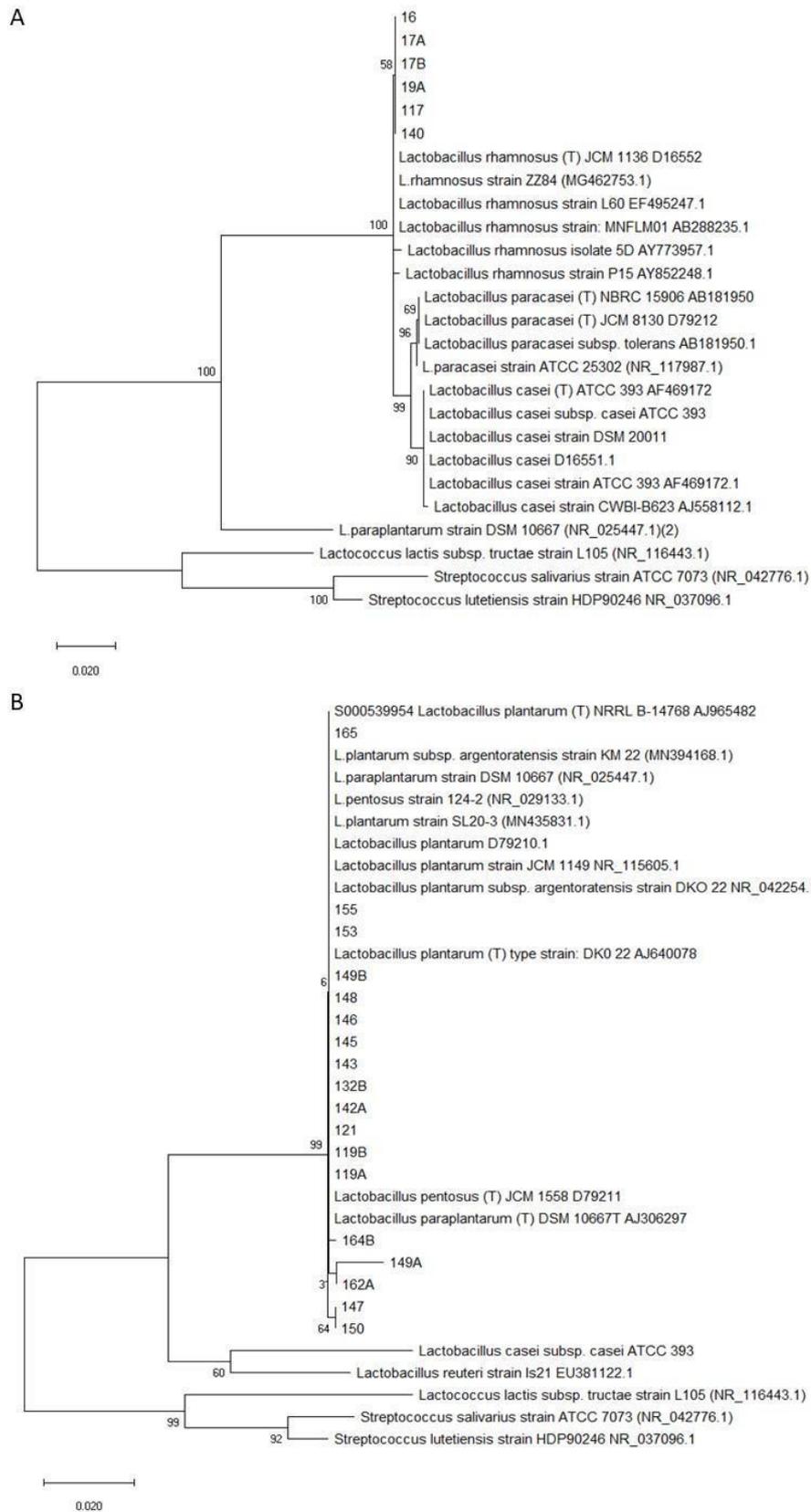


Figura 12: Relaciones filogenéticas entre las cepas candidatas y cepas de referencia de su grupo, basado en las secuencias del gen ribosomal 16S. Las secuencias alineadas se analizaron con el método de Máxima Verosimilitud y los valores del *bootstrap* (500 réplicas), utilizando un modelo de sustitución de Kimura de 2 parámetros. A) Secuencias asociadas al grupo *L. casei*. B) Secuencias asociadas al grupo *L. plantarum*

## Discusión

Los productos lácteos fermentados, tanto como los cultivos utilizados en su elaboración, son una fuente valiosa y rica de microorganismos con potencial biotecnológico.

Los microorganismos que habitan esos nichos tienen la capacidad de producir diversos metabolitos secundarios de utilidad, además de tener el valor agregado de encontrarse adaptadas a los procesos de elaboración de alimentos. También en este nicho se encuentra una gran variedad de bacterias ácido lácticas. Estas son consideradas GRAS y son las más utilizadas en formulaciones probióticas (Morelli *et al.*, 2000; Vinderola *et al.*, 2016).

En este trabajo se identificaron y caracterizaron 25 cepas de *Lactobacillus* spp. capaces de resistir condiciones similares a las encontradas en el TGI y con el gen codificante para la glutamato descarboxilasa *gadB*. Estas cepas provenientes de 3 productores de quesos artesanales pertenecen al grupo *L.casei* (n=6) y al grupo *L. plantarum* (n=19)

Debido a la gran similitud del gen ribosomal 16S entre las especies del grupo *L. plantarum* y *L. casei*, no pudimos diferenciar una especie única, por ello no se llegó al nivel de identificación a nivel de especie de estas cepas (Huang *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2018). Cuando se realizó el árbol filogenético solo con las cepas del grupo *L. casei* y el *outgroup* se pudo observar que las cepas de este trabajo se encontraban más cercanas a las secuencias pertenecientes a la especie *L. rhamnosus*, pero se deberían utilizar otros métodos complementarios para confirmar su identidad. Por ejemplo, se han propuesto otros genes como *recA* para la identificación a nivel de especie con métodos moleculares (Torriani *et al.*, 2001). De confirmarse su identidad, este trabajo sería el primero en reportar cepas pertenecientes a la especie *L. rhamnosus* que presentan el gen *gadB*.

Se encontraron cepas *gadB+* en el SFN de 3 de los 5 productores. Estas diferencias podrían deberse a que la microbiota asociada a los SFN puede tener distinta composición debido a las diferentes formas de uso y mantenimiento de los mismos (Bottari *et al.*, 2010).

En cuanto a la detección molecular de cepas de lactobacilos *gadB+*, se logró poner a punto una técnica de PCR a tiempo final, la cual fue validada mediante secuenciación del amplicón. Hasta el momento, han habido múltiples trabajos con este tipo de detección de cepas portadoras del gen, en base a *primers* específicos correspondientes a una especie de interés, como *L. brevis*, *L. plantarum* o *L. reuteri* (Texeira *et al.*, 2014; Yunes *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2011). Los *primers* diseñados en este trabajo fueron útiles para detectar este gen en cepas pertenecientes a dos grupos filogenéticos, el grupo *L. plantarum* y el grupo *L. casei*.

Un resultado novedoso de este ensayo es la presencia de *gadB* en cepas que podrían potencialmente pertenecer a la especie *L. rhamnosus*, lo cual, como se mencionó anteriormente no ha sido reportado hasta el momento ni aparece en ninguna base de datos pública. Un hecho interesante fue que la secuencia de *gadB* de estas cepas, mostraron una identidad del 100% con genes *gadB* pertenecientes a *L. plantarum*. Esta gran homología se podría explicar con lo postulado por Yunes y colaboradores (2016), quienes proponen que el operón *gad* se encuentra en una zona variable del genoma que tiene predisposición a realizar transferencia horizontal de genes. También cabe destacar que esta transferencia puede darse debido a las presiones generadas por el proceso de la producción del queso, donde se acidifica el medio, generando una presión selectiva que favorezca a organismos con genes de resistencia a estas condiciones (Feehily *et al.*, 2012).

Otro resultado inesperado fue la frecuencia en la que este gen se encontró en la colección de microorganismos. En otros trabajos similares la proporción de cepas de lactobacilos que presentaron el gen *gadB* fue de 15% (61 positivas en 400) (Siragusa *et al.*, 2007) y 1,8% (9 en 500) (Wu *et al.*, 2015). En este trabajo la proporción de cepas positivas fue de 43,6% (44 en 101).

De las 44 cepas *gadB+*, 14 no se pudieron cultivar exitosamente en caldo MRS a 37 °C. Esto probablemente se deva a que estas cepas se aislaron de SFN al cultivar las placas de MRS a 42 °C. Esta metodología de aislamiento se utiliza frecuentemente debido al potencial biotecnológico que presentan las cepas resistentes a altas temperaturas. La utilización de cepas resistentes a altas temperaturas es clave para la fabricación de ciertos tipos de quesos (Siragusa et al., 2007). A su vez, estas cepas podrían utilizarse para la generación de quesos suplementados con GABA, que se basan en la producción bacteriana de GABA durante el proceso de fermentación (Fröhlich-Wyder *et al.*, 2012). En el contexto de los objetivos de este trabajo, se decidió no seguir caracterizando estas cepas ya que su crecimiento ineficiente a 37 °C no es deseable cuando se buscan potenciales probióticos.

De las 30 cepas evaluadas en resistencia a pH bajos y sales biliares, 25 lograron resistir en ambas condiciones. De las cinco que no lo lograron, sólo una fue por no resistir condiciones ácidas. La alta proporción de resistencia a medios ácidos es concordante con el origen de las cepas, ya que son sometidas a un proceso de acidificación durante la elaboración del queso y la reconstitución del SFN, proceso en el cual se seleccionan bacterias acidófilas. El hecho de que tantas cepas resistieron la acción de las sales biliares también fue observado previamente en estudios donde analizan el potencial probiótico de cepas de lactobacilos aislados de productos lácteos, aunque no proponen mecanismos de esa resistencia (Maragkoudakis *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo reflejan y refuerzan el potencial biotecnológico de bacterias aisladas a partir de SFN, en particular su capacidad para funcionar como psicobióticos debido a su capacidad potencial para producir GABA y de resistir condiciones similares al TGI

## Conclusiones y perspectivas

A partir de SFN de productores artesanales locales se lograron identificar 25 cepas potencialmente productoras de GABA que resistieron a condiciones similares a las encontradas en el TGI. A partir de esta colección de cepas se espera continuar caracterizando sus propiedades de colonización del TGI, producción de GABA y otros factores que caractericen a estas bacterias como potenciales probióticos y psicobióticos.

Además, de acuerdo con su origen, resulta de interés analizar su potencial biotecnológico para generar alimentos funcionales, como quesos o yogures fermentados con iniciadores de cultivo que contengan estas cepas.

## Bibliografía

Akkasheh, G., Kashani-Poor, Z., Tajabadi-Ebrahimi, M., Jafari, P., Akbari, H., Taghizadeh, M., & Esmailzadeh, A. (2016). Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*, 32(3), 315-320.

Al-Wadei, H. A., Plummer, H. K., Ullah, M. F., Unger, B., Brody, J. R., & Schuller, H. M. (2012). Social stress promotes and  $\gamma$ -aminobutyric acid inhibits tumor growth in mouse models of non-small cell lung cancer. *Cancer Prevention Research*, 5(2), 189-196.

Angmo, K., Kumari, A., & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-food Science and Technology*, 66, 428-435.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International dairy journal*, 11(4-7), 259-274.

Bottari, B., Santarelli, M., Neviani, E., & Gatti, M. (2010). Natural whey starter for Parmigiano Reggiano: culture-independent approach. *Journal of applied microbiology*, 108(5), 1676-1684.

Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R. P., & Pamer, E. G. (2007). MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII $\gamma$  and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 204(8), 1891-1900.

Bravo, J. A., Scaravage, E., Chew, M., Forsythe, P., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2010). The probiotic *Lactobacillus reuteri* induces constitutive changes in central GABA receptor expression. *Abstract SFN*, 795(17), FFF2.

Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., ... & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 16050-16055.

Cho, Y. R., Chang, J. Y., & Chang, H. C. (2007). Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 104-109.

Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E. & Stanton, C. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4586-4591.

Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O'connor, E. M., Cusack, S. & Fitzgerald, G. F. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), 178.

Crowley, T., Cryan, J. F., Downer, E. J., & O'Leary, O. F. (2016). Inhibiting neuroinflammation: the role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions. *Brain, behavior, and immunity*, 54, 260-277.

Cruz, C. M. A. (2011). *Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 735.

Cryan, J. F., & Kaupmann, K. (2005). Don't worry 'B'happy!: a role for GABAB receptors in anxiety and depression. *Trends in pharmacological sciences*, 26(1), 36-43.

Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews neuroscience*, 13(10), 701.

Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., & Dinan, T. G. (2008). The probiotic *Bifidobacterium infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of psychiatric research*, 43(2), 164-174.

Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2010). Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, *170*(4), 1179-1188.

Dhakal, R., Bajpai, V. K., & Baek, K. H. (2012). Production of GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(4), 1230-1241.

Dinan, T. G., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biological psychiatry*, *74*(10), 720-726.

Dockray, G. J. (2014). Gastrointestinal hormones and the dialogue between gut and brain. *The Journal of physiology*, *592*(14), 2927-2941.

Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctôt, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological psychiatry*, *67*(5), 446-457.

Ducatelle, R., Eeckhaut, V., Haesebrouck, F., & Van Immerseel, F. (2015). A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. *Animal*, *9*(1), 43-48.

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., ... & Kiely, B. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 279-292). Springer, Dordrecht.

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*.

Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, *9*(5), 286.

Fernández, S., Fraga, M., Silveyra, E., Trombert, A. N., Rabaza, A., Pla, M., & Zunino, P. (2018). Probiotic properties of native *Lactobacillus* spp. strains for dairy calves. *Beneficial microbes*, *9*(4), 613-624.

Feehily, C., & Karatzas, K. A. G. (2013). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of applied microbiology*, 114(1), 11-24.

Fraga Coteló, M., Perelmutter Schein, K., Giacaman Salvo, S. S., Abirad, Z., Miguel, P., & Carro Techera, S. B. (2013). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. *Food Science and Technology*, 33(4), 801-804.

Franciosi, E., Carafa, I., Nardin, T., Schiavon, S., Poznanski, E., Cavazza, A., ... & Tuohy, K. M. (2015). Biodiversity and  $\gamma$ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses. *BioMed research international*, 2015.

Fröhlich-Wyder, M. T., Guggisberg, D., Badertscher, R., Wechsler, D., Wittwer, A., & Irmeler, S. (2013). The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus parabuchneri* on the eye formation of semi-hard cheese. *International dairy journal*, 33(2), 120-128.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365-378.

Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(5), 286.

Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., & Mucchetti, G. (2014). Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of dairy science*, 97(2), 573-591.

Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2004). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, 37(9), 839-850.

Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 4, 202.

Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in physiology*, 2, 94.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ...& Calder, P. C. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *NatRevGastroenterolHepatol*, 11(8), 506-514.

Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The Lactobacillus casei group: history and health related applications. *Frontiers in microbiology*, 9.

Hiraga, K., Ueno, Y., & Oda, K. (2008). Glutamate decarboxylase from Lactobacillus brevis: activation by ammonium sulfate. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 0803250825-0803250825.

Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.

Hooper, L. V., & Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 159.

Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *science*, 336(6086), 1268-1273.

Huang, C. H., Chang, M. T., Huang, M. C., & Lee, F. L. (2011). Rapid identification of Lactobacillus plantarum group using the SNaPshotminisequencing assay. *Systematic and applied microbiology*, 34(8), 586-589.

Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., & Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European journal of clinical nutrition*, 57(3), 490.

Izquierdo, E., Medina, M., Ennahar, S., Marchioni, E., & Sanz, Y. (2008). Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for Bifidobacterium longum strains. *Current microbiology*, 56(6), 613-618.

Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105(39), 15064-15069.

Kalueff, A. V., & Nutt, D. J. (2007). Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and anxiety*, 24(7), 495-517.

Kelly, J. R., Allen, A. P., Temko, A., Hutch, W., Kennedy, P. J., Farid, N., ...& Clarke, G. (2017). Lost in translation? The potential psychobiotic *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) fails to modulate stress or cognitive performance in healthy male subjects. *Brain, behavior, and immunity*, 61, 50-59.

Kim, J. Y., Lee, M. Y., Ji, G. E., Lee, Y. S., & Hwang, K. T. (2009). Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *International Journal of Food Microbiology*, 130(1), 12-16.

Ko, C. Y., Lin, H. T. V., & Tsai, G. J. (2013). Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry*, 48(4), 559-568.

Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., & Kimura, T. (2005). Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food microbiology*, 22(6), 497-504.

Komatsuzaki, N., Nakamura, T., Kimura, T., & Shima, J. (2008). Characterization of glutamate decarboxylase from a high  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(2), 278-285.

Logan, A. C., & Katzman, M. (2005). Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Medical hypotheses*, 64(3), 533-538.

Logan, A. C., Jacka, F. N., Craig, J. M., & Prescott, S. L. (2016). The microbiome and mental health: looking back, moving forward with lessons from allergic diseases. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 14(2), 131.

Macpherson, A. J., & Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303(5664), 1662-1665.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.

Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejd, A., ... & Cazaubiel, J. M. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition*, 105(5), 755-764.

Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J. F., Desor, D., Javelot, H., & Rougeot, C. (2011). Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in healthy human volunteers. *Gut microbes*, 2(4), 256-261.

Misra, S., & Mohanty, D. (2017). Psychobiotics: A new approach for treating mental illness? *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-7.

Morelli, L. (2000). In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1(2), 59-67.

Möhler, H. (2012). The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*, 62(1), 42-53.

Nishimura, M., Yoshida, S. I., Haramoto, M., Mizuno, H., Fukuda, T., Kagami-Katsuyama, H., & Nishihira, J. (2016). Effects of white rice containing enriched gamma-aminobutyric acid on blood pressure. *Journal of traditional and complementary medicine*, 6(1), 66-71.

Park, S. Y., Lee, J. W., & Lim, S. D. (2014). The probiotic characteristics and GABA production of Lactobacillus plantarum K154 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 1951-1957.

Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*, 100(6), 1171-1185.

Pinto-Sanchez, M. I., Hall, G. B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J. T., ...&Traynor, J. (2017). Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 153(2), 448-459.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., ...&Mende, D. R. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*, 464(7285), 59.

Reginensi, S. M., González, M. J., & Bermúdez, J. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 427-430.

Reid, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(9), 3763-3766.

Reid, G., &Dhir, R. (2019). Probiotics: Reiterating what they are and what they are not. *Frontiers in Microbiology*, 10, 424.

Reinheimer, J. A., Suarez, V. B., Bailo, N. B., &Zalazar, C. A. (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. *Journal of Food Protection*, 58(7), 796-799.

Reinheimer, J. A., Quiberoni, A., Tailliez, P., Binetti, A. G., & Suarez, V. B. (1996). The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina for hard cheese production. *International Dairy Journal*, 6(8-9), 869-879.

Salonen, A., Lahti, L., Salojärvi, J., Holtrop, G., Korpela, K., Duncan, S. H., ...& Louis, P. (2014). Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *The ISME journal*, 8(11), 2218.

Sarkar, A., Lehto, S. M., Harty, S., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Burnet, P. W. (2016). Psychobiotics and the manipulation of bacteria–gut–brain signals. *Trends in neurosciences*, 39(11), 763-781.

Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(22), 7283-7290.

Stilling, R. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbial genes, brain & behaviour–epigenetic regulation of the gut–brain axis. *Genes, Brain and Behavior*, 13(1), 69-86.

Su, M. S., Schlicht, S., & Gänzle, M. G. (2011, December). Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation. In *Microbial cell factories* (Vol. 10, No. 1, p. S8). BioMed Central.

Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X. N., ...& Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *The Journal of physiology*, 558(1), 263-275.

Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.

Teixeira, J. S., Seeras, A., Sanchez-Maldonado, A. F., Zhang, C., Su, M. S. W., & Gänzle, M. G. (2014). Glutamine, glutamate, and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food microbiology*, 42, 172-180.

Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., ...& Mayer, E. A. (2013). Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*, 144(7), 1394-1401.

Ting Wong, C. G., Bottiglieri, T., & Snead III, O. C. (2003). Gaba,  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 54(S6), S3-S12.

Torriani, S., Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8), 3450-3454.

Vázquez Zeballos, S. E. (2014). Identificación y caracterización de un aislamiento nativo del género *Lactobacillus* con propiedades probióticas y su potencial uso en la industria láctea.

Vinderola, G., Gueimonde, M., Gomez-Gallego, C., Delfederico, L., & Salminen, S. (2017). Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. *Trends in food science & technology*, 68, 83-90.

Wall, R., Cryan, J. F., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Dinan, T. G., & Stanton, C. (2014). Bacterial neuroactive compounds produced by psychobiotics. In *Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease* (pp. 221-239). Springer, New York, NY.

Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E. B., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., ...& von Wright, A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in food science & technology*, 15(10), 498-505.

Wu, Q., & Shah, N. P. (2015). Gas release-based prescreening combined with reversed-phase HPLC quantitation for efficient selection of high- $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, 98(2), 790-797.

Wu, C. H., Hsueh, Y. H., Kuo, J. M., & Liu, S. J. (2018). Characterization of a potential probiotic *Lactobacillus brevis* RK03 and efficient production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in batch fermentation. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 143.

Yunes, R. A., Poluektova, E. U., Dyachkova, M. S., Klimina, K. M., Kovtun, A. S., Averina, O. V., ... & Danilenko, V. N. (2016). GABA production and structure of *gadB/gadC* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe*, 42, 197-204.

Zhang, H., DiBaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., ...& Krajmalnik-Brown, R. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7), 2365-2370.

