



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A. C.**

**SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
NATIVAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO γ -
AMINOBUTÍRICO AISLADAS A PARTIR DE QUESOS
ARTESANALES MEXICANOS**

Por:

Carmen Guadalupe Manzanarez Quin

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Diciembre, 2016

APROBACIÓN

Los miembros de comité designado para la revisión de la tesis de Carmen Guadalupe Manzanarez Quin, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



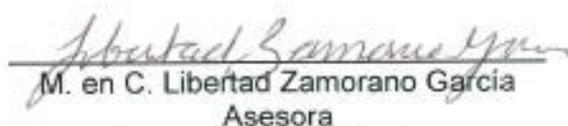
Dr. Aaron Fernando González Córdova
Director de Tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland
Asesora



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor



M. en C. Libertad Zamorano García
Asesora



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Asesor



M. en C. Guillermina García Sánchez
Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), por abrirme las puertas de sus instalaciones para poder realizar mis estudios de posgrado.

A Dios por permitirme culminar esta etapa tan importante de mi vida y por darme la fortaleza de seguir luchando por mis objetivos.

A mi Director de tesis, Dr. Aarón Fernando González Córdova, por haberme aceptado como su alumna y por todo el apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo de tesis.

A mi Asesora, la Dra. Belinda Vallejo Galland por el tiempo dedicado en el desarrollo del trabajo y por los consejos dados para el enriquecimiento del mismo.

A mi Asesor, el Dr. Adrián Hernández Mendoza, por tener siempre la mejor disposición para ayudar durante todas las etapas de este trabajo y por alentarme a fortalecer mis conocimientos, así como también por la paciencia al momento de corregir tanto el poster presentado como la misma tesis.

A mi Asesora, la M. en C. Libertad Zamorano García, por todos los consejos y el apoyo brindado para reforzar los resultados obtenidos de este trabajo, así como también por facilitarme el uso del colorímetro.

A mi Asesor, el Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, por aceptarme como su alumna, por sus comentarios y correcciones que fortalecieron este trabajo.

A mi Asesora, la M. en C. Guillermina García Sánchez, por todos sus consejos y apoyo brindado.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Lácteos. En especial, quiero agradecer al M. en C. Ricardo Reyes Díaz por el apoyo técnico, por todo el tiempo dedicado para la revisión y por las aportaciones hacía el trabajo que fueron de gran ayuda. También agradezco al M. en C. Isidro Méndez y la M. en C. Carmen Estrada por el apoyo técnico brindado en la parte experimental del trabajo.

A la Dra. María de Jesús Torres Llanez, por su gran apoyo y completa disposición para el análisis cromatográfico realizado en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio que gracias a ellos el trabajo se volvió más ameno y siempre estuvieron en la mejor disposición para apoyarme en cualquier cosa que necesitara: Alex, Lulú, Eleazar, Glen, Lilia, Miguel Ángel, José, Karen, Alejandro, Aline, Wendy y mis hermanos, Erick y David.

A mis amigos y compañeros de generación de maestría: Rocío, Yuri, Cynthia, Víctor, Deyanira y Cristóbal, por todo el apoyo brindado en las horas de estudio que tuvimos.

A mis amigos Ariel, Julián y Rodrigo, por los grandes momentos compartidos y todo el apoyo incondicional brindado.

A mis amigos de universidad, Adriana, Miguel, Georgia, Alberto y Roberto, por siempre estar ahí a pesar de la distancia.

También, al resto de mis amigos que siempre han estado ahí para escucharme: Raquel, Diana Patricia, Carolina, Thania Elena, Linet, Carito, Janeth, Víctor y Cesar.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado especialmente a mis padres: Leonel Manzanarez y Santa Rita Quín, por confiar plenamente en mí y por motivarme a salir adelante en todas las metas que me propongo, apoyándome de manera incondicional.

A mis abuelitas, María del Carmen Ruíz y Ana María Talamante por todo el cariño que me tienen, en especial a mi abuelito Tomas King[†] que siempre confió en mí.

A mi tía Rosario King, que es una segunda madre para mí y siempre me ha demostrado su cariño.

A mis primas: Yadíra Astorga, Ana Astorga, Karen Manzanarez, y Anahí Manzanarez por todo el cariño brindado durante toda mi vida.

A mi mejor amiga y hermana, Ana Cecilia Altamirano, por estar siempre presente en todas las etapas de mi vida brindándome todo su apoyo y cariño incondicional, Te quiero mucho.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Generalidades de las BAL.....	3
II.2 Generalidades del GABA.....	4
II.3 GABA como Compuesto Bioactivo	7
II.4 Funciones Fisiológicas del GABA.....	8
II.5 Fuentes de Producción de GABA.....	11
II.6 BAL Productoras de GABA.....	14
II.7 Fuentes de Aislamiento de BAL Productoras de GABA	16
II.8 Mecanismo de Producción de GABA por las BAL	17
II.9 Estrategias para Mejorar la Producción de GABA por las BAL	18
II.9.1 Efecto del pH.....	19
II.9.2 Efecto de Tiempo y Temperatura	20
II.9.3 Efecto de Condiciones de Anaerobiosis	21
II.9.4 Efecto de la Concentración de Sustrato	22
III.HIPÓTESIS.....	23
IV. OBJETIVOS.....	24
IV.1 Objetivo General	24
IV.2 Objetivos Específicos.....	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
V.1 Bacterias Ácido Lácticas	25
V.2 Reactivación de Cepas de Bacterias Ácido Lácticas.....	25
V.3 Ensayo colorimétrico de la Actividad de la Enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa	28
V.4 Determinación Instrumental del Color de la Reacción de la Enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa	28
V.5 Cuantificación de la Producción de GABA por HPLC	31
V.6 Elaboración de Leches Fermentadas	32
V.7 Análisis Estadístico.....	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34

VI.1	Ensayo Colorimétrico de la Actividad de la Enzima GAD	34
VI.2	Determinación Instrumental del Color de la Reacción de la Enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa	36
VI.3	Evaluación de la capacidad de producción de GABA por BAL en estudio.	40
VI.4	Producción de GABA en Leche Fermentada por Cepas de BAL Seleccionadas.....	47
VII.	CONCLUSIONES	51
VIII.	REFERENCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química del ácido γ -aminobutírico.	5
2	Metabolismo del GABA en el Citoplasma.	6
3	Producción de GABA mediante el proceso de descarboxilación de L-glutamato.	17
4	Localización de ángulo de matiz (Hue) en la esfera de color.	30
5	Ángulo de Matiz ($^{\circ}$ Hue) de los medios de reacción de cada una de las cepas de acuerdo al método colorimétrico.	38
6	Cromatograma típico de una solución con estándar analítico de GABA.	41
7	Curva de calibración de GABA.	41
8	Cromatograma típico de GABA, producido por la cepa Q4 St A aislada de queso Fresco de Sonora.	42
9	Cromatograma típico de GABA producido por la cepa <i>Lb. brevis</i> NBRC 12005 (testigo positivo).	42
10	Cromatograma típico de GABA, producido por la cepa <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (testigo negativo).	43
11	Concentración de GABA en las muestras del ensayo colorimétrico de las cepas de BAL.	44
12	Concentraciones de GABA producido por BAL en leches fermentadas con y sin glutamato.	53

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Funciones fisiológicas del GABA.	8
2	Cepas de BAL utilizadas en el presente estudio.	26
3	Actividad de la enzima GAD de las cepas de BAL con alta capacidad productora de GABA de acuerdo a la clasificación colorimétrica visual.	35
4	Valores de pH de leches fermentadas por BAL con alta capacidad de producción de GABA.	48

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL), además de que confieren características organolépticas a los alimentos, pueden generar un efecto benéfico al consumidor a través de los metabolitos que generan durante la fermentación de la leche. Uno de estos compuestos es el ácido γ -aminobutírico (GABA), el cual es un aminoácido no proteico que posee efectos antihipertensivo, hipoglucémico, antiansiolítico y antidepresivo, entre otros. Diversas investigaciones han reportado cepas de BAL productoras de GABA, así como sus efectos benéficos, principalmente el antihipertensivo. Por otro lado, también se ha demostrado que los quesos artesanales contienen compuestos bioactivos como el GABA, producidos por las BAL, considerándolos una fuente importante de aislamiento de este tipo de microorganismos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas de BAL productoras de GABA durante la fermentación de leche. Se estudiaron 197 cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, a las cuales se les determinó la actividad de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), se evaluó la capacidad de las cepas para producir GABA de acuerdo a su actividad enzimática y se cuantificó por cromatografía líquida de alta eficiencia la concentración de GABA en leche fermentada por las cepas seleccionadas. Del total de las cepas estudiadas, 24 mostraron una alta producción de GABA de acuerdo a los ensayos colorimétricos. La capacidad de producir GABA evidenció que las cepas Q4 St A, L4 Lc B y CD33, alcanzaron significativamente ($p < 0.05$) las más altas concentraciones con 0.51, 0.49, 0.27, mg/mL de GABA, respectivamente, e incluso fueron superiores a la cepa testigo *Lb. brevis* (0.11 mg/mL). Finalmente, en leche fermentada se observó que la cepa Q4 St A fue la que presentó una mayor producción de GABA (0.031 mg/mL) y fue significativamente ($p < 0.05$) igual a L4Lcb (0.026 mg/mL) y superior a *Lb. brevis* (0.011 mg/mL), siendo esta última significativamente igual a CD33 (0.011 mg/mL). Este mismo comportamiento fue observado en leches fermentadas con glutamato añadido, donde la concentración de GABA

producido por la cepa Q4 St A fue de 0.075 mg/mL. La mayoría de las cepas productoras de GABA pertenecieron al género *Lactobacillus* y en su mayoría fueron aisladas del queso Cocido de Sonora, con excepción de la cepa Q4 St A que fue aislada de queso Freso de Sonora.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, quesos artesanales mexicanos, GABA.

ABSTRACT

γ -aminobutyric acid (GABA), which is a non-protein amino acid that has antihypertensive, hypoglycemic, antiansiolytic and antidepressant effects, among others is produced by LAB. Several investigations have reported LAB strains producing GABA. On the other hand, artisanal cheeses have shown to contain bioactive compounds such as GABA, produced by LAB, considering them as an important source of isolation of this type of microorganisms. However, there is very little research about this. Therefore, the objective of this study was to evaluate the ability of different LAB isolated from Mexican artisanal cheeses to produce GABA during milk fermentation. A total of 197 BAL strains belonging to *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* genera, were studied and their enzyme glutamic decarboxylase (GAD) activity was determined by colorimetric assays. The ability to produce GABA according to their enzymatic activity and its production in fermented milk was quantified by HPLC. From the total of strains studied, 24 showed a high production of GABA according to the colorimetric assays. The ability to produce GABA showed that Q4 St A, L4 Lc B and CD33, significantly reached ($p < 0.05$) the highest concentrations with 0.51, 0.49, 0.27 mg/mL of GABA, respectively, and were even higher than that of *Lb. brevis* strain. Finally, in fermented milk, it was observed that the strain Q4 St A had the highest GABA production (0.031 mg/mL) and was significantly ($p < 0.05$) equal to L4Lcb (0.026 mg/mL) and higher than *Lb. brevis* (0.011 mg/mL) and significantly equal to CD33 (0.011 mg/mL). This same behavior was observed in fermented glutamate-added milks, where the concentration of GABA produced by strain Q4 St A was 0.075 mg/mL. Although in this study the majority of strains producing GABA belonged to the genus *Lactobacillus* and mostly isolated from Cocido cheese of Sonora, the strain of *Streptococcus* Q4 St A was the one with the highest production capacity of GABA even increasing almost two folds the production of the *Lb. brevis* strain.

Key words: Lactic acid bacteria, Artisanal Mexican cheeses, GABA.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente en la tierra, vegetales, intestino de animales, así como también en alimentos fermentados; siendo estos últimos una importante fuente de aislamiento de cepas nativas de BAL con novedosas propiedades (Pessione, 2012). Un ejemplo de estos alimentos son los quesos artesanales, los cuales, además de ser una fuente de nutrientes muy importante, también constituyen un medio de cultivo ideal para la multiplicación bacteriana, la cual es característica del área donde se elaboran (Abd El Gawad *et al.*, 2010). Estos microorganismos, son los causantes de mejorar las características sensoriales (sabor, aroma, textura) y alargar la vida útil de este tipo de alimentos (Franciosi *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2011). Dichas habilidades que poseen las BAL, son conferidas por su capacidad de producir ácido láctico, su actividad proteolítica, síntesis de exopolisacáridos, así como también, la producción de compuestos antimicrobianos (Gobbetti *et al.*, 2010).

Además, en los últimos años ha incrementado el interés por las BAL debido a que son productoras de metabolitos a los cuales se les han atribuido efectos benéficos en la salud. Ejemplos de estos son: el ácido linoleico conjugado, bacteriocinas, péptidos bioactivos y ácido γ -aminobutírico (GABA) (Lahtinen *et al.*, 2011). Este último debido a las diferentes funciones fisiológicas que ejerce, es considerado como compuesto bioactivo en la industria alimentaria y farmacéutica (Diana *et al.*, 2014).

El GABA es un aminoácido no proteico de cuatro carbonos, el cual es producido mediante la acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), que utiliza piridoxal 5-fosfato o vitamina B₆ como cofactor y causa la descarboxilación irreversible del glutamato. Diversos estudios han comprobado que actúa en el cerebro de los mamíferos como un neurotransmisor inhibitorio y también han demostrado diversos efectos fisiológicas en humanos como: antihipertensivo, antiansiolítico y antidepresivo, entre otros (Boonstra *et al.*, 2015; Pouliot-Mathieu *et al.*, 2013; Shelp *et al.*, 1999).

Actualmente, especialistas de todo el mundo han estudiado e identificado un gran número de microorganismos provenientes de diferentes fuentes, todos ellos productores de compuestos bioactivos con diferentes funciones fisiológicas específicas en los humanos, tales como péptidos con actividad antihipertensiva, inmunomoduladora, entre otros. Así mismo, el GABA producido por las BAL es de gran importancia ya que la elaboración de alimentos fermentados que lo contengan contribuirá tanto en la nutrición como en la salud del ser humano. Sin embargo, solamente en las regiones de Asia y Europa principalmente se han interesado en este compuesto tan importante, dejando en nuestro país un campo de investigación abierto en el cual nos debemos de enfocar para poder obtener este compuesto de manera natural (Dhakal *et al.*, 2012; Diana *et al.*, 2014).

Los quesos artesanales mexicanos, poseen una diversidad de BAL presentes que podrían ser una rica fuente de bacterias con capacidad de producir GABA durante el proceso de elaboración de los diferentes quesos. Es por ellos que el objetivo de este estudio fue seleccionar cepas de BAL productoras de GABA durante la fermentación de leche.

II. ANTECEDENTES

II.1 Generalidades de las BAL

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Dicho grupo, está conformado principalmente por dieciséis diferentes géneros de bacterias, entre los que se incluyen: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Dolosigranulum* y *Globicatella* (Ongol, 2012; Ramírez *et al.*, 2011). En general, son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaerobios facultativos y ácido tolerantes; son estrictamente fermentativos y producen ácido láctico como principal producto final del metabolismo de carbohidratos (Wood, 2012).

Las BAL han sido ampliamente clasificadas de acuerdo a sus temperaturas de crecimiento, la habilidad para crecer en altas concentraciones salinas, así como también la tolerancia ácida o alcalina (Pessione, 2012). Además, se pueden dividir en dos grandes grupos de acuerdo a los productos obtenidos del metabolismo de carbohidratos: aquellas que producen únicamente ácido láctico como producto final de la glucólisis se les denomina homofermentativas, mientras que a aquellas que producen además de ácido láctico otros compuestos como acetato o etanol y cantidades significativas de CO₂ se les denominan heterofermentativas (Lahtinen *et al.*, 2011).

Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y debido a esto se han logrado aislar de diferentes fuentes como la tierra, las plantas, el tracto digestivo de mamíferos, así como también de alimentos fermentados (Ramírez *et al.*, 2011). La importancia de la utilización de las BAL en la fermentación de alimentos como la leche, carne, cereales, entre otros, es debido a que mejoran sus características sensoriales (aroma, sabor y textura) y prolongan su vida útil, tanto en productos artesanales como industriales (Leroy & De Vuyst, 2004). Actualmente, se ha incrementado el interés de estudiar a las BAL por los beneficios que sus metabolitos pueden brindar a la salud. Entre los metabolitos antes mencionados se encuentran el ácido láctico, el ácido linoleico conjugado (CLA), bacteriocinas, péptidos bioactivos y (GABA). Por lo tanto, el hecho de que presenten dichos beneficios, y que son considerados como microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS por sus siglas en inglés), les confiere un alto potencial para su utilización en la industria alimentaria y farmacéutica.

II.2 Generalidades del GABA

El GABA es un aminoácido no proteico de cuatro carbonos (Figura 1), el cual tiene un grupo amino en el carbono γ y en lugar del carbono α , es por esto que no es reconocido como aminoácido. Este compuesto es altamente soluble en agua, además es una molécula flexible que puede asumir varias conformaciones en una solución, incluyendo una estructura cíclica similar a la de prolina (Shelp *et al.*, 1999). Sin embargo, ya que no es parte de la familia de los α aminoácidos, no se considera como parte de alguna proteína, pero sí cuenta con función propia.

En 1950, Roberts y Awapara descubrieron que se encuentra en altas concentraciones en el sistema nervioso central de los mamíferos (1 mg/g) y que es indetectable en otros tejidos (Cuauhtémoc *et al.*, 2013), pero también se

encuentra en microorganismos y plantas (Shelp *et al.*, 1999). En los humanos, actúa en el cerebro como neurotransmisor de tipo inhibitor en el hipocampo de las actividades de memoria uniéndose a receptores de las membranas plasmáticas en procesos neuronales tanto pre-sinápticos como post-sinápticos (Diana Pérez, 2014; Sierra *et al.*, 2007). Por lo cual, alteraciones en los circuitos GABAérgicos están asociados con una gama de trastornos neuropsiquiátricos, incluyendo el autismo, ansiedad, esquizofrenia y epilepsia, así como también la enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Rissman & Mobley, 2011; Streeter *et al.*, 2012).

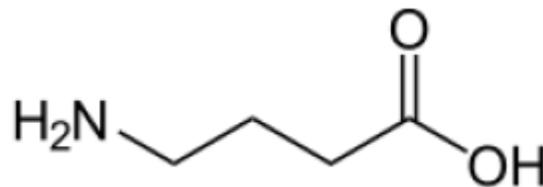


Figura 1. Estructura química del ácido γ -aminobutírico (GABA).

El GABA puede ser metabolizado en el citoplasma celular mediante la enzima γ -aminobutirato transaminasa, que también es dependiente de la enzima piridoxal-5-fosfato y se forma el ácido γ -hidroxibutanoíco y finalmente ácido succínico. Posteriormente es convertido a dióxido de carbono y agua a través del ciclo de Krebs (Figura 2) (Shelp *et al.*, 1999).

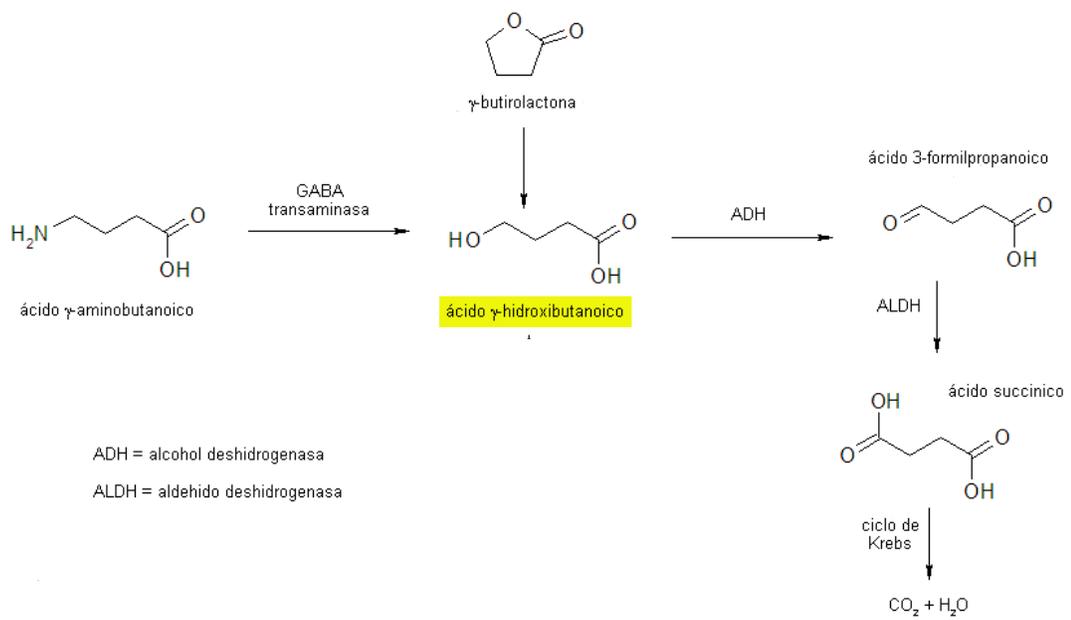


Figura 2. Metabolismo del GABA en el citoplasma.

II.3 GABA como Compuesto Bioactivo

Como se mencionó anteriormente, el GABA está presente en el cerebro de los mamíferos, así como también en microorganismos y plantas, aportando a todos ellos efectos positivos. En los últimos años, se ha convertido en una molécula bioactiva de gran interés tanto en la industria farmacéutica como alimentaria, debido a las diferentes funciones fisiológicas que promueve en humanos (Lee *et al.*, 2010). Esto último, ha permitido que en la industria de alimentos se desarrollen una gran variedad de productos fermentados a los cuales se les considera como alimentos funcionales. Ejemplos de ellos son: cereales, panes, quesos, embutidos, tés, vegetales y productos lácteos (Li & Cao, 2010; Lu *et al.*, 2008).

El término de alimento funcional surgió en Japón y es acuñado para aquellos alimentos que poseen algún efecto benéfico en una o más funciones fisiológicas del ser humano, incrementando su salud o disminuyendo el riesgo de padecer ciertas enfermedades (Gómez Romero, 2010). Algunos autores encontraron que la mayor cantidad de GABA se encuentra principalmente en productos fermentados, especialmente en productos lácteos, como lo son la leche, yogurt y quesos, los cuales presentan un alto potencial, para el manejo de la hipertensión (Pouliot-Mathieu *et al.*, 2013; Settanni & Moschetti, 2010; Siragusa *et al.*, 2007). Por lo anterior, estos alimentos son una alternativa para promover la salud y de esta forma poder reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares al mismo tiempo que aumentan la calidad de vida. Además, no tendrían ningún costo adicional en su producción debido a que no se añadiría de forma química, favoreciendo a su vez el cuidado del medio ambiente.

II.4 Funciones Fisiológicas del GABA

Numerosos estudios han probado las diferentes funciones fisiológicas del GABA, tanto en animales como en humanos, siendo el efecto antihipertensivo el más importante que se le atribuye. Ejemplo de esto último, es lo demostrado por investigaciones recientes que comprobaron que el GABA actúa a nivel cardiovascular, regulando la presión arterial y la frecuencia cardiaca debido a que inhibe la liberación de noradrenalina mediante la activación de receptores pre-sinápticos (Inoue *et al.*, 2003). La noradrenalina se libera a la sangre por la médula suprarrenal como una hormona y al unirse a los receptores adrenérgicos los activa, produciendo una respuesta de vasoconstricción; y por lo tanto una subida de la presión arterial al aumentar el tono vascular (Diana *et al.*, 2014). Así pues, al inhibir el GABA la liberación de noradrenalina se contrarrestan los efectos mencionados anteriormente. Por otro lado, tal como se muestra en la Tabla 1, este compuesto también está implicado en una amplia gama de funciones fisiológicas que actúan desde el cerebro así como en otros órganos vitales.

Tabla 1. Funciones fisiológicas del GABA.

Función fisiológica	Acción específica	Referencia
Control de trastornos mentales	- Manejo del estrés	Streeter <i>et al.</i> (2012)
	- Efecto relajante	Krystal <i>et al.</i> (2002)
	- Acción contra el insomnio	
	- Antidepresivo	Streeter <i>et al.</i> (2012)
	- Tratamiento de alcoholismo	Roberto <i>et al.</i> (2010)
Enfermedades cerebrales	- Trastornos neuronales	Diana <i>et al.</i> (2014)
	- Aumenta la memoria	Sierra <i>et al.</i> (2007)

Tabla 1. Funciones fisiológicas del GABA (continuación)

Sistema inmune	- Modulador del sistema inmune	Crowley <i>et al.</i> (2016)
Órganos vitales	- Protege al riñón de enfermedades crónicas	Tujioka <i>et al.</i> (2009)
	- Activa funciones hepáticas	
	- Aumenta la función visual	
	- Incrementa la síntesis de proteína en el cerebro	
Protector contra el cáncer	- Potente supresor tumoral	Schuller <i>et al.</i> (2008)
	- Retrasa y/o inhibe la proliferación de células cancerosas	Al-Wadei <i>et al.</i> (2012)
	- Estimula la apoptosis de células cancerígenas	Oh & Oh (2004)
Regulador celular	- Síntesis de ácido hialurónico	Han <i>et al.</i> (2007) Ito <i>et al.</i> (2007)
	- Aumenta la tasa de fibroplastos dermales	Han <i>et al.</i> (2007) Di Cagno <i>et al.</i> (2010)
	Enfermedades respiratorias	- Control del asma
Regulador hormonal	- Incrementa hormona de crecimiento - Regulación de la secreción hormonal	Parkash & Kaur (2007)

Tabla 1. Funciones fisiológicas del GABA (continuación)

Regulador hormonal	<ul style="list-style-type: none">- Regulación de la progesterona- Regulación de la hormona tiroidea- Potente segregador de insulina	Parkash & Kaur (2007)
Protector de Enfermedades cardiovasculares	<ul style="list-style-type: none">- Reduce la inflamación de artritis reumatoide- Atenúa la respuesta metabólica a las incidencias isquémicas	Kelly & Saravanan (2008)

Todas estas funciones fisiológicas dan lugar a una fuerte demanda de productos enriquecidos con GABA, ya que aunque el cuerpo humano es capaz de producir su propio suministro de GABA, esta producción a veces se inhibe por la falta de estrógeno, zinc o vitaminas así como también por un exceso de ácido salicílico y aditivos alimentarios (Aoshima & Tenpaku, 1997). Por lo que, se requiere una alimentación con alto contenido de GABA ya que en la dieta diaria típica los niveles son relativamente bajos (Oh, 2003). Recientemente, Pradeep y colaboradores (2011), sugirieron que los germinados y las legumbres son una buena fuente de GABA lo cual indica el posible desarrollo de alimentos funcionales a base de cereales.

II.5 Fuentes de Producción de GABA

En los últimos años se ha buscado la manera de producir alimentos enriquecidos con GABA, ya que en un estudio realizado por Inoue *et al.* (2003) se reportó que consumir 10 mg de GABA diarios durante 12 semanas ayuda en la reducción de la presión arterial. Por otro lado, Hudec *et al.* (2015) mencionan que el consumo de este compuesto debe de ser de manera natural ya que se ha comprobado que la suplementación de agonistas sintéticos de GABA puede tener efectos secundarios como somnolencia, mareos y en algunos casos causar adicción (De Rungs-Brown *et al.*, 2016). No obstante, el consumir alimentos que hayan sido enriquecidos con GABA no presenta ningún efecto adverso al organismo (Hudec *et al.*, 2015). Por lo tanto, es necesario encontrar nuevos métodos de producirlo e incrementar los niveles de este en los alimentos.

Las plantas al igual que los microorganismos son una importante fuente natural de producción de GABA. La síntesis de este compuesto está relacionada con múltiples respuestas fisiológicas en ellas, tales como la regulación del pH citoplasmático, el mantenimiento del balance de carbono/nitrógeno, la protección contra el estrés oxidativo, la producción de energía y en la reproducción (Takayama & Ezura, 2015; Yang, 2003). Las plantas, también responden a los cambios de concentraciones de GABA a causa de condiciones adversas (disrupciones metabólicas y/o mecánicas, anoxia, frío, calor, condiciones salinas, aire, lluvia, etc.) y también durante infecciones fúngicas (Solomon & Oliver, 2001). Por ejemplo, se conoce que en respuesta a una estimulación mecánica o por frío, los niveles de GABA en las hojas de soya incrementaron de 1 a 2 $\mu\text{mol/g}$ de peso fresco, al igual que al exponer a condiciones de anoxia a plántulas de arroz estas incrementaron su concentración de GABA por arriba de 8 $\mu\text{mol/g}$ de peso fresco (Shelp *et al.*, 1999).

Estudios demostraron que el GABA se encuentra en bajas concentraciones en las plantas, variando entre 0.03 a 2.00 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco (Banchuen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Shelp *et al.*, 1999). Debido a esto, es importante su acumulación en las plantas, ya que éste ayuda a la regulación del pH al activarse la enzima GAD, cuando se da un incremento en los niveles citosólicos de H^+ o Ca^+ . Además, el almacenamiento de este compuesto, es útil para la defensa de las plantas contra insectos fitófagos y resulta como una alternativa al uso del ácido glutámico. Por lo anterior, se han propuesto técnicas y condiciones de cultivo para la acumulación de GABA en plantas, especialmente en habas y arroz integral germinados ya que la extracción de GABA de tejidos biológicos naturales resulta difícil y a su vez difícilmente podría presentar algún beneficio o actividad biológica importante al consumirlas (Danial *et al.*, 2016).

En cuanto a los microorganismos que se ha encontrado que contienen GABA en su estructura celular se encuentran hongos, levaduras y bacterias. Ejemplos de hongos con esta característica son *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* y *Neurospora crassa* (Dhakal *et al.*, 2012). Así mismo, en un estudio realizado por Aoki *et al.* (2003), reportaron que dos especies fúngicas de *Rhizopus* produjeron altos niveles de GABA (1740 mg/100g y 1500 mg/100g de peso seco) en habas de soya fermentadas. Por otro lado, Su *et al.* (2003) obtuvieron una producción de 1.26 mg/g de GABA al fermentar arroz con la cepa de *Monascus purpureus*. No obstante, en otro estudio realizado por Jannoey *et al.* (2010) obtuvieron una producción de 28.37 mg/g utilizando esta misma especie de hongo. Sin embargo, para obtener estas concentraciones de GABA se necesitaron largos tiempos de fermentación (3 semanas) por lo que este tipo de procesos no resulta redituable.

Dentro de las levaduras reportadas con capacidad de producir GABA, se encuentran algunas cepas aisladas del océano pacífico en los mares de Japón, entre ellas una cepa de *Candida* y tres de *Pichia*, las cuáles fueron identificadas bioquímica y molecularmente por Guo *et al.* (2009). Sin embargo, otras cuatro

cepas pertenecientes al género de *Saccharomyces* de la misma colección marina mostraron una mayor capacidad de producción del compuesto y en comparación con una especie aislada de pan, se registró entre 7-10 veces mayor producción. Por lo que, el aislamiento de estas levaduras de ambientes marinos, es una buena fuente para la utilización de ellas a gran escala en la industria de elaboración de bebidas alcohólicas. Sin embargo, tendría que tomarse en cuenta las dificultades que se presentarían al momento de realizar el aislamiento ya que resultaría más complicado debido a que es un ambiente marino (Masuda *et al.*, 2008).

En cuanto a los géneros bacterianos que también han demostrado su capacidad para producir GABA se encuentran, *Listeria monocytogenes*, *Micobacterium leprae* y *Clostridium perfringens* las cuales acumulan este compuesto como un mecanismo de defensa para protegerse de los ambientes ácidos del estómago y en la creación de energía (Cotter & Hill, 2003; Karatzas *et al.*, 2012). El grupo de estudio de Jeng *et al.* (2007), reportó que el género de *Streptomyces*, logró producir grandes cantidades de GABA al fermentar té rojo. Del mismo modo, cepas aisladas del intestino humano mostraron capacidad de sintetizar dicho compuesto, sugiriendo que el colon es una fuente potencial de este compuesto bioactivo (Al Mardini *et al.*, 1991; Barrett *et al.*, 2012). Sin embargo, el grupo de bacterias productoras de GABA más estudiado son las bacterias ácido lácticas ya que son utilizadas para la elaboración de alimentos y bebidas fermentadas, además de que protegen a estos mismos del daño que microorganismos patógenos pueden ocasionarles mediante las bacteriocinas que producen (Diana *et al.*, 2014; Siroli *et al.*, 2015).

II.6 BAL Productoras de GABA

La producción de GABA por parte de las BAL resulta de especial interés para su aplicación en alimentos o ámbitos biotecnológicos. Esto, debido a que se lleva a cabo de manera natural, lo que lo hace aún más atractivo para los consumidores, además que se disminuyen los costos de producción (Hudec *et al.*, 2015). Por otro lado, la síntesis química de este compuesto no es recomendable debido a que durante su producción se utilizan sustancias corrosivas que son dañinas al medio ambiente (Dhakal *et al.*, 2012). Por lo anterior, se han realizado estudios de aislamiento e identificación de cepas productoras de GABA en diferentes países, principalmente en las regiones de Asia y Europa.

La producción de este compuesto depende en gran medida de cada cepa (cepa dependiente), por lo que se han reportado una gran cantidad de bacterias de diferentes géneros con grandes diferencias de producción entre sí. Tal es el caso del estudio realizado por Siragusa *et al.* (2007), en donde aislaron un total de 440 géneros diferentes de BAL a partir de diferentes quesos comerciales de la región de Italia. Sin embargo, solamente 61 de ellas presentaron la capacidad de producir GABA, de las cuales *Lb. brevis* PM 17, *Lb. plantarum* C48, *Lb. paracasei* PF6, *Lb. delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* PRI y *Lc. lactis* PU1, fueron las que produjeron las concentraciones más altas de GABA durante la fermentación de leche descremada (15 a 99.9 mg/kg). Lo anterior evidenció que los quesos son una fuente de aislamiento importante de microorganismos productores de GABA.

Por otro lado, Kook & Cho (2013), realizaron un estudio en el que encontraron que las especies de *Lb. brevis* OPY-1 y *Lb. brevis* OPK-3, aisladas de un alimento fermentado típico en Japón (kimchi) produjeron 0.825 g/L y 2,023 g/L, respectivamente al usarlas. Del mismo modo, el grupo de Li *et al.* (2008) reportaron que la cepa de *Lb. brevis* NCL912 aislada de Pao cai (calabaza

encurtida en china) produjo 149.05 mM de GABA al inocularse en medio MRS con glutamato monosódico (3% p/v) después de un periodo de 48 h de fermentación. En estudios recientes, Diana *et al.* (2014) reportaron una producción de GABA de 99 mM de la cepa *Lb. brevis* CECT 8182 en un medio de masa fermentada durante 24 h, proponiendo que el uso de esta cepa puede facilitar la elaboración de productos de panadería que promuevan la salud por su alto contenido de GABA.

Existen otros estudios que han reportado además de cepas de *Lb. brevis* como productoras de GABA, otros géneros de BAL con capacidad de producir el compuesto. Entre estas cepas se encuentran *Lb. paracasei*, *Lb. buchneri*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus* y *St. salivarius* subsp *thermophilus*. Sin embargo, Li *et al* (2009) reportó que la cepa de *Lb. brevis* produjo la cantidad más alta de GABA (345.83 mM). Todas estas bacterias produjeron este compuesto tras inocularlas en medio MRS con glutamato monosódico añadido, ya que es el sustrato necesario para la enzima GAD. En consecuencia, una producción alta de GABA estará dada por una alta actividad de la enzima GAD presente en sus células

Sin embargo, también se han reportado cepas de BAL que no son capaces de producir este compuesto de interés; tal y como lo reporta el grupo de trabajo de Nomura *et al.* (2000) donde una cepa de *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, la cual no es productora de GABA fue analizada y encontraron que tiene una mutación en los genes CB, lo que causa que no tenga la función antes mencionada y a su vez propuso el método de reacción de cadena de polimerasa (PCR) como una alternativa rápida para la detección de BAL productoras de GABA. Por otro lado, existen algunas bacterias que no producen cantidades significativas del compuesto, asumiendo que puede deberse a que presentan una baja actividad de la enzima GAD. Además, se cree que la fuente de aislamiento de estas bacterias, también influye en su capacidad para producir el compuesto ya que un alimento con altas concentraciones de ácido glutámico en su composición

presentará bacterias con mayor capacidad de producción de GABA (Bo & Shi-Ying, 2004).

II.7 Fuentes de Aislamiento de BAL Productoras de GABA

La mayoría de las cepas de BAL productoras de GABA se han aislado principalmente de alimentos artesanales fermentados. Estudios han reportado la producción de este compuesto por cepas aisladas a partir de kimchi (Binh *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2008). Así como también, a partir de alimentos como paocai, masa madre en la elaboración de pan, bebidas fermentadas, carnes fermentadas, entre otros, cuya característica común es un pH ácido (Diana *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2008; Rizzello *et al.*, 2008). Sin embargo, también se han reportado bacterias aisladas de alimentos frescos, tal es el caso de *Lb. brevis* CGMCC 1306 que fue aislada de leche fresca sin pasteurizar (Huang *et al.*, 2007). Ratanaburee *et al.* (2013), reportó el aislamiento de BAL a partir de carnes tailandesas fermentadas, indicando que poseen actividad antibacteriana y propiedades probióticas y también que son capaces de producir altos niveles de GABA.

Los productos lácteos, son una fuente muy importante para la multiplicación bacteriana y a su vez, la leche cruda contiene ácido glutámico como el aminoácido más abundante en esta (30 a 50 mg/mL). Debido a esto, les permite ser portadores de bacterias capaces de producir altos niveles de GABA. Por lo que en las regiones de Italia y España principalmente, se han investigado las bacterias aisladas de diferentes quesos como posibles productoras del compuesto bioactivo (Siragusa *et al.*, 2007).

A pesar que, en nuestro país se han realizado diversos estudios de BAL como potenciales productoras de compuestos antimicrobianos hasta productoras de péptidos bioactivos, aún no se reportan cepas con capacidad de producir

GABA. Por lo tanto, es de suma importancia el estudio de la producción de GABA de las BAL aisladas de quesos mexicanos, para que de esta manera se puedan desarrollar nuevos productos fermentados propios del país, que pueden ser utilizados para mejorar la salud de sus consumidores.

II.8 Mecanismo de Producción de GABA por las BAL

Las BAL producen GABA mediante la descarboxilación irreversible del L-glutamato (Figura 3), la cual es catalizada por la enzima, ácido glutámico descarboxilasa (GAD; EC 4.1.1.15) que utiliza al piridoxal 5-fosfato o vitamina B₆ como cofactor (Diana *et al.*, 2014). Esta enzima ha sido encontrada en bacterias como las BAL, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*; en hongos como *Aspergillus* y *Neurospora*; en plantas como tomate, hoja de la mora y arroz integral germinado; y en el cerebro de los mamíferos (Dhakal *et al.*, 2012).

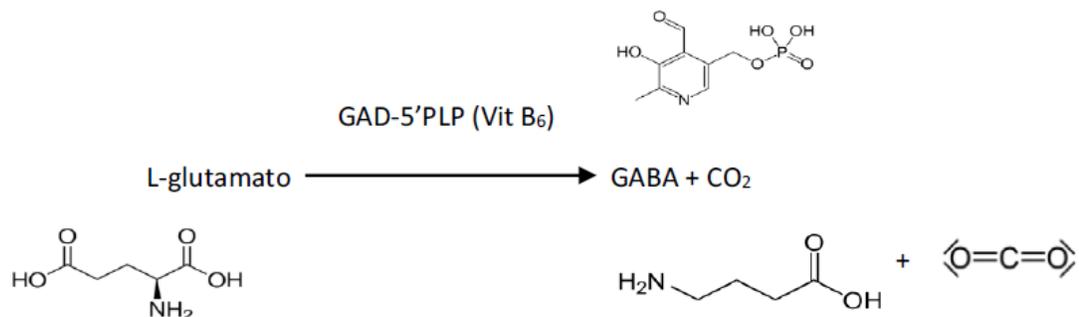


Figura 3. Producción de GABA mediante el proceso de descarboxilación de L-glutamato.

La biosíntesis de GABA por parte de las BAL se da estrictamente para protegerlas contra el estrés inducido por un descenso del pH (Komatsuzaki *et al.*, 2008). Este compuesto, es exportado al medio como producto de reacción desde el interior de la célula a través de un transportador específico y a su vez aumenta el pH del citoplasma celular debido a la eliminación de iones hidrógeno

y también alcaliniza el medio por la presencia del GABA en el (Le Vo *et al.*, 2012). Por otro lado, se sabe que las BAL son ácido tolerantes, por lo que pueden crecer tanto a valores de pH bajos como a altos, pero la mayoría crece en un rango de 4 a 4.5, lo que les permite desarrollarse naturalmente en medios ácidos donde otras bacterias no lograrían sobrevivir (Karahan *et al.*, 2010). Por lo cual, el hecho de poderse desarrollar en ambientes ácidos, así como también el que cuenten con la presencia de la enzima GAD en sus células, promueve que las BAL presenten un alto potencial de producción de GABA, como se ha reportado en diversas investigaciones (Li & Cao, 2010). Sin embargo, dependerá en gran medida del género, especie o cepa con la que se cuente así como de su fuente de aislamiento y de la cantidad de ácido glutámico en la matriz alimentaria.

II.9 Estrategias para Mejorar la Producción de GABA por las BAL

Existe un amplio conocimiento acerca de las múltiples funciones fisiológicas del GABA y debido a esto, el desarrollo de alimentos funcionales ricos en el ha ido incrementando en los últimos años. Sin embargo, para poder obtener una producción óptima del compuesto es necesario apoyarse de ciertas técnicas como la ingeniería genética, entre otras. Los factores clave más importantes que afectan a la síntesis de GABA por microorganismos en medios de cultivo son el pH, la cantidad de su precursor (ácido glutámico o su sal) y otros aditivos como fuentes de carbón o nitrógeno (Binh *et al.*, 2014). Otros parámetros cultivables pueden ser optimizados a través de las propiedades bioquímicas de la enzima GAD. El pH óptimo para la actividad glutamato descarboxilasa es estrictamente dependiente de la especie. Por ejemplo, el pH óptimo para la enzima de *E. coli* es 3.8 mientras que para la enzima de *Neurospora crassa* y *Lactobacillus brevis* es 5.0 y 4.2, respectivamente (Yang *et al.*, 2006).

El pH en medios fermentativos cambia con el tiempo, por eso, debe de mantenerse ajustado en el pH óptimo para lograr una producción de GABA más eficiente (Li *et al.*, 2010). Así mismo, varios autores han publicado cómo la adición de glutamato también incrementa el rendimiento del GABA en diferentes medios de cultivo, aunque la respuesta es diferente entre especies (Yang *et al.*, 2008). De manera semejante, el piridoxal 5-fosfato (PLP) usado como coenzima para elevar la actividad GAD, ha mostrado incrementar la producción de GABA durante la fermentación en algunas cepas. Sin embargo, no se mostró ningún efecto en una fermentación de mosto de uvas, principalmente debido a la propia producción de PLP por algunas cepas (Di Cagno *et al.*, 2010).

II.9.1 Efecto del pH

La producción de GABA por medio de las BAL se ve influenciado principalmente por el pH, el cual cambia durante la fermentación de diferentes productos lácteos, siendo esta característica cepa-dependiente (Yang *et al.*, 2008). Li *et al.* (2010) evaluaron el efecto de diferentes niveles de pH en la producción de biomasa y GABA utilizando la cepa de *Lactobacillus brevis* NCL912, observaron que a pH menor de tres la cepa no mostraba crecimiento, el rendimiento mayor de GABA lo obtuvieron a pH de cinco, siendo este valor el óptimo para la cepa de estudio.

Gardner-Fortier *et al.* (2013) evaluaron la producción de GABA en lechadas de queso inoculados con cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *cremori* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, con dos concentraciones de glutamato (1.0 y 3.0 mg/g) y tres niveles de pH (4.8, 5.1 y 5.4). La concentración de GABA fue estadísticamente significativa al comparar los diferentes valores de pH y contenido de glutamato. A pH de 4.8 se reportan valores de 0.4 mg/g de GABA para la cepa ajustada a 1.0 mg/g de glutamato y 0.8 mg/g de GABA para la cepa ajustada a 3.0 mg/g de

glutamato, siendo no mayor a 0.1 mg/g de GABA para los pH de 5.1 y 5.4 a las mismas concentraciones de glutamato.

El control del pH durante la fermentación para la producción de GABA está en función del pH óptimo de la GAD. En un estudio evaluaron la actividad de la enzima GAD a diferentes pH empleando la cepa de *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 en donde el pH óptimo de la enzima GAD es de 5.0 (en donde presenta el 100% de su actividad enzimática), siendo el doble en comparación con el pH de 4.0 (52% de actividad enzimática) y casi el triple en comparación con el pH de 6.0 (15% de actividad enzimática) (Komatsuzaki *et al.*, 2005).

II.9.2 Efecto de Tiempo y Temperatura

La temperatura y el tiempo de incubación para tener una adecuada producción de GABA se encuentran relacionadas directamente con la cepa de estudio, todo ello en función de las propiedades de la enzima GAD (Komatsuzaki *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009). En un estudio se evaluó la capacidad de la cepa *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 para producir GABA en un rango de 30 a 45 °C, se observó un aumento de la concentración de GABA de los 30 a 37°C, en donde se registró la máxima cantidad de GABA producida, seguido de una disminución cuando se elevó la temperatura arriba de 37 °C. Cuando se alcanzaron los 45 °C la cepa presentó crecimiento pero muy baja producción de GABA (Tajabadi *et al.*, 2015).

De manera similar, en un estudio evaluaron la producción de GABA por *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 a diferentes temperaturas encontrando que la óptima producción de este compuesto es a 37 °C, reduciéndose drásticamente cuando se eleva por arriba de este valor (Komatsuzaki *et al.*, 2005). En comparación con un estudio donde fermentaron jugo de zarzamora negra con *Lactobacillus brevis* GABA100 reportaron que la temperatura a la

cual encontraron la mayor concentración de GABA fue a 30 °C, en comparación con la producción obtenida a los 25 y 37 °C, respectivamente (Kim *et al.*, 2009).

Además, en otro estudio analizaron la temperatura de producción óptima de GABA empleando la cepa *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2, donde se basaron en el porcentaje de actividad de la enzima GAD a diferentes rangos de temperatura (30-60 °C), mostrando que para la cepa de trabajo la temperatura óptima se encuentra a 40 °C; sin embargo es a 37 °C en donde se encontró la temperatura óptima de crecimiento (Yang *et al.*, 2008).

El factor tiempo de fermentación para una óptima producción de GABA puede ser variado, dependiendo de la cepa de estudio y necesidades fisiológicas de la misma, por ejemplo, en un estudio realizado por Di Cagno *et al.* (2010), analizaron mosto de uva concentrado utilizando la cepa *Lactobacillus plantarum* DSM19463 mostrando una producción de 4.83 mM de GABA a las 72 horas de fermentación, siendo éste el tiempo óptimo para la producción del compuesto.

Sin embargo, los tiempos de fermentación pueden ser menores como en el estudio de Siragusa *et al.* (2007), donde evalúan la producción de GABA durante 24 horas utilizando las cepas de *Lb. paracasei* PF6, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PR1 y *Lb. plantarum* C48 presentando mayor producción la cepa de *Lb. paracasei* PF6 (20 mg/Kg de GABA), seguida de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (9 mg/Kg de GABA) y *Lb. plantarum* C48 (6 mg/Kg de GABA), respectivamente.

II.9.3 Efecto de Condiciones de Anaerobiosis

Una de las condiciones más importantes para la inducción de la actividad de la enzima GAD y producción de GABA es la ausencia de oxígeno o anaerobiosis, durante el proceso fermentativo (Sawai *et al.*, 2001; Lacroix *et al.*, 2013). En un

estudio realizado por Kim & Kim (2012) realizaron una comparación de la producción de GABA a partir de infusiones de té verde con y sin la presencia de oxígeno, observando diferencias significativa al comparar los tratamientos, en presencia de oxígeno con una producción de 25.8 ± 4.62 mg/100 g de GABA y en condiciones de anaerobiosis durante 12 horas con valores de 312.7 ± 5.23 mg/100 g de GABA.

II.9.4 Efecto de la Concentración de Sustrato

De manera general, el ácido glutámico es un precursor de GABA, por lo tanto, aumentar el contenido de ácido glutámico conduce a una elevación de la producción de GABA, siendo la relación directamente proporcional (Zareian *et al.*, 2013). En un estudio realizado por Komatsuzaki *et al.* (2005) evaluaron diferentes concentraciones de ácido glutámico empleando la cepa de *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415, observando que la concentración de GABA aumentó en relación al contenido de ácido glutámico. Sin embargo, al llegar a una concentración mayor de 500 mM de ácido glutámico el crecimiento celular de la cepa se redujo, siendo la concentración de 500 mM la óptima para la cepa.

La adición de ácido glutámico como fuente de sustrato presenta altos costos en la producción de GABA, por ello se buscan alternativas al utilizar sustratos que siendo ricos en ácido glutámico, puedan ser aprovechados por las BAL. En un estudio realizado por Franciosi *et al.* (2015) se evaluó el potencial de diversas cepas de BAL para producir GABA en quesos artesanales madurados de los Alpes Italianos. Los resultados mostraron que las cepas productoras de GABA fueron *Lb. paracasei*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* y *St. thermophilus*, siendo este último el mayor productor de GABA (80.0 ± 2.7 mg/kg).

III. HIPÓTESIS

El nicho de aislamiento de las bacterias ácido lácticas es el determinante de su capacidad para bioproducir ácido gamma aminobutírico durante la fermentación de la leche.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Seleccionar cepas de bacterias ácido lácticas productoras de ácido γ -aminobutírico durante la fermentación de leche.

IV.2 Objetivos Específicos

- Evaluar cualitativamente, mediante parámetros colorimétricos, la actividad de la enzima GAD de cepas crecidas en medio de cultivo.
- Determinar mediante HPLC la capacidad de producción de GABA de las cepas de acuerdo a su actividad enzimática.
- Cuantificar la producción de GABA en leches fermentadas con cepas de BAL seleccionadas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Bacterias Ácido Lácticas

En el presente estudio se evaluaron 197 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) de las cuales 184 pertenecieron a los géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*, y 13 cepas no identificadas (Tabla 2). Las cepas fueron aisladas a partir de diferentes quesos artesanales mexicanos: 70 de queso Cocido de Sonora, 68 de queso Fresco de Sonora, 49 de queso Poro de Balancán, Tabasco y 10 de queso Chihuahua. Todas las cepas estudiadas pertenecen a la colección de bacterias ácido lácticas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD).

La cepa de *Lactobacillus brevis* NBRC 12005 (Centro de Recursos Biológicos de Japón) reportada en literatura (Ueno *et al.*, 1997) por su alta capacidad para producir GABA, fue utilizada como testigo positivo. Del mismo modo, una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257, reconocida como no productora de GABA (Nomura *et al.*, 2000) se empleó como testigo negativo.

V.2 Reactivación de Cepas de Bacterias Ácido Lácticas

Las cepas pertenecientes a los géneros de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y las cepas no identificadas, fueron reactivadas en caldo Man

Rogosa y Sharpe (MRS BD Difco™, Francia), mediante tres sub-cultivos consecutivos utilizando un nivel de inóculo del 1% (v/v), los cuales se incubaron a 37 °C por 24, 18 y 12 h, respectivamente.

Los *Lactococcus* fueron reactivados en caldo M17 adicionado con lactosa al 10% (DIFCO, Sparks, MD, Francia), mediante tres sub-cultivos consecutivos utilizando un nivel de inóculo del 1% (v/v), los cuales se incubaron a 30 °C por 24, 18 y 12 h, respectivamente. El subcultivo final de 12 h alcanzó una concentración celular de 10^8 UFC/mL, al cuantificar la población de BAL mediante la técnica de vaciado en placa en agar MRS o M17. Por lo tanto, este tiempo fue el que se estableció para realizar los ensayos subsecuentes.

Tabla 2. Cepas de BAL utilizadas en el presente estudio.

Fuente de aislamiento	Código de cepa	BAL	Referencia
Queso Cocido de Sonora	B5 B1, B2, B3, B8, B12, B18 B4, B6, B7, B11, B14, B17 MQ24, SD22, LS33, LR33, SQ31, LR32, LR14, CR22, SQ33, LM34, SD23, MQ34, LM32, SR21, MQ13, MQ14, SS32, SS11, DQ313, LS12, SQ24, LR34, LM13, LD23, S19, L6, L12, L20, L45, L23, L8, S3, S26, L49, L22, L21, S37, S33, B26, QR24, CR31, CD33, MQ31, LD12, LM12, CR24, LR24, SR31, LD24, LS24, MQ22, SD11, SD12, CD32, SS22, QR21, QR33	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lactobacillus</i> spp.	Heredia-Castro (2011)
Queso Freso de Sonora	S1 Lc D, L2 Lc B, L2 Lc A, Q2 Lc A, S2 Lc A, L3 Lc B, L3 Lc C, C3 Lc A, L4 Lc B, Q4 Lc A, Q4 Lc B, L2 Lb C, L2 Lb D, Q2 Lb A, Q2 Lb B, Q2 Lb C, C2 Lb B, C2 Lb C, C2 Lb D, S2 Lb D, L4 Lb A L1 St A, L2 St A, L2 St B, L2 St C, Q2 St A, Q2 St B, Q2 St C, Q2 St D, C2 St A, C2 St B, C2 St C, C2 St D, S2 St A, S2 St B, S2 St C, S2 St D, C3 St A, C3 St B, S3 St A, L4 St A, L4 St B, L4 St C, Q4 St A, Q4 St C, Q4 St D, C4 St A, C4 St B, C4 St C, C4 St D, S4 St B, S4 St C, S4 St D, Q7 St A, Q7 St B, Q7 St C, Q7 St D, L7 St A, L7 St B, L7 St C, L7 St D, S7 St A, S7 St B, S7 St C, S7 St D, C7 St A, C7 St B, C7 St C	<i>Lactococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	Serrano-Solis (2012)
Queso de Poro de Balancán, Tabasco	1, 2, 4,14 3, 5, 7, 8,12, 15, 19 11 6, 10, 16, 17 20, 21, 22, 23, 24, 29, 30, 43, 49, 52 26, 27, 28, 31,32, 42, 45, 50, 53, 54 9, 13, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 46	<i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. farciminis</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Enterococcus faecium</i> No identificadas	Benitez-Romero (2013) Benitez-Romero (2013)
Queso Chihuahua	C1, Q2, Q3, Q5, S2, R1, Q1, E3, Q3 <i>Lc lactis</i> NRLB 50571	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> NRLB 50571	Gutiérrez-Méndez <i>et al.</i> (2010)

V.3 Ensayo Colorimétrico de la Actividad de la Enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa

Una vez llevado a cabo el proceso de reactivación de cada una de las cepas, se procedió a evaluar la actividad de la enzima GAD mediante el método colorimétrico descrito por Lacroix *et al.* (2013), con modificaciones. Alícuotas de 5 mL de cada una de las diferentes cepas de BAL fueron tomadas a las 12 h de crecimiento en medio de cultivo (MRS o M17 según corresponda), y se centrifugaron a 5000 x g durante 20 min a 25 °C (Thermo Scientific ST 16R, Rotor TX-400, Alemania). El sobrenadante fue descartado y las células fueron lavadas con 5 mL de una solución estéril de NaCl (0.9% p/v). Posteriormente, se centrifugó de nuevo a 5000 x g durante 20 min a 25 °C y el pellet obtenido se resuspendió en 0.5 mL de la solución de reactivo GAD (1 g de ácido glutámico, 0.3 mL de Tritón X-100, 90 g de NaCl y 0.05 g de verde de bromocresol, disueltos en 1 L de agua destilada estéril). El pH del reactivo GAD fue ajustado a 4 con ácido clorhídrico 0.01 M.

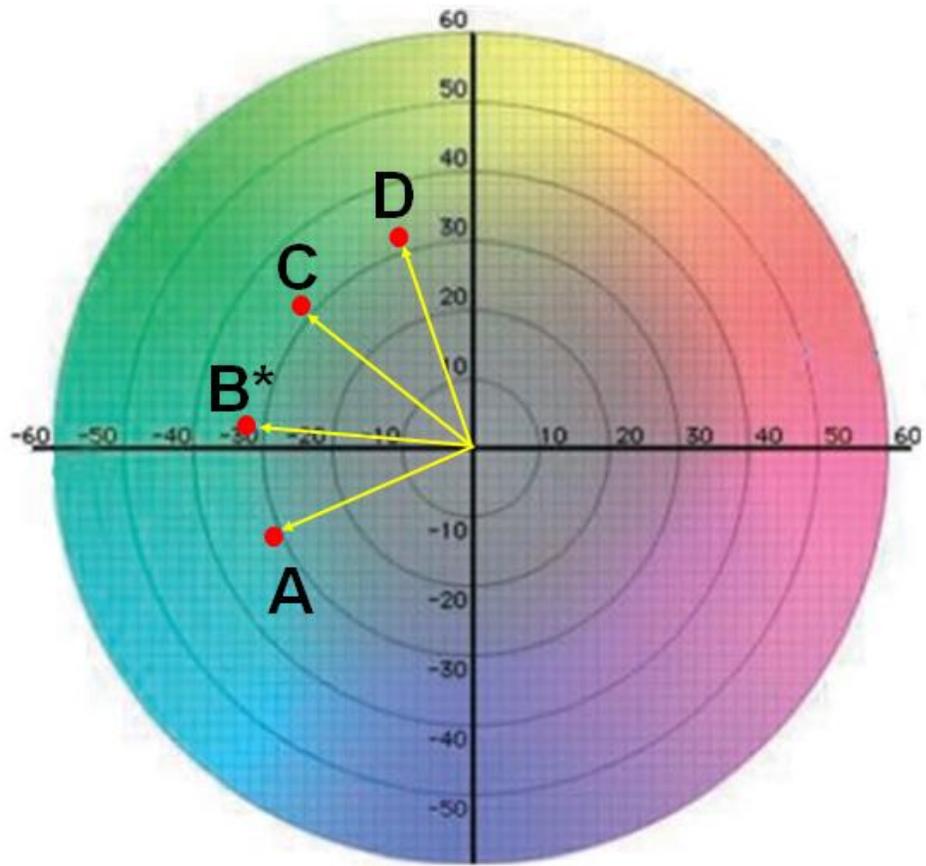
Las cepas resuspendidas en reactivo GAD fueron incubadas por 4 h a 30 °C bajo condiciones de anaerobiosis, para promover la actividad de la enzima GAD; una vez finalizado la incubación, los cambios en el color de la solución de las muestras fueron observadas visualmente. Un color amarillo en la solución de bacteria con reactivo GAD fue indicador de un resultado negativo, mientras que el desarrollo de color verde o azul después de la incubación, fue considerado como baja o alta actividad de la enzima GAD, respectivamente.

V.4 Determinación Instrumental del Color de la Reacción de la Enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa

Para definir la intensidad del color percibido visualmente en el ensayo colorimétrico y poder confirmar la actividad de la enzima GAD, se midió el color de la reacción realizada con un colorímetro (CR-400, Konika Minolta, EU) para

obtener los valores del ángulo de matiz ($^{\circ}$ Hue) a partir de los parámetros L^* , a^* y b^* de cada una de las soluciones y ubicarlo en la esfera del color. Este valor fue tomado para verificar la intensidad de color, ya que entre más alto fue el valor del ángulo, se presentó una coloración azul más intenso. Según la metodología, el color azul se relaciona a una presuntiva mayor capacidad de producir GABA por parte de las bacterias. El ángulo de matiz de cada una de las muestras fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Hue} = \text{Arc tan } (b^*/a^*)$$



A= Q4 St A



B= Testigo Positivo



C= Baja productora



D= Testigo Negativo

Figura 4. Localización de ángulo de matiz (Hue) en la esfera de color.

V.5 Cuantificación de la Producción de GABA por HPLC

Las cepas elegidas por presentar una mayor actividad de la enzima GAD fueron evaluadas por su capacidad de producir GABA en reactivo GAD, el cual fue cuantificado por HPLC. Así mismo, el GABA producido en leches fermentadas fue cuantificado por esta misma técnica. Para la extracción de GABA, 0.5 mL de cada una de las muestras, tanto de los cultivos en solución GAD como de leches fermentadas fueron centrifugadas bajo las condiciones de 13362 x g durante 10 min a 4 °C utilizando una centrifuga Eppendorf modelo 5717R (Alemania) (Wu & Shah, 2015). Posteriormente, se realizó una derivatización del extracto en precolumna siguiendo la metodología descrita por Waters Corporation, proveedor del kit comercial (AccQ•Tag Ultra Derivatization Kit), el cual utiliza el reactivo 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinil carbamato (AccQTag) para poder cuantificar el GABA a través del detector de absorción ultravioleta en cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-FR).

Para derivatizar, 10 µL del sobrenadante resultante de la centrifugación, se mezclaron con 70 µL de solución amortiguadora de borato AccQ fluor. La mezcla se homogenizó y tras un minuto de reposo a temperatura ambiente (25 °C), se calentó por 10 min en un bloque de calentamiento (VWR 4318, EU) ajustado a 55°C y se inyectó (20 µL) en el HPLC fase reversa (serie 1100, Agilent Technologies Japón Ltd., Tokyo, Japón). La separación cromatográfica se llevó a cabo mediante una columna C18 (1.7 µm, 2.1 x 100 mm) AccQTag (Waters Corporation, EU) que estuvo mantenida a temperatura constante (37°C). La inyección fue manual y se tomó un volumen de 20 µL. La fase móvil A consistió en un eluente de AccTag (Waters Corporation, EU). Las fases B y C fueron acetonitrilo (grado HPLC) y agua mili-Q, respectivamente. La detección fue realizada por absorbancia UV a 254 nm para cuantificar el GABA producido.

La identificación se llevó a cabo tomando en cuenta el tiempo de retención (25 min) de un estándar de GABA (grado HPLC, Sigma Aldrich, 99% de pureza)

resuspendido en agua destilada y para llevar a cabo la cuantificación de GABA en las muestras, se elaboró una curva estándar de cinco puntos (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.0312 mg/mL) de este mismo compuesto.

V.6 Elaboración de Leches Fermentadas

Las leches fermentadas fueron elaboradas empleando las cepas que fueron elegidas por presentar una alta capacidad de producir GABA. Partiendo de cultivos frescos en caldo MRS o M17 según corresponda, estas cepas fueron inoculadas individualmente (3% v/v) en leche descremada en polvo, previamente reconstituida (10% p/v) y esterilizada (110 °C, 10 min), e incubadas por 24 h a 30 °C para *Lactococcus* y a 37 °C para el resto de las cepas bajo estudio. Posteriormente, se realizó un segundo sub-cultivo en el mismo tipo de leche y bajo las mismas condiciones, pero incubado por 12 h. Este segundo sub-cultivo sirvió como preinóculo, del cual se tomó una alícuota y se inoculó (3% v/v) en el mismo tipo de leche. Las leches inoculadas se incubaron en las mismas condiciones por un periodo de 48 h. A la leche fermentada obtenida, se le determinó el pH al inicio y al final de la fermentación. Por otro lado, se realizó otro experimento similar, pero la leche preparada fue enriquecida con glutamato monosódico (59.13 mM) desde las leches empleadas como pre-inóculos hasta la leche que finalmente se analizó por su contenido de GABA (Seo *et al.*, 2013)

V.7 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de correlación entre el ángulo de matiz y la producción de GABA en la reacción de la prueba colorimétrica. Además, los resultados de la producción de GABA por las BAL se analizaron mediante un diseño completamente al azar (DCA). Para ello, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía al 95% de confianza y las diferencias significativas se

determinaron mediante una comparación de medias, por medio de la prueba de Tukey-Kramer. Por otro lado, se realizó una prueba de T-student a un 95% de confianza para comparar la producción de GABA entre leches fermentadas sin y con glutamato. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico NCSS 2007 (Hintze, 2006).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Ensayo Colorimétrico de la Actividad de la Enzima GAD

La actividad de la enzima GAD, fue evaluada para un total de 199 cepas de BAL (incluyendo los testigos positivo y negativo) mediante un ensayo colorimétrico. Los resultados obtenidos (Tabla 3) demostraron que solamente el 12.56% de las cepas incluyendo a *Lb. brevis* (control positivo) presentaron una alta actividad de la enzima GAD. Respecto al resto de las cepas, el 86.93% mostraron una baja actividad enzimática y solamente en la cepa *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (que fue la testigo negativo) no se presentó dicha actividad. La alta actividad de la enzima GAD en las cepas estudiadas se puede atribuir a los tratamientos a los que fueron expuestas antes o durante la elaboración del queso, ya que es posible que hayan desarrollado una fuerte tolerancia a pH ácidos y por ende una mayor actividad enzimática (Budin-Verneuil *et al.*, 2004).

Algunos estudios han reportado que ciertas cepas de BAL no son capaces de producir GABA, debido a una mutación genética que inhibe la actividad de la enzima GAD, responsable de la producción de dicho compuesto. Esta mutación se debe a que en sus genes se ha insertado una base de tiamina en lugar de una base de adenina, y ésta no posee la región que codifica para los genes *gadCB*, provocando mutaciones en el fragmento y por consiguiente la proteína no es funcional (Nomura *et al.*, 2000). Por lo anterior, es necesario llevar a cabo técnicas rápidas para poder seleccionar entre un gran número de bacterias aquellas que presentan alta actividad de la enzima GAD.

Tabla 3. Actividad de la enzima GAD de las cepas de BAL, de acuerdo a la clasificación colorimétrica visual.

Actividad (cepas)	Identificación de la cepa
No detectable (1), color amarillo	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (referencia negativa)
Bajo (173), color verde	B5, B1, B2, B3, B8, B12, B18, B4, B6, B7, B11, B17, S1LcD, L2LcB, L2LcA, Q2LcA, S2LcA, L3LcB, L3LcC, C3LcA, L4LcB, Q4LcA, Q4LcB, L2LbC, L2LbD, Q2LbA, Q2LbB, Q2LbC, C2LbB, C2LbC, C2LbD, S2LbD, L4LbA, L1StA, L2StA, L2StB, L2StC, Q2StA, Q2StB, Q2StC, Q2StD, C2StA, C2StB, C2StC, C2StD, S2StA, S2StB, S2StC, S2StD, C3StA, C3StB, S3StA, L4StA, L4StB, L4StC, Q4StA, Q4StC, Q4StD, C4StA, C4StB, C4StC, C4StD, S4StB, S4StC, S4StD, Q7StA, Q7StB, Q7StC, Q7StD, L7StA, L7StB, L7StC, L7StD, S7StA, S7StB, S7StC, S7StD, C7StA, C7StB, C7StC, 1, 2, 4, 14, 3, 5, 7, 8,12, 15, 19, 6, 10, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 29, 30, 43, 49, 52, 26, 27, 28, 31,32, 42, 45, 50, 53, 54, 9, 13, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 46, C1, Q2, Q3, Q5, S2, MQ24, SD22, LS33, LR33, SQ31, LR32, LR14, CR22, SQ33, LM34, SD23, MQ34, LM32, SR21, MQ13, MQ14, SS32, SS11, DQ313, LS12, SQ24, LR34, LM13, LD23, S19, L6, L12, L20, L45, L23, L8, S3, S26, L49, L50, S15, S36, L23, L40, 48, L40, S20
Alto (25), color azul	<i>Lb. brevis</i> NBRC 12005 (referencia), B14, QR21, CR24, CD33, MQ31, LD12, 27, LR24, SR31, LD24, LS24, MQ22, SD11, SD12, CD32, SS22, QR33, 53, 17, R1, <i>Lc lactis</i> NRLB 50571, 23, L4 Lc B, Q4 St A

Aunque la actividad de la enzima GAD puede ser determinada por diferentes métodos cromatográficos (papel, capa fina, análisis de aminoácidos y líquida de alta resolución (HPLC), en este estudio para la selección de las bacterias productoras de GABA, se seleccionó una prueba cualitativa colorimétrica. Esta prueba, es simple, rápida y permite analizar un gran número de muestras en menor tiempo que los métodos anteriormente mencionados. De las 197 cepas de BAL analizadas solamente 25 presentaron una alta actividad de la enzima GAD de acuerdo a la prueba colorimétrica. No obstante, como se trata de un método visual, fue necesario validar los resultados de manera instrumental con un colorímetro.

VI.2 Determinación Instrumental del Color de la Reacción de la Enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa

La enzima GAD juega un papel importante en la resistencia acídica de las bacterias Gram positivas y cuando estas se someten a estrés por pH bajos, la enzima es activada. Sin embargo, la actividad de esta puede variar entre cada cepa (Cotter & Hill, 2003). En la Figura 5, se pueden observar los valores de ángulo de matiz ($^{\circ}$ Hue) de las 24 muestras seleccionadas con alta actividad de la enzima GAD por su coloración azul. Todas las muestras se encontraron ubicadas en el cuadrante 3 de la esfera del color (escala para medición de color), el cual engloba los colores desde verde hasta azul. Sin embargo, a pesar de que varias de las cepas se percibían similares a simple vista, se encontraron diferencias por su ángulo de matiz entre ellas. La cepa de *Lactobacillus brevis* NBRC 12005 (testigo positivo), presentó un ángulo de matiz de 175.05, no obstante, las cepas L4 Lc B y Q4 St A, aisladas de queso Fresco de Sonora, presentaron un ángulo de 203.52 y 202.8 respectivamente, indicándonos, que tienen la mayor actividad enzimática con mayor capacidad de producción de GABA.

El método colorimétrico se empleó exclusivamente para seleccionar las cepas con un mayor potencial para producir GABA de acuerdo a su actividad de la enzima GAD y partiendo de una gran cantidad de cepas. Sin embargo, es importante mencionar que, después de una revisión exhaustiva, se encontraron escasos estudios donde emplean técnicas colorimétricas como métodos de selección de BAL productoras de GABA. En una publicación de Lacroix *et al.* (2013) emplearon estas técnicas para la selección de cepas de *Lactococcus*; sin embargo, hasta donde se ha tenido conocimiento, este estudio es el primer trabajo en el que se reporta el empleo de métodos instrumentales para comprobar el resultado de la actividad enzimática GAD visualmente percibido.

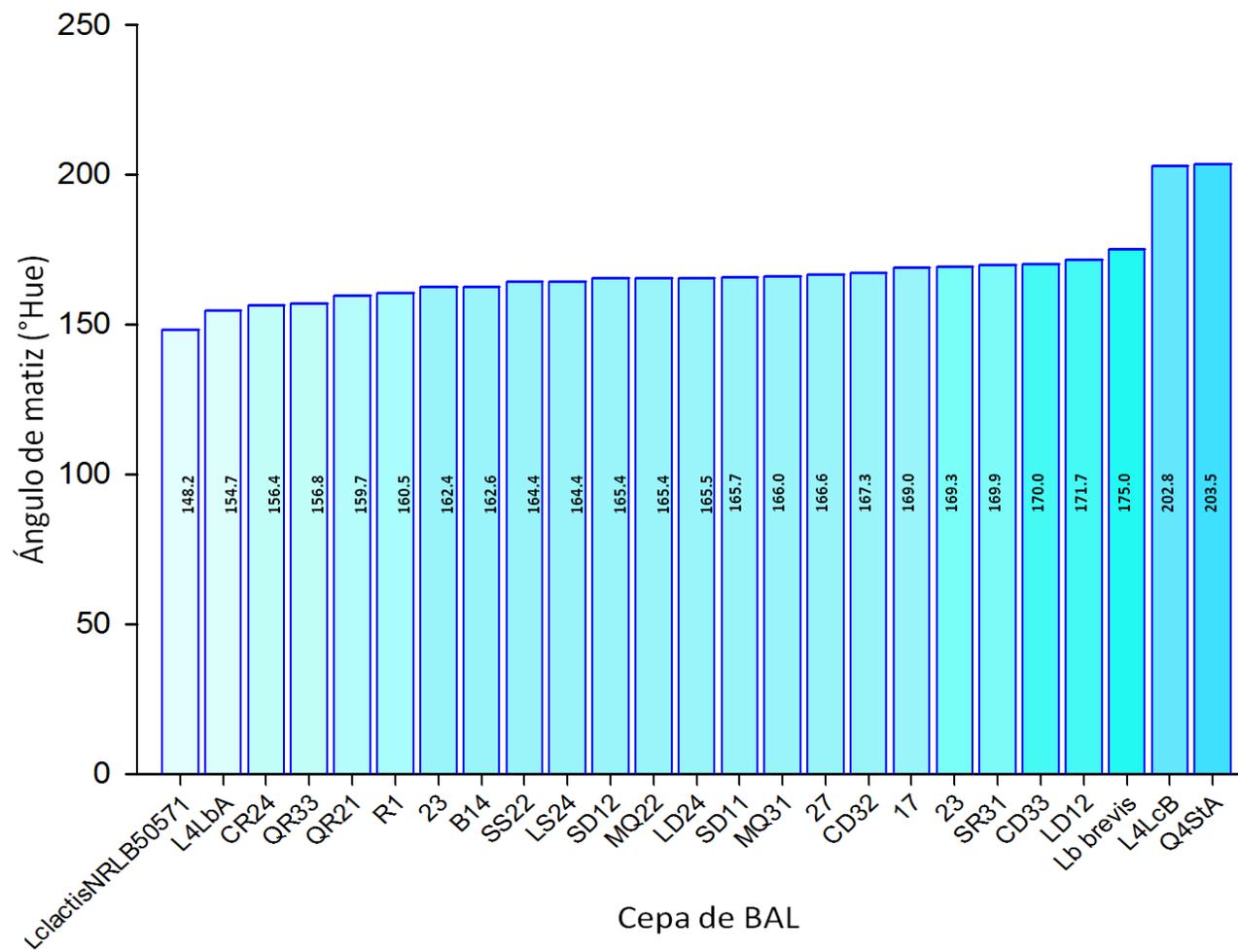


Figura 5. Ángulo de matiz (°Hue) de los medios de reacción de cada una de las cepas de acuerdo al método colorimétrico.

Los cambios de color observados, se deben a que la enzima GAD por ser intracelular, al momento de activarse, provoca una descarboxilación para regular el pH intracelular. Esta enzima, toma el glutamato del medio, mediante un transportador específico y lleva a cabo la descarboxilación del mismo, lo que provoca el consumo de un protón intracelular y en consecuencia, exporta el GABA al medio como producto de la reacción. Por lo tanto, el pH del citoplasma incrementa debido a la eliminación de iones de hidrógeno y también se da un ligero aumento en el pH extracelular debido al intercambio de glutamato extracelular por el GABA que es más alcalino (Cotter & Hill, 2003; Komatsuzaki *et al.*, 2008; Le Vo *et al.*, 2012).

Numerosos estudios han reportado diferentes cepas de BAL con habilidad para producir GABA. Sin embargo, cada una de ellas muestra grandes diferencias en la cantidad de producción del aminoácido, entre las cepas reportadas se encuentran: *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophile*, siendo la cepa de *Lb. brevis* la que ha reportado la mayor producción de GABA (345.83 mM) (Barrett *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010; Siragusa *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron que las dos cepas que presentaron el mayor ángulo de matiz se encontraron por encima de la cepa testigo *Lb. brevis*, por lo que tienen un alto potencial para producir GABA en altas concentraciones, principalmente la cepa Q4 St A de *Streptococcus* (presuntivamente). Por otro lado, la mayoría de las cepas de BAL reportadas como productoras de GABA pertenecen al género *Lactobacillus* (Li & Cao, 2010), lo que concuerda con este estudio, ya que el 66% de las cepas seleccionadas con alta actividad enzimática pertenecen a este mismo género. Sin embargo, las cepas resultantes por encima del testigo positivo con más alta actividad de la enzima GAD fueron del género *Streptococcus* y *Lactococcus*,

respectivamente. Lo cual concuerda con otros estudios, como el de Somkuti *et al.* (2012) quienes reportaron que una cepa de *Streptococcus thermophilus* mostró una alta capacidad para producir GABA.

VI.3 Evaluación de la capacidad de producción de GABA por BAL en estudio.

Para validar los resultados obtenidos por el método colorímetro, se utilizó el método de cuantificación de GABA por HPLC. En la figura 6 se muestra un cromatograma representativo del estándar analítico de GABA. Como puede observarse el tiempo de elución del pico cromatográfico del estándar fue a los 25 min, aproximadamente. Una vez conocido el tiempo de elución del GABA, se construyó una curva de calibración con GABA en concentraciones de: 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.0312 mg/mL. La Figura 7 muestra la curva estándar construída. La ecuación de la curva estándar presentó un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9996$ y las áreas de los picos de GABA de cada muestra fueron sustituidos en la ecuación para determinar la concentración real en cada una de ellas. Los cromatogramas obtenidos por el HPLC de las muestras analizadas mostraron un pico en el mismo tiempo de retención de la solución estándar de GABA. En la Figura 8, 9 y 10 se muestran algunos cromatogramas representativos de la cepa con más actividad de la enzima GAD (Q4 St A), la cepa testigo positivo y testigo negativo respectivamente.

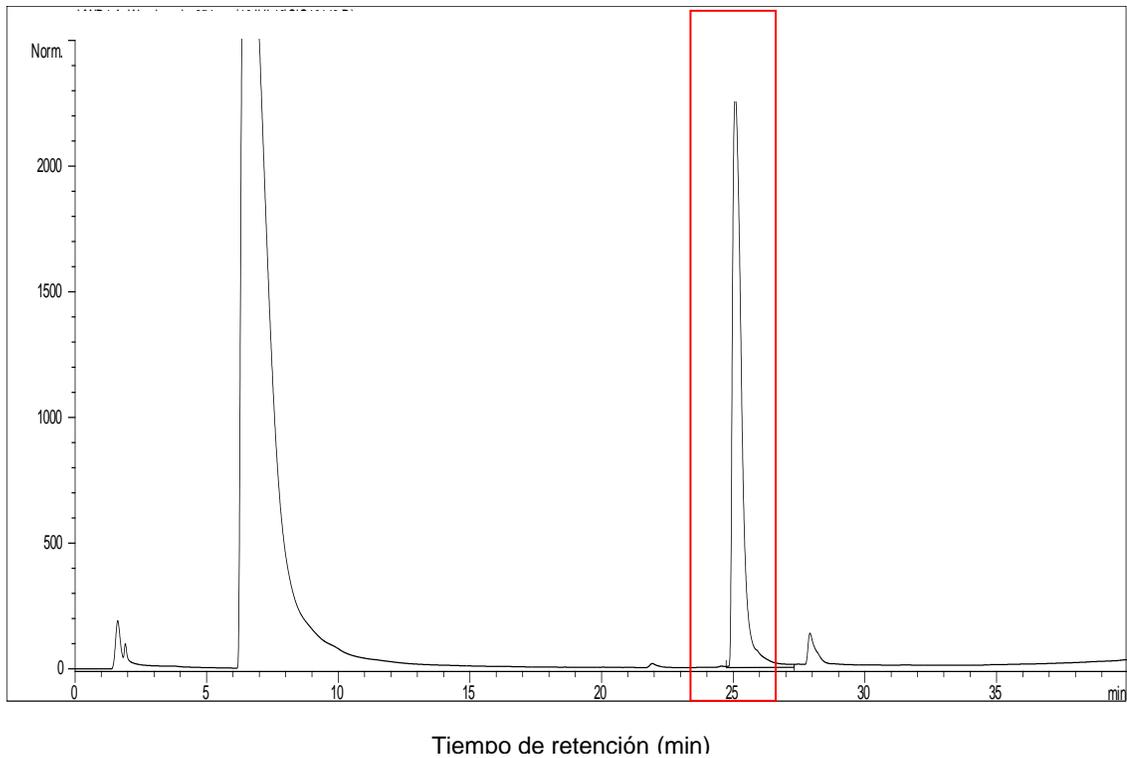


Figura 6. Cromatograma típico de una solución con estándar analítico de GABA.

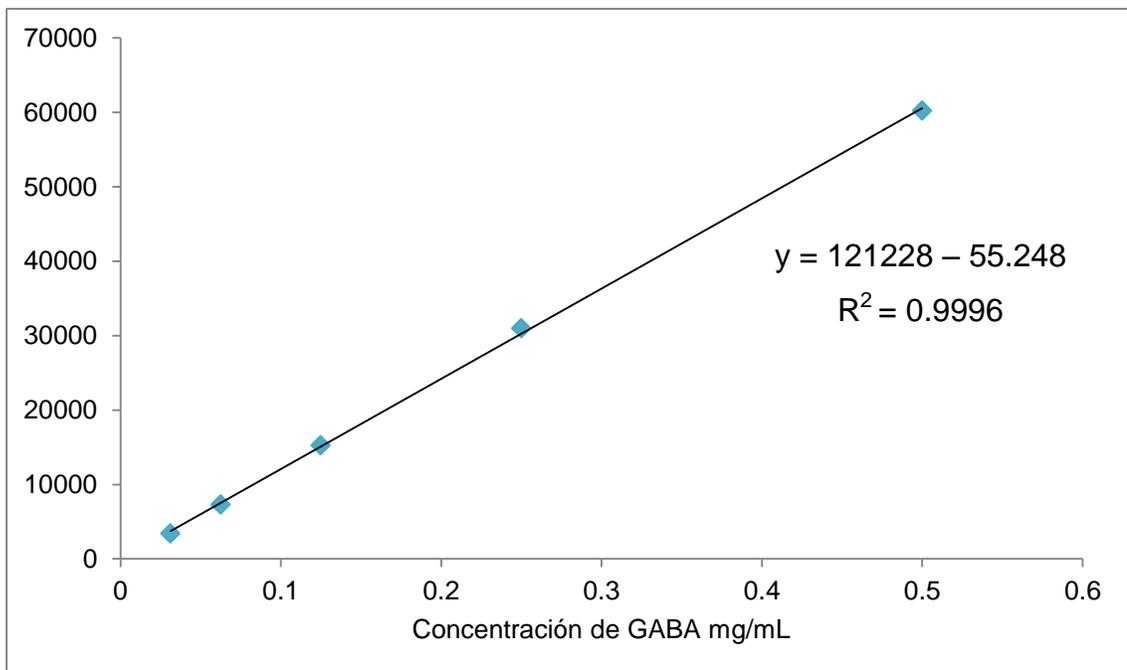


Figura 7. Curva de calibración de GABA.

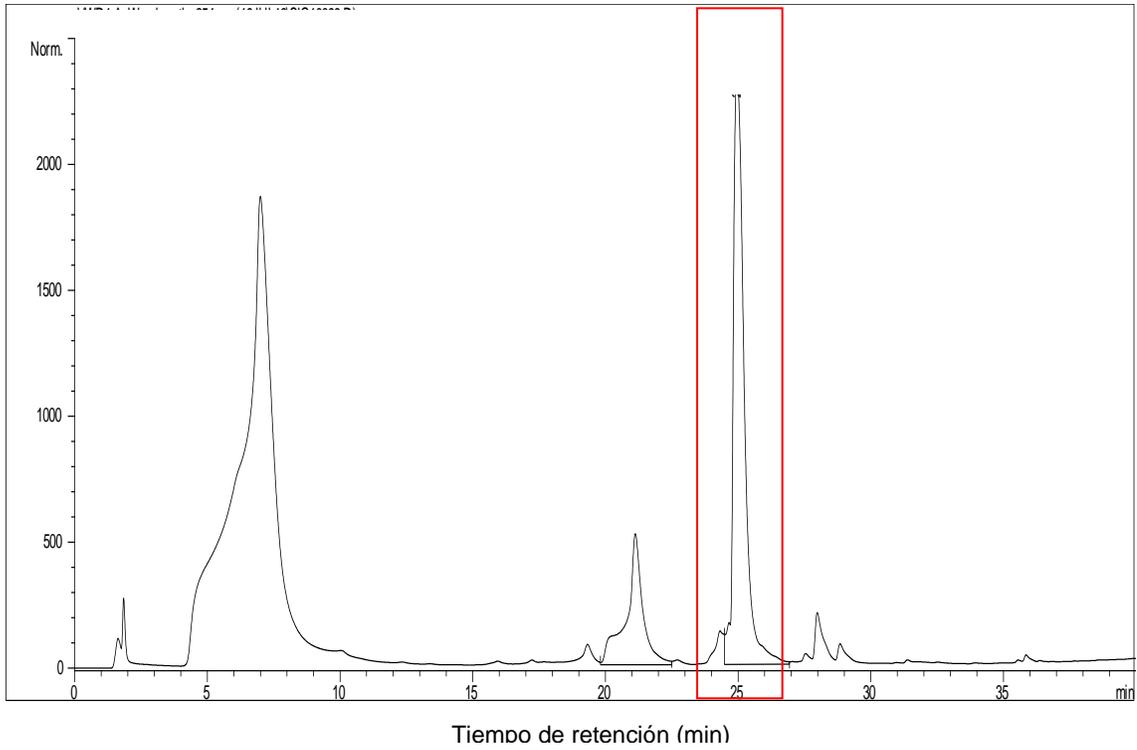


Figura 8. Cromatograma típico de GABA, producido por la cepa Q4 St A aislada de queso Fresco de Sonora.

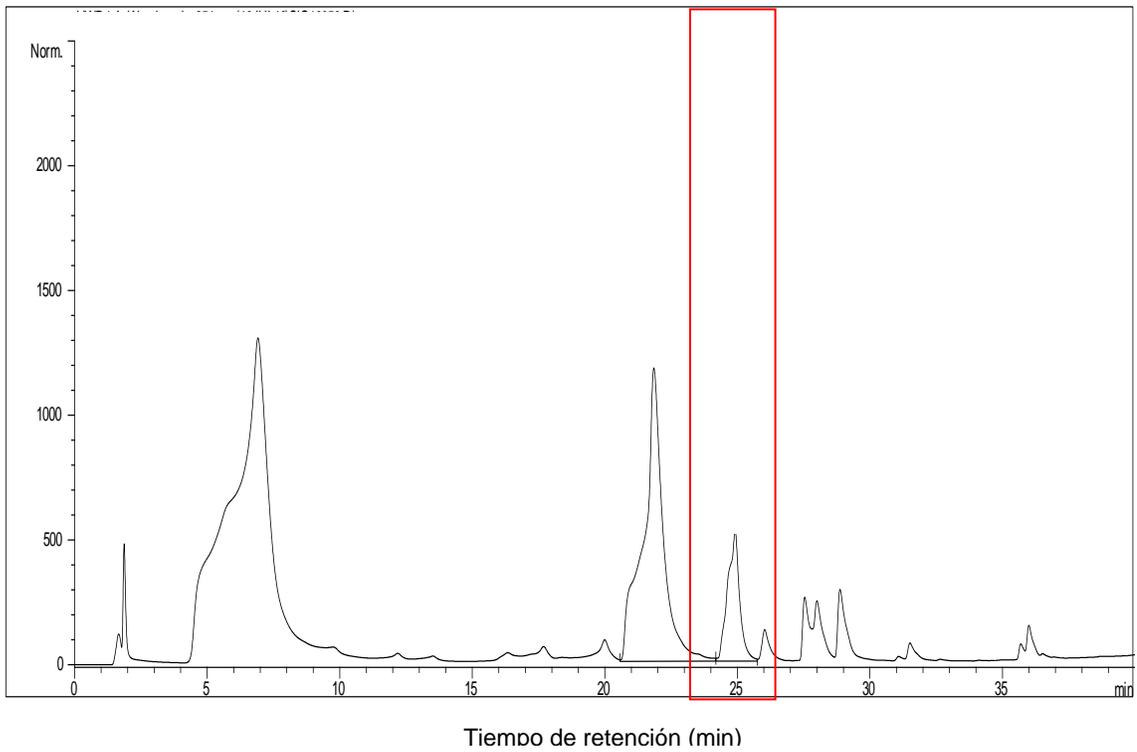


Figura 9. Cromatograma típico de GABA, producido por la cepa *Lb. brevis* NBRC 12005 (testigo positivo).

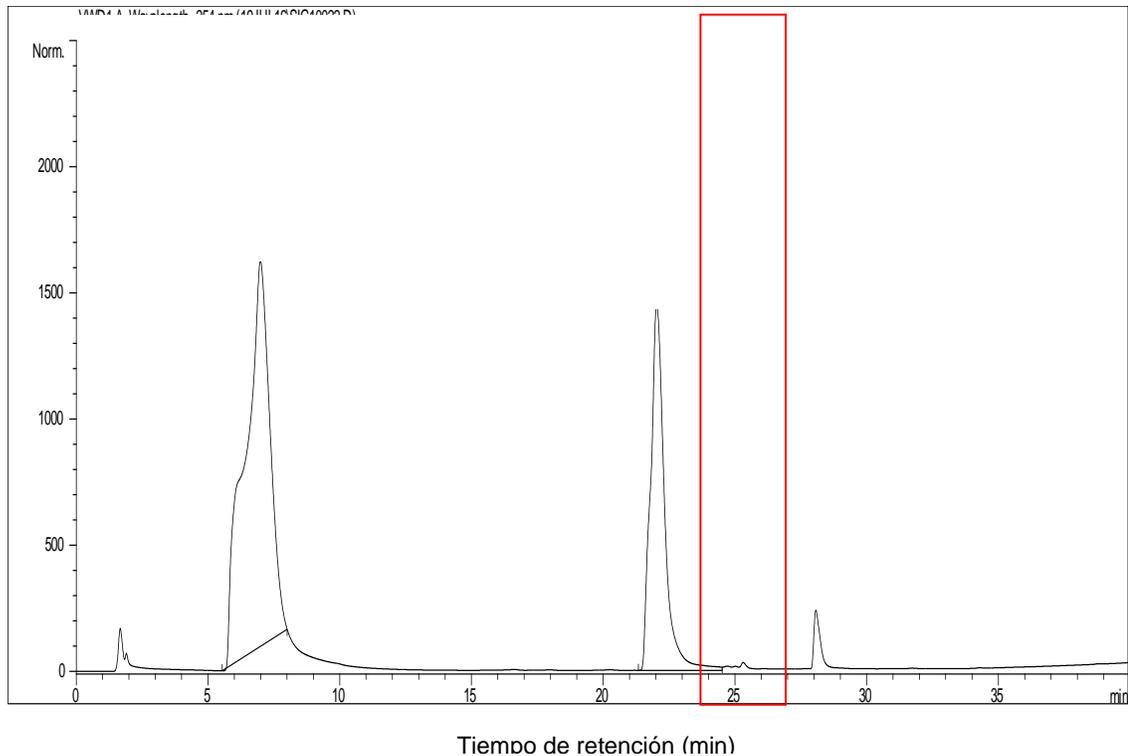


Figura 10. Cromatograma típico de GABA, producido por la cepa *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (testigo negativo).

Las concentraciones de GABA producidas por las 24 cepas se muestran en la Figura 11. Los resultados mostraron que las cepas *Lc. Lactis* NRLB50571, L4 Lb A, L4 Lc B y Q4 St A, produjeron GABA conforme a los resultados respectivos en la escala de su ángulo de matiz ($^{\circ}$ Hue). Sin embargo, el resto de las cepas presentó un comportamiento diferente, la cepa de *Lb. brevis* (testigo positivo) tras ser la tercera más alta en pruebas colorimétricas, la cantidad de GABA que produjo no fue coincidente, ubicándose incluso dentro de las más bajas concentraciones. Por su parte, las cepas L4 Lc B y Q4 St A fueron las que significativamente ($p < 0.05$) produjeron una mayor cantidad de GABA, con 0.49 y 0.51 mg/mL en solución GAD, respectivamente. Otras cepas que fueron significativamente superiores a la cepa testigo fueron CD33, SR31 y B14; sin embargo, fueron iguales a la mayoría de las cepas evaluadas. Las únicas cepas que presentaron menor producción de GABA fueron *Lc lactis* NRLB 50571, L4LbA, R1 y LS24 con valores iguales a *Lb. brevis*, la cual produjo 0.11 mg/mL.

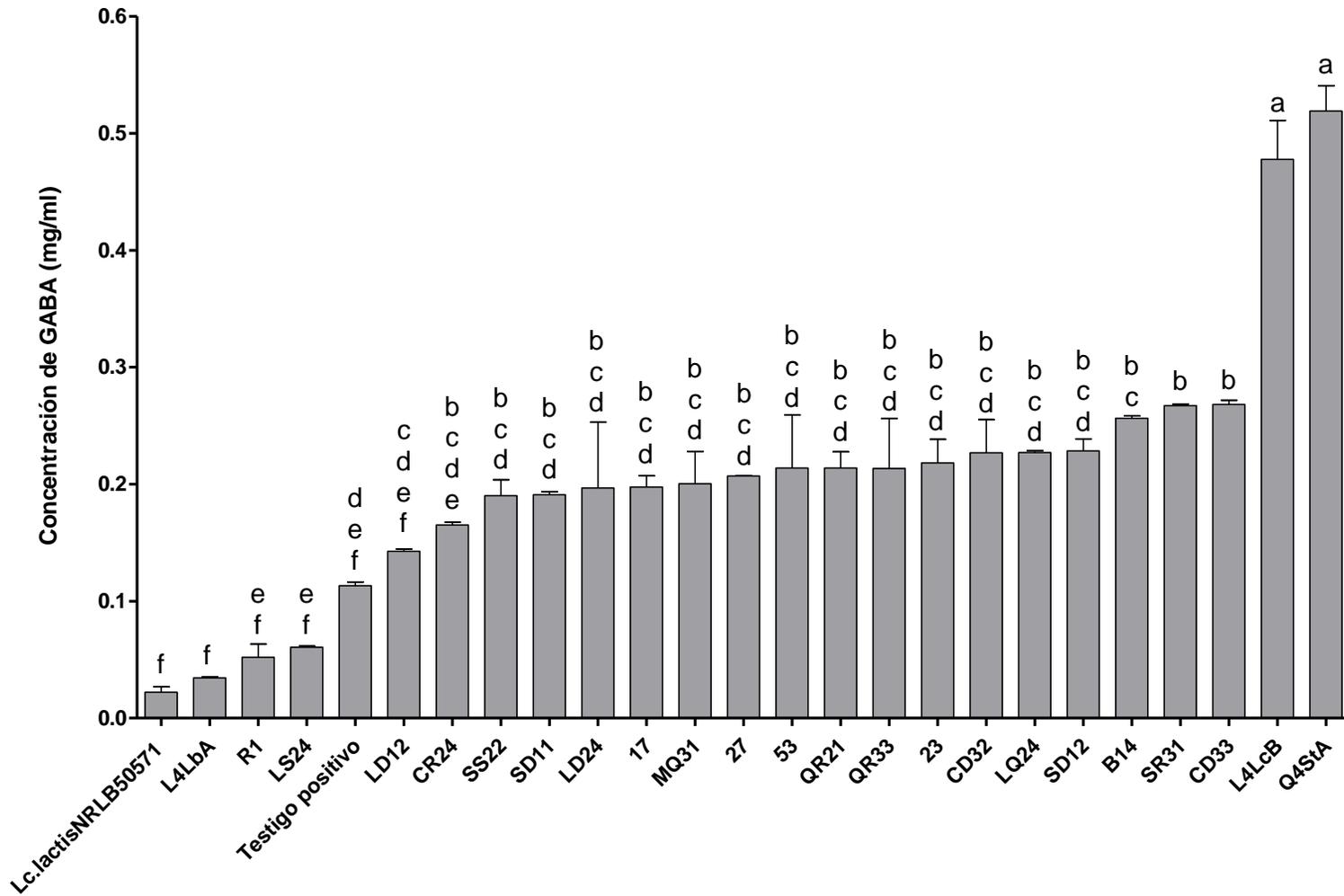


Figura 11. Concentración de GABA en las muestras del ensayo colorimétrico de las cepas de BAL. Los valores representan a las medias \pm error estándar. El experimento se realizó por duplicado (n=2).

Una vez obtenidos los datos de la concentración de GABA en la reacción colorimétrica se realizó una correlación para definir la asociación entre el ángulo de matiz de cada una de las cepas con la actividad de la enzima GAD y la concentración de GABA producida por cada una de ellas. Los resultados mostraron una correlación positiva de 0.82, para las cepas con alta actividad de la enzima, indicándonos que a mayor ángulo de matiz la concentración de GABA fue mayor. Por lo anterior, el método colorimétrico que es una técnica cualitativa podría correlacionarse con una técnica cuantitativa como el HPLC.

En un trabajo realizado por Komatsuzaki *et al.* (2005), evaluaron la capacidad de 3 cepas de *Lactobacillus paracasei* (NFRI 7415, NFRI 7313 y NFRI 7340) de producir GABA después de 6 días de fermentación en medio de cultivo suplementado con 16 g/L de glutamato. En este caso, la cepa *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415, fue la que mostró la mayor concentración de GABA con 6.18 mg/mL. Comparando este resultado, con lo obtenido en nuestro estudio, se puede sugerir que la cepa Q4 St A tiene el potencial de producir cantidades similares o superiores, ya que en nuestro caso, sólo se le añadió a la solución GAD (empleada como sustrato) una concentración de 1 g/L de ácido glutámico y la medición se llevó a cabo a 4 horas de incubación. Es importante mencionar que, las condiciones utilizadas en el presente estudio, fueron sólo con el objetivo de determinar la capacidad de producir GABA a partir de la actividad enzimática de cada una de las cepas para poder seleccionarlas.

En concordancia con la información presentada en la Tabla 2, en donde se puede observar el respectivo nicho de aislamiento de las 24 cepas seleccionadas excluyendo la cepa testigo, se puede observar que la mayoría de las cepas fueron aisladas de queso Cocido de Sonora y alcanzaron una producción similar a *Lb. brevis*. Este grupo de cepas representaron el 21.4 % de las 70 cepas evaluadas que fueron aisladas de este queso. Respecto al queso Chihuahua, se evaluaron 10 cepas en total y sólo 2 de ellas, que representan el 20 %, se incluyeron dentro del grupo de cepas productoras de GABA; sin

embargo, estas presentaron menor producción de GABA que *Lb. brevis*. El queso de Poro de Balancán fue fuente de 4 cepas seleccionadas de un total de 49 (8.1 %). Finalmente, el queso Fresco de Sonora fue la fuente de menor cantidad de cepas productoras de GABA con alta actividad (3 de 68 que representa al 4.4%); sin embargo, las dos cepas que presentaron mayor producción de GABA fueron pertenecientes a este grupo.

Las BAL son utilizadas en la producción de queso debido a que juegan un importante rol en la maduración y desarrollo del sabor de los mismos (Soomro *et al.*, 2002). Durante la madurez del queso, las caseínas son degradadas a péptidos y aminoácidos libres mediante las enzimas proteolíticas de las BAL iniciadoras. Los aminoácidos libres son sustratos para una serie de reacciones catabólicas, las cuales generan diversos metabolitos de interés. Un ejemplo sería el ácido glutámico, el cual sufre una descarboxilación catalizada por la enzima GAD y en consecuencia se produce el GABA (Nomura *et al.*, 1998).

En un estudio realizado por Siragusa *et al.* (2007), reportaron el contenido de GABA de 22 diferentes quesos comerciales italianos, los cuales fueron elaborados bajo diferentes tratamientos tecnológicos y encontraron que tanto el tipo de leche empleada, como el tiempo de maduración de los quesos fueron factores determinantes en la producción de GABA. Los resultados indicaron que los quesos semimadurados y con pH ácido presentaron las concentraciones más altas de este compuesto y a su vez las BAL aisladas de estos, mostraron la más alta producción de GABA.

En este contexto, el queso Cocido de Sonora tiene como parte importante en su proceso de elaboración la acidificación de la leche cruda, que normalmente se realiza por la adición de suero fermentado. La fermentación subsecuente ocurre de forma natural, gracias a las BAL propias del suero fermentado usado para la acidificación; el sabor ácido y proceso de cocción de la pasta le proporcionan características únicas que lo distingue de otros quesos (Villegas de Gante,

1993). Las condiciones de acidez que se manejan en este queso pueden promover una mayor actividad de la enzima GAD en las BAL presentes en el, lo cual puede explicar el número de cepas productoras de GABA procedentes de este queso. Sin embargo, en este trabajo las cepas (Q4 St A y L4 Lc B) con mayor capacidad productora de GABA fueron aisladas del queso Fresco de Sonora, que a pesar de ser un queso no madurado puede experimentar una maduración involuntaria adicional por tardarse su distribución y comercialización (Heredia-Castro, 2011). Estos resultados sugieren que dicha capacidad puede estar más relacionada al género y específicamente a la propia cepa, ya que a pesar de que los *Lactobacillus* fueron dominantes en cantidad, las dos cepas mayormente productoras pertenecen a los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus*.

VI.4 Producción de GABA en Leche Fermentada por Cepas de BAL Seleccionadas.

Los resultados de la producción de GABA en las leches fermentadas por las BAL seleccionadas con y sin glutamato se muestran en la Figura 12. Las concentraciones de GABA fueron significativamente diferentes entre la leche sin glutamato y la leche con glutamato, viéndose prácticamente duplicada la producción de GABA en esta última debido a una mayor concentración de sustrato y a que la cantidad de glutamato libre en la leche es limitado.

La cepa Q4 St A fue la que presentó una mayor producción de GABA (0.031 mg/mL) en leche sin glutamato y fue significativamente ($p < 0.05$) igual a L4Lcb (0.026 mg/mL) y superior a *Lb. brevis* (0.011 mg/mL) y CD33 (0.011 mg/mL). Respecto a las leches fermentadas con glutamato, las muestras mantuvieron la misma tendencia. En este caso, la concentración más alta se observó de igual forma para la cepa Q4 St A (0.075 mg/mL), seguida de L4 Lc B (0.057 mg/mL), *Lb. brevis* (0.052 mg/mL) y CD33 (0.034 mg/mL).

En el presente estudio, se utilizó una concentración de glutamato en leche similar al realizado por Seo *et al.* (2013). Ellos evaluaron la producción de GABA en leches fermentadas bajo las mismas condiciones, pero con la cepa *Lb. brevis* 877G. Encontraron una mayor producción de GABA por esta cepa (0.2 mg/mL) en comparación con las cepas *Lb. brevis* y Q4 St A, empleadas en este trabajo. Esto confirma que, independientemente del género al que pertenezcan, las cepas pueden exhibir diferentes comportamientos respecto a la producción de GABA.

Otro factor que se debe tomar en cuenta al momento de producir GABA es el pH del medio de fermentación, debido a que a valores de pH ácidos (entre 4 a 5) es cuando se da una mayor producción de GABA. En el presente estudio, se midió el pH inicial y final de cada una de las leches fermentadas (Tabla 4), corroborando que una vez transcurridos 48 h de fermentación las leches descendieron su pH (Sun *et al.*, 2009).

Tabla 4. Valores de pH de leches fermentadas por BAL con alta capacidad de producción de GABA.

Cepa	pH inicial (0 h)	pH final (48 h)	pH final, leche + glutamato (48 h)
<i>Lb. brevis</i>	6.5	6.28 ± 0.00	5.34 ± 0.02
CD33	6.5	6.29 ± 0.01	6.31 ± 0.01
L4 Lc b	6.5	4.86 ± 0.00	4.92 ± 0.03
Q4 St A	6.5	4.86 ± 0.01	4.95 ± 0.02

La producción de GABA por las BAL se ve afectada por múltiples factores; sin embargo, dicha capacidad puede mejorarse y optimizarse al adecuar condiciones específicas de desarrollo de cada una de las cepas conforme a sus necesidades de crecimiento. Asimismo, pueden adecuarse las condiciones para incrementar la actividad de la enzima GAD. Los resultados que se muestran en este trabajo de investigación, en general, confirman que la

capacidad de las cepas de BAL para producir GABA en leche puede ser evaluada por pruebas cualitativas de la actividad enzimática, puesto que la mayoría de ellas mostró el mismo comportamiento en todas las pruebas realizadas.

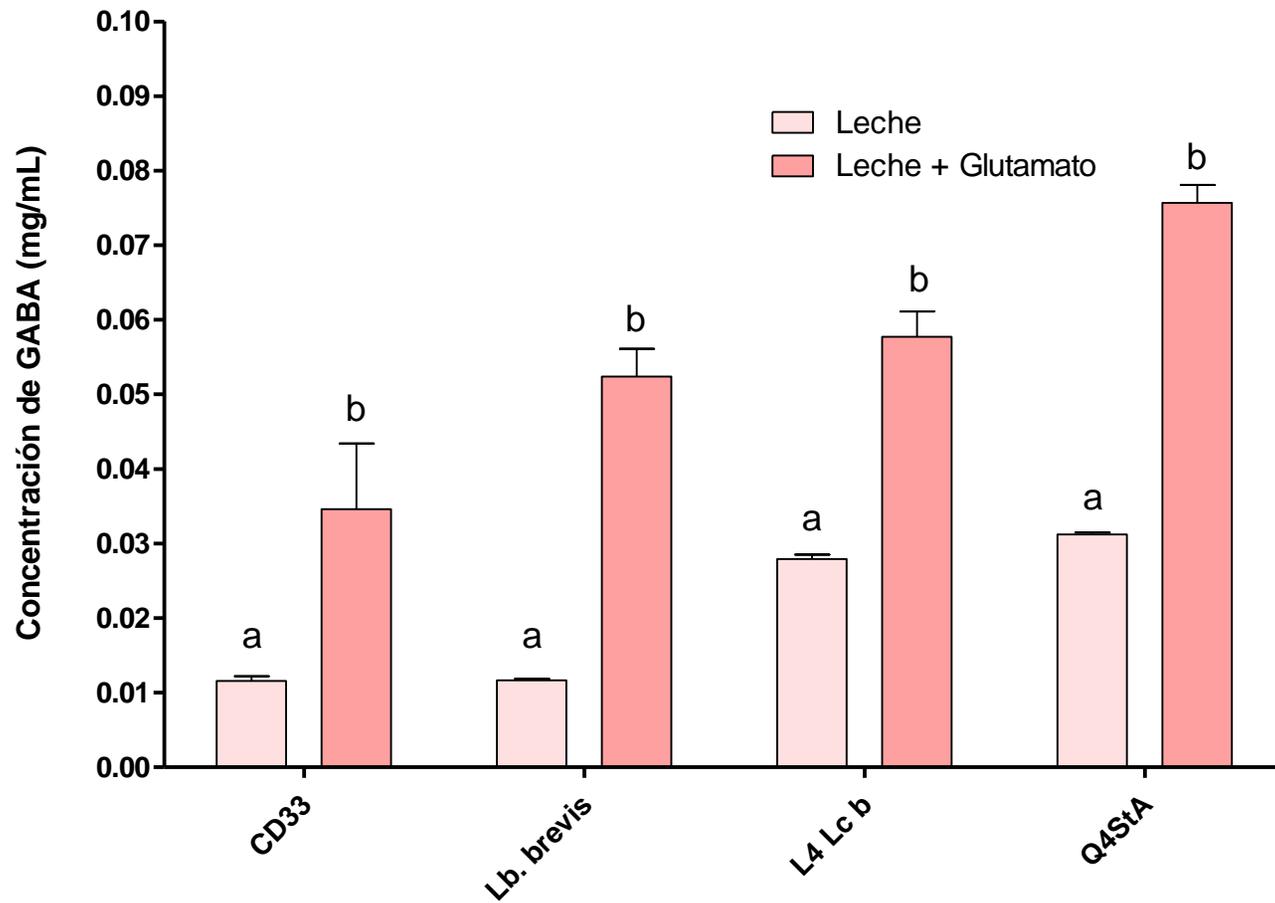


Figura 12. Concentraciones de GABA producido por BAL en leches fermentadas con y sin glutamato.

Los valores representan a las medias \pm error estándar. El experimento se realizó por duplicado (n=2).

VII. CONCLUSIONES

La selección de las cepas con alta actividad de la enzima GAD mediante el método colorimétrico sugiere que las 24 cepas seleccionadas tienen potencial para producir GABA tanto en la reacción de la solución GAD, así como también en leches fermentadas. Gracias a esta propiedad se sugiere la utilización de estas cepas en la elaboración de productos lácteos fermentados que puedan presentar los efectos benéficos del GABA como componente bioactivo.

Por otro lado, los quesos artesanales mexicanos demostraron ser una fuente potencial de aislamiento de cepas de BAL con capacidad para producir GABA. Además, se demostró la relación que existe entre estos quesos y la capacidad de producción del compuesto dada por las BAL aisladas de cada uno de ellos. Sin embargo, se observaron diferencias en las concentraciones de GABA producido por cada una de las cepas aun siendo estas aisladas del mismo queso, lo que sugiere que la capacidad de producir GABA por parte de las BAL es cepa dependiente.

VIII. REFERENCIAS

- Abd El Gawad, I., A. Abd El Fatah, & K. Al Rubayyi (2010). "Identification and characterization of dominant Lactic acid bacteria isolated from traditional rayeb milk in Egypt." *Journal of American Science* 6(10): 728-735.
- Al-Wadei, H. A., H. K. Plummer, M. F. Ullah, B. Unger, J. R. Brody, & H. M. Schuller (2012). "Social stress promotes and γ -aminobutyric acid inhibits tumor growth in mouse models of non-small cell lung cancer." *Cancer Prevention Research* 5(2): 189-196.
- Al Mardini, H., B. al Jumaili, C. Record, & D. Burke (1991). "Effect of protein and lactulose on the production of gamma-aminobutyric acid by faecal escherichia coli." *Journal for Health Professionals and Researchers in Gastroenterology & Hepatology* 32(9): 1007-1010.
- Aoki, H., I. Uda, K. Tagami, Y. Furuya, Y. Endo, & K. Fujimoto (2003). "The production of a new tempeh-like fermented soybean containing a high level of γ -aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67(5): 1018-1023.
- Aoshima, H., & Y. Tenpaku (1997). "Modulation of GABA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by 13-I-hydroxylinoleic acid and food additives." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61(12): 2051-2057.
- Arnold, L. A., G. S. Forkuo, A. N. Nieman, B. Y. Olivia, M. L. Guthrie, N. Y. Yuan, R. Kodali, R. Jahan, C. W. Emala, & J. M. Cook (2016). "A New Pharmacological Approach for Asthma through Tissue-Specific Modulation of the GABA (A) Receptor." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137(2): AB393.
- Banchuen, J., P. Thammarutwasik, B. Ooraikul, P. Wuttijumnong, & P. Sirivongpaisal (2010). "Increasing the bio-active compounds contents by optimizing the germination conditions of southern Thai brown rice." *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 32(3): 219-230.

- Barrett, E., R. Ross, P. O'Toole, G. Fitzgerald, & C. Stanton (2012). "γ-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine." *Journal of Applied Microbiology* 113(2): 411-417.
- Benitez-Romero, L. (2013). "Identificación molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de queso de poro genuino de Balancán, Tabasco." Tesis de Licenciatura Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo(Hermosillo, Sonora, México).
- Binh, T. T. T., W.-T. Ju, W.-J. Jung, & R.-D. Park (2014). "Optimization of γ-amino butyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis*." *Biotechnology Letters* 36(1): 93-98.
- Bo, X. J.-J. J., & X. Shi-Ying (2004). "Rapid determination of glutamate decarboxylase activity from lactic acid bacteria by spectrometric method and its applications " *Microbiology* 2: 015.
- Boonstra, E., R. de Kleijn, L. S. Colzato, A. Alkemade, B. U. Forstmann, & S. Nieuwenhuis (2015). "Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior." *Frontiers in Psychology* 6.
- Budin-Verneuil, A., E. Maguin, Y. Auffray, S. D. Ehrlich, & V. Pichereau (2004). "An essential role for arginine catabolism in the acid tolerance of *Lactococcus lactis* MG1363." *Le Lait* 84(1-2): 61-68.
- Cotter, P. D., & C. Hill (2003). "Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(3): 429-453.
- Crowley, T., J. F. Cryan, E. J. Downer, & O. F. O'Leary (2016). "Inhibiting neuroinflammation: The role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions." *Brain behavior and Immunity* 54: 260-277.
- Cuauhtémoc, S.-S., R.-E. Joel, & S.-O. Silvia (2013). "El sistema de inhibición GABAérgico implicado en la regulación de la ingesta alimentaria y obesidad." *Revista Mexicana de Neurociencia* 14(5): 262-271.
- Danial, A. M., K. S. Peng, & K. Long (2016). "Enrichment of Mung Bean with L-DOPA, GABA, Essential Amino Acids via Controlled Biofermentation Strategy." *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 4(4): 114-122.
- De Rungs-Brown, D. R., A. Víctor-Baldin, & M. E. Robles-Chileno (2016). "Baclofeno un agonista GABA B y su administración para mejorar el

comportamiento del dolor neuropático en ratas." *Revista Mexicana de Anestesiología* 39(1): 20-29.

- Dhakal, R., V. K. Bajpai, & K.-H. Baek (2012). "Production of gaba (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review." *Brazilian Journal of Microbiology* 43(4): 1230-1241.
- Di Cagno, R., F. Mazzacane, C. G. Rizzello, M. De Angelis, G. Giuliani, M. Meloni, B. De Servi, & M. Gobbetti (2010). "Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications." *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(2): 731-741.
- Diana, M., J. Quílez, & M. Rafecas (2014). "Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review." *Journal of Functional Foods* 10: 407-420.
- Diana, M., A. Tres, J. Quílez, M. Llombart, & M. Rafecas (2014). "Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production." *LWT-Food Science and Technology* 56(2): 351-355.
- Diana Pérez, M. (2014). "Desarrollo de un pan de masa madre rico en GABA y péptidos IECA." Tesis Doctoral Universidad de Barcelona(Barcelona).
- Franciosi, E., I. Carafa, T. Nardin, S. Schiavon, E. Poznanski, A. Cavazza, R. Larcher, & K. M. Tuohy (2015). "Biodiversity and γ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional Alpine raw cow's milk cheeses." *BioMed Research International*.
- Gardner-Fortier, C., D. St-Gelais, C. P. Champagne, & J.-C. Vuilleumard (2013). "Determination of optimal conditions for γ -aminobutyric acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*." *International Dairy Journal* 32(2): 136-143.
- Gobbetti, M., R. D. Cagno, & M. De Angelis (2010). "Functional microorganisms for functional food quality." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50(8): 716-727.
- Gómez Romero, M. (2010). *Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales*, Granada: Universidad de Granada.
- Guo, X.-f., H. Aoki, T. Hagiwara, K. Masuda, & S. Watabe (2009). "Identification of High γ -Aminobutyric Acid Producing Marine Yeast Strains by

Physiological and Biochemical Characteristics and Gene Sequence Analyses." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 73(7): 1527-1534.

Gutiérrez-Méndez, N., J. C. Rodríguez-Figueroa, A. F. González-Córdova, G. V. Nevárez-Moorillón, B. Rivera-Chavira, & B. Vallejo-Cordoba (2010). "Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems." *Canadian Journal of Microbiology* 56(5): 432-439.

Han, D., H.-Y. Kim, H.-J. Lee, I. Shim, & D.-H. Hahm (2007). "Wound healing activity of gamma-aminobutyric Acid (GABA) in rats." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(10): 1661-1669.

Heredia-Castro, P. Y. (2011). "Caracterización del proceso de producción del queso cocido artesanal y de las principales bacterias ácido lácticas generadoras de aroma." Tesis de Maestría Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo(Hermosillo, Sonora, México).

Huang, J., M. Lehe, Q. Sheng, Y. Shanqing, & L. Dongqiang (2007). "Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk." *Chinese Journal of Chemical Engineering* 15(2): 157-161.

Hudec, J., L. Kobida, M. Čanigová, M. Lacko-Bartošová, O. Ložek, P. Chlebo, J. Mrázová, L. Ducsay, & J. Bystrická (2015). "Production of γ -aminobutyric acid by microorganisms from different food sources." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(6): 1190-1198.

Inoue, K., T. Shirai, H. Ochiai, M. Kasao, K. Hayakawa, M. Kimura, & H. Sansawa (2003). "Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives." *European Journal of Clinical Nutrition* 57(3): 490-495.

Ito, K., K. Tanaka, Y. Nishibe, J. Hasegawa, & H. Ueno (2007). "GABA-synthesizing enzyme, GAD67, from dermal fibroblasts: evidence for a new skin function." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1770(2): 291-296.

Jannoey, P., H. Niamsup, S. Lumyong, T. Suzuki, T. Katayama, & G. Chairote (2010). "Comparison of gamma-aminobutyric acid production in Thai rice grains." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(2): 257-263.

Jeng, K.-C., C.-S. Chen, Y.-P. Fang, R. C.-W. Hou, & Y.-S. Chen (2007). "Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in

Pu-Erh tea." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(21): 8787-8792.

- Karahan, A., G. B. Kılıç, A. Kart, H. Ş. Aloğlu, Z. Öner, S. Aydemir, O. Erkuş, & Ş. Harsa (2010). "Genotypic identification of some lactic acid bacteria by amplified fragment length polymorphism analysis and investigation of their potential usage as starter culture combinations in Beyaz cheese manufacture." *Journal of Dairy Science* 93(1): 1-11.
- Karatzas, K.-A. G., L. Suur, & C. P. O'Byrne (2012). "Characterization of the intracellular glutamate decarboxylase system: analysis of its function, transcription, and role in the acid resistance of various strains of *Listeria monocytogenes*." *Applied and Environmental Microbiology* 78(10): 3571-3579.
- Kelly, C., & V. Saravanan (2008). "Treatment strategies for a rheumatoid arthritis patient with interstitial lung disease." Queen Elizabeth Hospital Foundation Trust, Department of Rheumatological Medicine.
- Kim, J., & M. Kim (2012). "Enhancement of bioactive components content and the antioxidant activity of green tea after continuous anaerobic incubation." *Journal of Agricultural Science and Technology* 14(4): 837-844.
- Komatsuzaki, N., T. Nakamura, T. Kimura, & J. Shima (2008). "Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 72(2): 278-285.
- Komatsuzaki, N., J. Shima, S. Kawamoto, H. Momose, & T. Kimura (2005). "Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods." *Food Microbiology* 22(6): 497-504.
- Kook, M., & S. Cho (2013). "Production of GABA (gamma amino butyric acid) by Lactic Acid Bacteria." *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 33(3): 377-389.
- Krystal, J., G. Sanacora, H. Blumberg, A. Anand, D. Charney, G. Marek, C. Epperson, A. Goddard, & G. Mason (2002). "Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments." *Molecular Psychiatry* 7: S71-S80.

- Lacroix, N., D. St-Gelais, C. Champagne, & J. Vuilleumard (2013). "Gamma-aminobutyric acid-producing abilities of lactococcal strains isolated from old-style cheese starters." *Dairy Science & Technology* 93(3): 315-327.
- Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen, & A. von Wright (2011). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, CRC Press.
- Le Vo, T. D., T. W. Kim, & S. H. Hong (2012). "Effects of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter on the bioconversion of GABA in engineered *Escherichia coli*." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35(4): 645-650.
- Lee, B.-J., J.-S. Kim, Y. M. Kang, J.-H. Lim, Y.-M. Kim, M.-S. Lee, M.-H. Jeong, C.-B. Ahn, & J.-Y. Je (2010). "Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods." *Food Chemistry* 122(1): 271-276.
- Leroy, F., & L. De Vuyst (2004). "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry." *Trends in Food Science & Technology* 15(2): 67-78.
- Li, H., & Y. Cao (2010). "Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid." *Amino Acids* 39(5): 1107-1116.
- Li, H., D. Gao, Y. Cao, & H. Xu (2008). "A high γ -aminobutyric acid-producing *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai." *Annals of Microbiology* 58(4): 649-653.
- Li, H., T. Qiu, D. Gao, & Y. Cao (2010). "Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912." *Amino Acids* 38(5): 1439-1445.
- Li, H., T. Qiu, G. Huang, & Y. Cao (2010). "Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation." *Microbiology Cell Fact* 9(9): 85.
- Li, Y., Q. Bai, X. Jin, H. Wen, & Z. Gu (2010). "Effects of cultivar and culture conditions on γ -aminobutyric acid accumulation in germinated fava beans (*Vicia faba* L.)." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(1): 52-57.

- Lu, X., Z. Chen, Z. Gu, & Y. Han (2008). "Isolation of γ -aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium." *Biochemical Engineering Journal* 41(1): 48-52.
- Masuda, K., X.-f. Guo, N. Uryu, T. Hagiwara, & S. Watabe (2008). "Isolation of marine yeasts collected from the Pacific Ocean showing a high production of γ -Aminobutyric acid." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 72(12): 3265-3272.
- Nomura, M., H. Kimoto, Y. Someya, S. Furukawa, & I. Suzuki (1998). "Production of γ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening." *Journal of dairy science* 81(6): 1486-1491.
- Nomura, M., M. Kobayashi, S. Ohmomo, & T. Okamoto (2000). "Inactivation of the Glutamate Decarboxylase Gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*." *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 2235-2237.
- Oh, C.-H., & S.-H. Oh (2004). "Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis." *Journal of Medicinal Food* 7(1): 19-23.
- Oh, S.-H. (2003). "Stimulation of gamma-aminobutyric acid synthesis activity in brown rice by a chitosan/glutamic acid germination solution and calcium/calmodulin." *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36(3): 319-325.
- Ongol, M. (2012). "Lactic acid bacteria in health and disease." *Rwanda Journal of Health Sciences* 1(1): 39-50.
- Parkash, J., & G. Kaur (2007). "Potential of PSA-NCAM in neuron-glia plasticity in the adult hypothalamus: role of noradrenergic and GABAergic neurotransmitters." *Brain Research Bulletin* 74(5): 317-328.
- Pessione, E. (2012). "Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2.
- Pouliot-Mathieu, K., C. Gardner-Fortier, S. Lemieux, D. St-Gelais, C. P. Champagne, & J.-C. Vuilleumard (2013). "Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria on blood pressure in men." *Pharmanutrition* 1(4): 141-148.

- Ramírez, J. C. R., P. R. Ulloa, M. Y. Velázquez, J. A. U. González, & F. A. Romero (2011). "Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud." *Universidad Autónoma de Nayarit* 2(7).
- Ratanaburee, A., D. Kantachote, W. Charernjitrakul, & A. Sukhoom (2013). "Selection of γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and their potential as probiotics for use as starter cultures in Thai fermented sausages (Nham)." *International Journal of Food Science and Technology* 48(7): 1371-1382.
- Rissman, R. A., & W. C. Mobley (2011). "Implications for treatment: GABAA receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer's disease." *Journal of Neurochemistry* 117(4): 613-622.
- Rizzello, C., A. Cassone, R. Di Cagno, & M. Gobbetti (2008). "Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(16): 6936-6943.
- Schuller, H. M., H. A. Al-Wadei, & M. Majidi (2008). "Gamma-aminobutyric acid, a potential tumor suppressor for small airway-derived lung adenocarcinoma." *Carcinogenesis* 29(10): 1979-1985.
- Seo, M.-J., Y.-D. Nam, S.-L. Park, S.-Y. Lee, S.-H. Yi, & S.-I. Lim (2013). " γ -aminobutyric acid production in skim milk co-fermented with *Lactobacillus brevis* 877G and *Lactobacillus sakei* 795." *Food Science and Biotechnology* 22(3): 751-755.
- Serrano-Solis, J. M. (2012). "Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas del queso fresco artesanal de Mazatán Sonora." Tesis de Licenciatura Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.
- Settanni, L., & G. Moschetti (2010). "Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits." *Food Microbiology* 27(6): 691-697.
- Shelp, B. J., A. W. Bown, & M. D. McLean (1999). "Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid." *Trends in Plant Science* 4(11): 446-452.
- Sierra, E. C., F. C. P. de León, L. F. G. Domínguez, & A. P. Rivera (2007). "Neurotransmisores del sistema límbico. Hipocampo, GABA y memoria. Primera parte." *Salud Mental* 30(4): 7-15.

- Siragusa, S., M. De Angelis, R. Di Cagno, C. Rizzello, R. Coda, & M. Gobbetti (2007). "Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses." *Applied and Environmental Microbiology* 73(22): 7283-7290.
- Siroli, L., F. Patrignani, D. I. Serrazanetti, G. Tabanelli, C. Montanari, F. Gardini, & R. Lanciotti (2015). "Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce." *Food Microbiology* 47: 74-84.
- Solomon, P. S., & R. P. Oliver (2001). "The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*." *Planta* 213(2): 241-249.
- Somkuti, G., J. Renye Jr, & D. Steinberg (2012). "Molecular analysis of the glutamate decarboxylase locus in *Streptococcus thermophilus* ST110." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39(7): 957-963.
- Soomro, A., T. Masud, & K. Anwaar (2002). "Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health—a review." *Pakistan Journal of Nutrition* 1(1): 20-24.
- Streeter, C., P. Gerbarg, R. Saper, D. Ciraulo, & R. Brown (2012). "Effects of yoga on the autonomic nervous system, gamma-aminobutyric-acid, and allostasis in epilepsy, depression, and post-traumatic stress disorder." *Medical Hypotheses* 78(5): 571-579.
- Su, Y.-C., J.-J. Wang, T.-T. Lin, & T.-M. Pan (2003). "Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30(1): 41-46.
- Sun, T., S. Zhao, H. Wang, C. Cai, Y. Chen, & H. Zhang (2009). "ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China." *European Food Research and Technology* 228(4): 607-612.
- Takayama, M., & H. Ezura (2015). "How and why does tomato accumulate a large amount of GABA in the fruit?" *Frontiers in plant science* 6.
- Tujioka, K., M. Ohsumi, K. Horie, M. Kim, K. Hayase, & H. Yokogoshi (2009). "Dietary γ -aminobutyric acid affects the brain protein synthesis rate in ovariectomized female rats." *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 55(1): 75-80.

- Ueno, Y., K. Hayakawa, S. Takahashi, & K. Oda (1997). "Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobadillus bvevis* IFO 12005." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61(7): 1168-1171.
- Wood, B. J. (2012). *The lactic acid bacteria: Volume 1: The lactic acid bacteria in health and disease*, Springer Science & Business Media.
- Wu, Q., & N. P. Shah (2015). "Gas release-based prescreening combined with reversed-phase HPLC quantitation for efficient selection of high- γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria." *Journal of dairy science* 98(2): 790-797.
- Yang, S.-Y., F.-X. Lü, Z.-X. Lu, X.-M. Bie, Y. Jiao, L.-J. Sun, & B. Yu (2008). "Production of γ -aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation." *Amino Acids* 34(3): 473-478.
- Yang, S. Y., Z. X. Lu, F. X. Lu, X. M. Bie, L. J. Sun, & X. X. Zeng (2006). "A simple method for rapid screening of bacteria with glutamate decarboxylase activities." *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 14(3): 291-298.
- Yang, Z. (2003). "GABA, a new player in the plant mating game." *Developmental Cell* 5(2): 185-186.