



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

**METABOLITOS GENERADOS DURANTE EL PROCESO DE
ELABORACIÓN DE LECHE FERMENTADAS POR
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS SOMETIDAS A UN PROCESO
DE CHOQUE TÉRMICO**

Por

Oscar Espejel Espejel

TESIS APROBADA POR LA

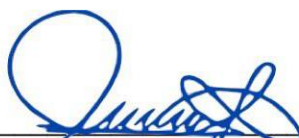
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

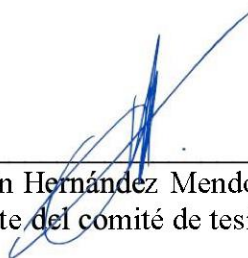
MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

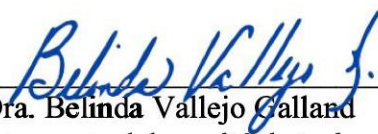
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Oscar Espejel Espejel, la encontraron satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Aarón F. González Córdova
Director de tesis



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Integrante del comité de tesis



Dra. Belinda Vallejo Galland
Integrante del comité de tesis



Dra. Lourdes Santiago López
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Metabolitos Generados Durante el Proceso de Elaboración de Leches Fermentadas por Bacterias Ácido Lácticas Sometidas a un Proceso de Choque Térmico" 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 Osear Espejel Espejel, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección 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 director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Cañe Juvera", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Cañe Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por darme la oportunidad para poder desarrollarme profesionalmente.

Agradezco a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA) y al grupo de trabajo del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos que, bajo el proyecto “Dilucidando los componentes y metabolitos secundarios de la fermentación involucrados en el efecto antiinflamatorio de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas” (CB2017-2018, A1-S-53161), se llevó a cabo el presente trabajo de investigación.

Agradezco primeramente a Dios por darme la fortaleza y la voluntad que me permite seguir avanzando.

Gracias a mí Director de Tesis, Dr. Aarón F. González Córdova por los consejos, el apoyo, la sabiduría y el tiempo brindado para la culminación de este trabajo. Gracias a la Dra. Lourdes Santiago López por su apoyo, asesoría y recomendaciones en la realización del trabajo. Gracias a la Dra. Belinda Vallejo Galland por la disposición brindada y todas las enseñanzas compartidas, y al Dr. Adrián Hernández Mendoza por brindarme la guía necesaria para poder llevar un enfoque acertado al presente trabajo.

Mis agradecimientos en especial a la Dra. María de Jesús Torres Llanez y al Dr. Miguel A. Rendón Rosales, por su apoyo técnico en las metodologías analíticas de HPLC, gracias por su disposición y enseñanzas. Al M. en C. Ricardo Reyes Díaz y al Dr. José Isidro Méndez Romero, por el apoyo y asesoramiento técnico y académico durante el transcurso de la maestría y el presente trabajo. A la Dra. Lilia M. Beltrán Barrientos y a la M. en C. María del Carmen Estrada Montoya, por el apoyo técnico brindado en el laboratorio de lácteos.

Gracias a todos mis compañeros que conocí durante toda la estancia de maestría, que sin duda siempre hubo algo que aprender de ellos: Tere, Paulina, Rodrigo, Johana, Ramsés, Alejandra, Miriam, Maritza Arantxa, Cinthya, Diana, Miguel Pérez, Miguel Álvarez, Jesús, Wilver, Ariana, Carmen Manzanarez, Juan de Dios, Yveth, Adilene, Fernanda, Abigail, Juan Pablo y Juan de Dios, gracias por su amistad.

Un agradecimiento especial al personal de la Unidad de Transferencia y Tecnología (UTI) por el apoyo otorgado durante mi posgrado en busca de mi director de tesis.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mi familia; mi madre Ma. Félix Espejel Páramo, que ha sido mi apoyo incondicional y mi motivación para crecer. A mis hermanos que siempre han estado ahí para apoyarme y brindarme ánimos: Benito, Artemio, Araceli, Leticia, y a todos mis sobrinos: Eduardo, Francisco, Lucero, Mónica, Vanesa, Berenice, Jorge, Jazmín, Paloma, Karla, Cinthya, Valentina y Azucena, que son mi familia y los llevo en el corazón.

A mis cuñadas y cuñados que se han sumado a la familia: Elva, Jessica, Eduardo, Francisco, Alberto. Gracias a todos, aprecio mucho sus palabras de aliento.

CONTENIDO

DECLARATORIA INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE CUADROS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Bacterias Acido Lácticas	15
2.2. Leches Fermentadas y sus Efectos Asociados a su Consumo.....	15
2.3. Bacterias Ácido Lácticas Productoras de Ácido Gamma Aminobutírico.....	17
2.4. Mecanismo de Producción de GABA.....	18
2.5. Factores que Promueven la Producción de GABA.....	19
2.6. Generalidades de las Vitaminas.....	20
2.7. Vitaminas del Complejo B.....	21
2.8. Mecanismos de Síntesis de Vitaminas del Complejo B por BAL.....	23
2.9. Producción de Vitaminas del Complejo B por BAL en Productos Fermentados.....	26
2.10. Cuantificación de GABA y Vitaminas del Complejo B por HPLC.....	28
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo General.....	32
4.2. Objetivos Particulares.....	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1. Medio de Cultivo y Reactivos.....	33
5.2. Origen y Reactivación de Cepas.....	33
5.3. Determinación de la Actividad de la Enzima GAD.....	34
5.4. Preparación de Leche Fermentada.....	34
5.5. Determinación de la Capacidad Acidificante, Recuento de Células Viabiles y Proteólisis.....	34
5.6. Cuantificación de GABA y Vitaminas del Complejo B.....	35
5.6.1. Cuantificación de GABA.....	35
5.6.2. Cuantificación de Vitaminas.....	36
5.7. Análisis Estadístico.....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38

CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

6.1 Capacidad Acidificante (Acidez y pH) y Proteólisis.....	38
6.2 Cuenta Viable de BAL.....	40
6.3 Determinación de la Actividad de la Enzima GAD.....	41
6.4 Cuantificación del Ácido Gamma Aminobutírico (GABA) y Ácido Glutámico.....	43
6.5 Cuantificación de Vitaminas del Complejo B.....	46
7. CONCLUSIONES.....	48
8. REFERENCIAS.....	49
9. ANEXOS.....	57
9.1. Curvas Estándar del Ácido Glutámico y GABA.....	57
9.2. Curvas Estándar para la Determinación de Vitaminas.....	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Efectos de los metabolitos producidos durante la fermentación.....	16
2.	Fuentes de aislamiento de BAL productoras de GABA.....	17
3.	Bacterias productoras de GABA en medio MRS.....	19
4.	Bacterias ácido lácticas productoras de GABA en leche.....	20
5.	Producción de vitaminas por bacterias ácido lácticas en medio de cultivo.....	27
6.	Producción de vitaminas por bacterias ácido lácticas en productos lácteos.....	28
7.	Cuenta viable de BAL en leche fermentada por las cepas de estudio a las 0 y 48 h de incubación.....	41
8.	Valores de L, a, b, y ángulo de Θ HUE, del ensayo colorimétrico.....	42
9.	Concentración de vitaminas ($\mu\text{g/g}$) del complejo B en leches fermentadas a las 48 h de incubación.	46

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
1.	Mecanismo de producción de GABA por descarboxilación de L-glutamato.....	19
2.	Biosíntesis de la producción de Tiamina.....	23
3	Biosíntesis de riboflavina por <i>Bacillus subtilis</i>	25
4	Molécula del verde bromocresol, su ionización y vires de coloración.....	29
5	Valores de pH de leches fermentadas a las 48h de incubación por cepas de <i>Limosilactobacillus</i> spp., y <i>Lactiplantibacillus</i> spp.....	38
6	Concentración de ácido láctico (g/L) en leches fermentadas a las 48 h de incubación por cepas de <i>Limosilactobacillus</i> spp., y <i>Lactiplantibacillus</i> spp.....	39
7	Actividad proteolítica expresada en mg de L-leucina/mL en leches fermentadas a las 48 h de incubación por cepas de <i>Limosilactobacillus</i> spp., y <i>Lactiplantibacillus</i> spp.....	40
8	Determinación de la actividad de la enzima GAD por cepas de <i>Limosilactobacillus</i> spp., y <i>Lactiplantibacillus</i> spp.....	41
9	Esfera de localización del color.	42
10	Tiempo de retención de los estándares de GABA y ácido glutámico.....	43
11	Cromatograma típico para la identificación y cuantificación de GABA y ácido glutámico en leche fermentada por <i>Limosilactobacillus fermentum</i> J23, a las 48 h de incubación.....	43
12	Concentración de ácido glutámico en leches fermentadas por cepas de <i>Limosilactobacillus</i> spp., y <i>Lactiplantibacillus</i> spp., a las 48 h de incubación.....	44
13	Concentración de GABA en leche fermentada por cepas de <i>Limosilactobacillus</i> spp., y <i>Lactiplantibacillus</i> spp., a las 48 de incubación.....	45

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) juegan un papel importante como microorganismos fermentadores, ya que contribuyen a la liberación de metabolitos con efectos benéficos a la salud, como el ácido gamma aminobutírico (GABA) y vitaminas del complejo B. Por otro lado, cepas nativas, aisladas del queso Cocido artesanal, demostraron propiedades probióticas y antiinflamatorias; sin embargo, se desconocen los metabolitos producidos durante el proceso de fermentación láctica. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la producción de GABA y vitaminas del complejo B, por *Limosilactobacillus fermentum* J23, *Lactiplantibacillus pentosus* J24, *Lactiplantibacillus plantarum* J25 y *Lactiplantibacillus pentosus* J27, en leches fermentadas sometidas a un proceso de choque térmico. En leche fermentada (48 h, 37 °C), se determinó la capacidad acidificante (g de ácido láctico y pH), cuenta viable de BAL (UFC/mL), proteólisis (μg de L-leucina/mL) y actividad de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) por espectrofotometría; mientras que la producción de GABA y vitaminas del complejo B fueron determinadas por cromatografía líquida de alta resolución. Se obtuvieron leches fermentadas con una concentración de ácido láctico de 4.12-5.52 g/L y pH de 4.4-5.2. La cuenta viable incrementó 2 ciclos logarítmicos en 3 de las 4 leches fermentadas. La concentración de grupos amino libre fue en un rango de 20.82-84.31 μg de L-leucina/mL, siendo la leche fermentada con J27 quien presentó la mayor concentración, seguida por J24, J23 y J25 ($p < 0.05$). Las cuatro cepas de estudio fueron positivas en la actividad de la enzima GAD; no obstante, en la leche fermentada se tuvo un rango de concentración de 2.71-7.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GABA siendo la leche fermentada con J25 quien presentó la mayor concentración ($p < 0.05$). Todas las cepas biosintetizaron vitaminas del complejo B, destacando la producción de las vitaminas B3, B6 y B12 con rangos de 3.75-14.42, 1.67-4.03, y 2.06-5.8 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente, destacando la leche fermentada con J25 y J27. Los hallazgos de la presente investigación demuestran que las cepas de estudio tienen la capacidad de producir metabolitos, particularmente *Lactiplantibacillus plantarum* J25 y *Lactiplantibacillus pentosus* J27 que se destacaron por biosintetizar GABA y vitaminas del complejo B en leche fermentada.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, Vitaminas, GABA, fermentación, metabolismo.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) play an important role as fermenting microorganisms, since they may contribute to the release of metabolites with potential beneficial health effects, such as gamma-aminobutyric acid (GABA) and vitamin B-complex. On the other hand, recent studies have reported that native strains isolated from artisanal Cocido cheese have probiotic and anti-inflammatory properties; however, metabolites produced during the milk fermentation by these strains are still unknown. Therefore, the objective of the present study was to determine the production of GABA and vitamin B-complex in fermented milks with *Limosilactobacillus fermentum* J23, *Lactiplantibacillus pentosus* J24, *Lactiplantibacillus plantarum* J25 and *Lactiplantibacillus pentosus* J27 subjected to a thermal shock process. In fermented milks (48 h, 37 °C), the acidifying capacity (g of lactic acid and pH), viable LAB count (CFU/mL), proteolysis and glutamate decarboxylase (GAD) enzyme activity were determined by spectrophotometry. Additionally, the production of GABA and vitamin B-complex were determined by reversed-phase high performance liquid chromatography. Results showed that fermented milks produced 4.12-5.52 g/L of lactic acid and presented a pH of 4.4-5.2. Moreover, after 48 h of fermentation, the viable LAB count increased 2 logarithmic cycles in 3 of the 4 fermented milks. The concentration of amino free groups was a range of 20.82-84.31 µg/mL L-leucine, being the fermented milk with J27 was the highest, followed by fermented milk with J24, J23 and J25 (p<0.05). Four study strains were positive in GAD enzyme activity. Nevertheless, fermented milks presented 2.71-7.71 µL/mL of GABA, with J25 presenting the highest production. Moreover, all strains showed the ability to biosynthesize vitamin B-complex (B3, B6 and B12) a range of 3.75-14.42, 1.67-4.03, y 2.06-5.8 µg/g, respectively, in particular, J27 and J25 had higher vitamin B-complex production. These strains showed the capacity to produce important metabolites that may be involved in different potential bioactivities with health beneficial effects. Particularly, *Lactiplantibacillus plantarum* J25 and *Lactiplantibacillus pentosus* J27, showed potential to biosynthesize GABA and vitamin B-complex in fermented milks.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Vitamins, GABA, fermentation, metabolism.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos que se han utilizado principalmente en la fermentación de algunos alimentos (Wang *et al.*, 2021), y que a la vez producen diversos metabolitos que pueden ser benéficos al ser humano (Beltrán-Castro, 2017). Estos metabolitos incluyen el ácido láctico, el ácido linoleico conjugado, bacteriocinas, péptidos bioactivos, ácido gamma aminobutírico (GABA), vitaminas, entre otros (George *et al.*, 2018). Dentro de este grupo de metabolitos, el GABA y las vitaminas se han asociado con propiedades benéficas en el organismo, mismos que se pueden obtener en el proceso de fermentación en leche utilizando microorganismos específicos (Khanlari *et al.*, 2021; Sokovic *et al.*, 2019, Calderón-Ospina *et al.*, 2022).

El GABA se asocia con diversos efectos en la salud como antidepresivo, ansiolítico, antihipertensivo, relajante y antiinflamatorio (Strandwitz, 2018, Santos-Espinosa *et al.*, 2018). Santos-Espinosa y colaboradores (2018), mencionan que *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* son los géneros principalmente reportados como productores de GABA; sin embargo, la capacidad de producir este metabolito no es común en todas las bacterias, su producción depende de factores como la actividad de la enzima glutamato descarboxilasa, la presencia del cofactor Piridoxal 5'-fosfato y las condiciones óptimas de crecimiento de cada cepa (ej., temperatura, pH, concentración del cultivo, tiempo de fermentación), así como de la concentración de ácido glutámico en el alimento (Santos-Espinosa *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2018). La leche es un alimento que contiene los componentes necesarios para la producción de GABA, como es el ácido glutámico (30-50 mg/mL) (Santos-Espinosa *et al.*, 2018).

Por otra parte, las vitaminas son micronutrientes esenciales para el metabolismo de los organismos vivos y participan en funciones biológicas como coenzimas, su deficiencia causa afecciones importantes al cuerpo humano (Parvez *et al.*, 2006, Combs *et al.*, 2012). En específico, las vitaminas del complejo B desempeñan un papel en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos (Pegah *et al.*, 2018). Este tipo de vitaminas también se han asociadas con efectos benéficos al ser producidas por cepas con probada actividad en la modulación del sistema inmune (Levit *et al.*, 2021; Hamzehlou *et al.*, 2018).

Diferentes cepas específicas de BAL aisladas del queso Cocido artesanal del estado de Sonora, han

demostrado potencial probiótico en pruebas *in vitro* y una capacidad fermentativa una vez incorporadas en leche. Estas leches fermentadas al ser administradas en un modelo murino, mostraron la capacidad de modular la producción de citocinas antiinflamatorias (IL-10) y proinflamatorias (IL-6 y TNF) (Santiago-López *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconocen a detalle cuáles metabolitos se producen durante la fermentación, los cuales podrían estar asociados con dichas propiedades. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la generación de los metabolitos ácido gamma aminobutírico y vitaminas del complejo B, por cepas específicas de *Limosilactobacillus fermentum* J23, *Lactiplantibacillus pentosus* J24, *Lactiplantibacillus plantarum* J25 y *Lactiplantibacillus pentosus* J27, en leches fermentadas sometidas a un proceso de choque térmico.

2. ANTECEDENTES

2.1. Bacterias Ácido Lácticas

Las BAL son células procariotas Gram positivas en forma de cocos o bacilos, catalasa negativa, no formadoras de esporas y sin motilidad, que se caracterizan por producir ácido láctico (George *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021). Las especies de BAL más estudiadas comprenden a cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Etragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Ly *et al.*, 2019; Fusco *et al.*, 2015). Este grupo de microorganismos se utilizan como cultivos iniciadores en las fermentaciones de alimentos tradicionales e industriales, lo que mejora su sabor y prolonga su vida útil (Shiby *et al.*, 2013). Las BAL necesitan de ciertos aminoácidos esenciales para su crecimiento y metabolismo celular, algunas no son capaces de sintetizarlos a partir de una fuente nitrogenada mineral simple, pero los obtienen de compuestos orgánicos mediante la proteólisis (auxótrofos), gracias a que cuentan con un complejo sistema proteolítico (Savijoki *et al.*, 2006). Por ejemplo, especies del género *Lactobacillus* son auxótrofos para el ácido aspártico, ácido glutámico, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, lisina e histidina (Siragusa *et al.*, 2007).

2.2. Leches Fermentadas y sus Efectos Asociados a su Consumo

El consumo de leches fermentadas por BAL específicas se ha asociado a algunos efectos benéficos a la salud como antioxidante, antihipertensivo, hipocolesterolémico, antiobesogénico, antimicrobiano y antiinflamatorio, además de otros efectos como la modulación de la respuesta inmune específica a través de la regulación de la producción de citocinas (Maldonado *et al.*, 2020). De acuerdo a Levit y colaboradores (2018) las BAL ayudan a mitigar el daño en la mucosa intestinal y desórdenes gastrointestinales como enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome

del intestino irritable y cáncer colono rectal; debido a que ejercen acción en la normalización de la microbiota intestinal alterada, en la mejora de la función de barrera intestinal, en la prevención del estrés oxidativo y en la estimulación del sistema inmunitario del huésped. En el cuadro 1 se muestran algunos efectos atribuidos a diferentes metabolitos producidos durante la fermentación en leche (Wang *et al.*, 2021).

Cuadro 1. Efectos de los metabolitos producidos durante la fermentación.

Sistema	Efecto	Metabolito	Referencia
Cardiovascular	Antioxidante	Metabolitos intracelulares	Aguilar-Toalá, 2019
	Antihipertensivo	Ácido gamma aminobutírico	Inoue <i>et al.</i> , 2003
	Hipocolesterolémico	Ácido linoleico conjugado	González-Córdova <i>et al.</i> , 2011
Metabólico	Antiobesogénico	Ácidos grasos de cadena corta	Asarat <i>et al.</i> , 2015
		Péptidos	Manzanarez <i>et al.</i> , 2023
Inmune	Antimicrobiano	Bacteriocinas	Heredia-Castro <i>et al.</i> , 2015
	Antiinflamatorio	Exopolisacáridos	Santiago <i>et al.</i> , 2018
	Inmunomodulador	Péptidos bioactivos	Reyes-Díaz <i>et al.</i> , 2018
		Ácido gamma aminobutírico	Reyes-García <i>et al.</i> , 2007
Nervioso	Opioide	Péptidos bioactivos	Pihlanto-Leppälä, 2001

En particular, el GABA se asocia con efectos en la salud como antidepresivo, ansiolítico, antihipertensivo y relajante y antiinflamatorio (Strandwitz, 2018, Santos-Espinosa *et al.*, 2018). El GABA puede modular la actividad de las células inmunitarias asociada con diferentes afecciones inflamatorias sistémicas y entéricas; por ejemplo, disminuye la producción de citocinas inflamatorias en macrófagos (Reyes-García *et al.*, 2007), actúa sobre las células presentadoras de antígeno (APC) disminuyendo las señales de MAPK y las respuestas inflamatorias adaptativas posteriores a las proteínas de mielina (Bhat *et al.*, 2009). Aunado a esto, investigaciones recientes han demostrado que la activación de los receptores GABA puede atenuar la inflamación intestinal al modular la función de las células gliales entéricas mediante la inhibición de la vía NF- κ B (Deng *et al.*, 2023). El papel del GABA en el tracto gastrointestinal es la modulación de la motilidad y la inflamación gastrointestinal (GI), tanto motora como secretora, debido a que las células

GABAérgicas en el intestino incluyen células neuronales y de tipo endócrino, lo que sugiere una modulación por parte del GABA (Auteri *et al.*, 2015).

Las vitaminas, por su parte, también se relacionan con las EII; de acuerdo a Montgomery y colaboradores (2015), mencionan que pacientes con EII tienen deficiencias en vitaminas (vitamina B12, vitamina D, vitamina K, vitamina B1) y también en minerales (por ejemplo: hierro, folato, selenio, zinc). Por esta razón, los pacientes con EII bajo tratamiento, con frecuencia reciben suplementos nutricionales para corregir deficiencias de macro y micronutrientes y mantener un equilibrio positivo de nitrógeno para promover la restauración en el intestino ante la inflamación intestinal (Martínez *et al.*, 2016).

2.3. Bacterias Ácido Lácticas Productoras de Ácido Gamma Aminobutírico

El GABA es un aminoácido no proteico, ampliamente distribuido en la naturaleza y es el principal neurotransmisor presente en el sistema nervioso central de los mamíferos (Xu *et al.*, 2017). Este metabolito se encuentra naturalmente presente en alimentos como papas, brócoli, espinacas, tomates, manzana, cítricos, en algunos cereales como el arroz y el trigo, así como en legumbres, germinados, en el té verde, leches fermentadas y salsas de soya (Diana *et al.*, 2014) y se puede obtener como producto de la fermentación por acción de las BAL (Cuadro 2). La mayoría de las cepas bacterianas reportadas como productoras de GABA pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Santos-Espinosa *et al.*, 2020); la cepa de *Levilactobacillus brevis* NBRC 12005 ha sido utilizada como referente de la producción de GABA (Wu and Shah, 2017).

Cuadro 2. Fuentes de aislamiento de BAL productoras de GABA.

Cepa	Fuente de aislamiento	GABA (mg/mL)	Referencia
<i>L. plantarum</i> DSM19463	Bebida de uva fermentada	0.49	Di Cagno <i>et al.</i> , 2010
<i>L. brevis</i> HYE1	Kimchi	1.51	Lim <i>et al.</i> , 2017
<i>L. brevis</i> l-32	Kimchi	38.00	Han <i>et al.</i> , 2017
<i>L. plantarum</i> L2A21R1	Queso Pico	0.94	Ribeiro <i>et al.</i> , 2018
<i>L. plantarum</i>	Soya fermentada	2.68	Agung-Yogeswara <i>et</i>

IFK 10			<i>al.</i> , 2018
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Alimentos	49.36	Anggraini <i>et al.</i> , 2019
DS15	fermentados de la india		
<i>L. plantarum</i> spp y <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Pepinillo de col	3.66	Karimian <i>et al.</i> , 2020
<i>E. faecium</i> MDM21/ <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BRM3	Masa fermentada (trigo y avena)	0.14	Khanlari <i>et al.</i> , 2021

GABA: Ácido gamma aminobutírico.

Durante la fermentación de la leche, las proteínas se hidrolizan por parte del sistema proteolítico de las BAL en donde el L-glutamato puede ser liberado de la caseína nativa; en leche se ha reportado que contiene el 22.4% y en suero 17.6% (Pellegrino *et al* 2013). De acuerdo a Santos y colaboradores (2020), la leche líquida contiene de 30-50 mg/L de ácido glutámico y 1.6 mg/L de Vitamina B6. La leche descremada en polvo contiene 0.36 µg/100g de Vitamina B6 y 7.57 g/100g de ácido glutámico (USDEC, 2018).

2.4. Mecanismo de Producción del GABA

Las BAL producen GABA como mecanismo de protección contra el estrés inducido por un descenso de pH (Komatsuzaki *et al.*, 2008). Como se muestra en la Figura 1, en condiciones ácidas, el transporte pasivo de H⁺ a través de la membrana celular acidifica el pH intracelular, lo que puede afectar los compuestos y proteínas citoplasmáticas; para que eso no suceda, las BAL, a través de la proteína GAD_C presente en la membrana celular (canal antiporter glutamato-GABA), importan una molécula de ácido glutámico (Glu) del exterior al interior citoplasmático, al mismo tiempo que expulsa una molécula de GABA (Santos *et al.*, 2020). El Glu internalizado es descarboxilado por acción de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) y se genera GABA como producto final de la reacción. Durante la reacción se utiliza al Piridoxal-5-Fosfato (PLP) como cofactor y se consume un ion H⁺, lo que hace que aumente el pH citoplasmático y extracelular por el efecto del GABA (pKa: 4.53 y 10.22) que presenta un pKa mayor que el ácido glutámico (pKa: 2.1, 9.37 y 4.07) (Le Vo *et al.*, 2012).

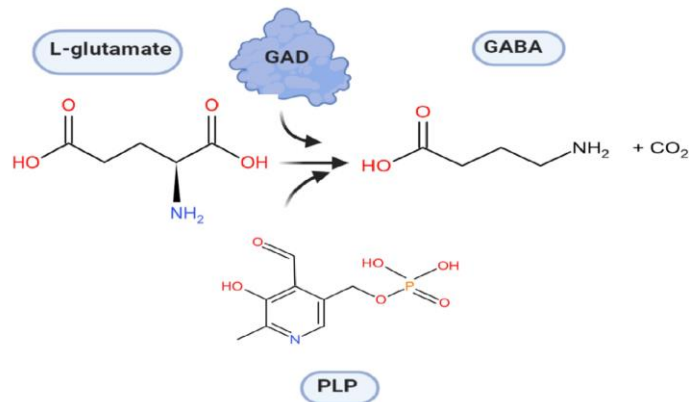


Figura 1. Mecanismo de producción de GABA por descarboxilación de L-glutamato. Reacción catalizada por la enzima GAD con PLP como cofactor (Agung-Yogeswara *et al.*, 2020).

2.5. Factores que Promueven la Producción de GABA

La biosíntesis de GABA por BAL durante la fermentación está regulada por factores como el pH, la temperatura, el tiempo y el contenido de nutrientes en el medio (cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Bacterias productoras de GABA en medio MRS.

Cepa	Producción de GABA (mg/mL)	Condiciones de Fermentación	Referencia
<i>L. plantarum</i> DSM19463	0.49	pH 6.0	Di Cagno <i>et al.</i> , 2010
<i>L. paracasei</i> NFRI 7415	31.14	pH 5.0	Komatsuzaki <i>et al.</i> , 2005
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	7.99	pH 4.5	Yang <i>et al.</i> , 2008
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	7.20	pH 7.5-8.0	Lu <i>et al.</i> , 2009
<i>L. brevis</i> HyE1	1.50	30 °C, 48 h, 1% MSG 2% maltosa, 3% triptófano	Lim <i>et al.</i> , 2017
<i>L. plantarum</i> L2A21R1	0.93	30 °C, 48 h	Ribeiro <i>et al.</i> , 2018
<i>L. plantarum</i> IFK10	2.68	37 °C, 24 h, 5% MSG	Agung-yowesgara <i>et al.</i> , 2018
<i>Pediococcus acidilactici</i> DS15	49.36	30 °C / 72 h 50 mM L-glutamato	Anggraini <i>et al.</i> , 2019

MSG: Glutamato Monosódico.

Cuadro 4. Bacterias ácido lácticas productoras de GABA en leche.

Cepa	Condiciones de Fermentación		GABA (mg/L)	Referencia
<i>Lc. lactis</i> NRRL B-50571	Sin L-glutamato, PLP	10 ⁷ UFC/mL, 37 °C, 48 h	86.0	Santos <i>et al.</i> , 2020
	3g/L de L-glutamato, 100 µM de PLP	10 ⁹ UFC/mL, 37 °C, 48 h	1153	
<i>Streptococcus</i> spp	Sin glutamato	30 °C, 48 h	31	Manzanares <i>et al.</i> , 2016
<i>Lactococcus</i> spp		37 °C, 48 h	26	
<i>Lactobacillus</i> spp			11	
	59.13 mM enriquecida con glutamato mono sódico		75	
			57	
			34	

UFC: Unidades Formadoras de Colonias. PLP: Piridoxal -5'- fosfato.

2.6. Generalidades de las Vitaminas

Las vitaminas son micronutrientes esenciales precursores de coenzimas intracelulares necesarias para regular reacciones bioquímicas vitales en el metabolismo celular, como la replicación y reparación del ADN (Parvez *et al.*, 2006; Leblanc *et al.*, 2011); es decir, esenciales para la regulación del metabolismo, del crecimiento y funcionamiento normales del cuerpo y pueden clasificarse como vitaminas solubles en grasa o en agua (USDEC, 2018). Los seres humanos no pueden sintetizar la mayoría de las vitaminas, por lo que deben obtenerlas de forma exógena al digerir los alimentos y a través de la acción de la microbiota conformada por BAL y otras bacterias comensales. Por otra parte, las bacterias necesitan de las vitaminas en pequeñas cantidades para crecer; sin embargo, algunas no son muy exigentes o se pueden autoabastecer de las mismas (protótrofas) y otras no pueden sintetizarlas debido a la falta de una ruta biosintética (auxótrofas) (Leblanc *et al.*, 2011, Caycedo *et al.*, 2020).

Las vitaminas aportadas por los alimentos son absorbidas en el intestino delgado mediante mecanismos de difusión pasiva, difusión facilitada o transporte activo. Específicamente, las vitaminas liposolubles son absorbidas en forma de micelas por vía linfática, pasan a circulación sanguínea para alcanzar los tejidos donde ejercen su papel. Las cantidades sobrantes de vitaminas pueden ser eliminadas a través de las heces (liposolubles, ácido fólico y B12) y de la orina (A, B1, B2, niacina, ácido pantoténico, B6, biotina, y C) (Levit *et al.*, 2021).

2.7. Vitaminas del Complejo B

Las vitaminas del complejo B son solubles en agua y desempeñan un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos, así como en la síntesis de ácidos nucleicos y actividad antioxidante, las principales fuentes del ser humano son la ingesta en la dieta y las producidas por la microbiota intestinal (Leblanc *et al.*, 2011). Los miembros del grupo de vitamina B son la tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7), folato (B9) y cobalamina (B12) (Pegah *et al.*, 2018). Cada vitamina tiene una función en el organismo, por ejemplo la vitamina B1 participa como cofactor en el metabolismo de la glucosa, el mantenimiento de la función de la membrana nerviosa, la síntesis de mielina y diferentes neurotransmisores (Calderón-Ospina *et al.*, 2020). Por el contrario su deficiencia causa el síndrome de Wernicke-Korsakoff, la enfermedad de Beriberi, que puede tener consecuencias para el sistema cardiovascular y nervioso (Khromova *et al.*, 2022).

De acuerdo con Averianova y Colaboradores (2020), la vitamina B2 promueve la conversión de triptófano en niacina y vitaminas B6 y B9 en sus formas activas, así como la movilización del hierro, mientras que su deficiencia se asocia con problemas oculares, riesgo cardíaco, preeclampsia, anemia, daño hepático, cambios en la piel y alteraciones en el metabolismo de la glucosa cerebral (Levit *et al.*, 2021; Khromova *et al.*, 2022). El índice de ingesta recomendada (IDR) diaria es de 1.3 a 1.7 mg/día de riboflavina (EFSA, 2017).

La vitamina B3 es una de las vitaminas B solubles en agua, conocida como niacina, vitamina PP, son los sustratos para la síntesis de las coenzimas de dinucleótido adenina nicotinamida (NAD⁺) y el derivado fosforilado NADP, así como para la actividad de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1; EC 2.4.2.30) para la cual NAD⁺ es el único sustrato (Fernández *et al.*, 2015). Por lo que es un nutriente que ayuda al organismo a convertir los alimentos en glucosa para producir energía y es fácilmente absorbida en el estómago y en el intestino por difusión pasiva (Fernández *et al.*, 2015). La niacina contribuye con la función normal del sistema nervioso, la reparación del ADN y contribuye con la reducción del cansancio y la fatiga. (Farhan *et al.*, 2021). El grupo de compuestos conocido como vitamina B6, incluye piridoxina, piridoxal y piridoxamina, también, el piridoxal-5'-fosfato (PLP) y la piridoxamina-5'-fosfato (PMP) que son sus formas naturales de coenzima. El PLP es un cofactor esencial para más de 140 reacciones enzimáticas y

se requiere particularmente para la síntesis, degradación e interconversión de los aminoácidos. La principal función de la vitamina B6 es neuroprotectora, contribuye a la regulación de los sistemas adrenérgico, serotoninérgico y glutamatérgico a través de la síntesis de neurotransmisores, como la dopamina, serotonina, GABA y noradrenalina (Calderón-Ospina *et al.*, 2020). La IDR de la vitamina B6 varía de acuerdo con la edad; para los hombres y las mujeres de 19 a 50 años la IDR es de 1.3 mg al día, pero para hombres y mujeres mayores de 50 años es 1.4 mg y 1.3 mg al día, respectivamente (National Academies Press, 1998).

Los folatos son nutrientes clave para la salud humana y son esenciales para garantizar un desarrollo y crecimiento normal (Bailey *et al.*, 2015). El folato tiene una propiedad antioxidante que protege el genoma contra el daño por radicales libres (Leblanc *et al.*, 2007). La deficiencia de folatos se considera un factor de riesgo para enfermedades crónicas y trastornos del desarrollo, incluyendo el autismo, la enfermedad de Alzheimer y la demencia senil; es importante destacar su rol crítico en el desarrollo del tubo neural de los fetos (Araújo *et al.*, 2015, Homayouni *et al.*, 2016) y su relación inversa que tiene con la homocisteína, un aminoácido que se eleva en la sangre cuando existe deficiencia de folato (homocisteinuria) (Zhang *et al.*, 2019). La cantidad de consumo recomendada es 400 µg/día (Salazar *et al.*, 2013).

La vitamina B12 se encuentra en dos formas biológicas como adenosilcobalamina o metilcobalamina. La cianocobalamina tiene el grupo ciano en lugar del grupo adenosilo o metilo como resultado del proceso de extracción, comercialmente la vitamina B12 se encuentra de esta forma (Raux *et al.*, 2000). La vitamina B12 desempeña una función fundamental en muchos procesos bioquímicos que mantienen o restauran un sistema nervioso saludable, como la síntesis de proteínas, ADN y neurotransmisores (Calderón *et al.*, 2020). La vitamina B12 contribuye en el metabolismo nervioso, la síntesis de ácidos grasos, la producción de energía, los procesos de maduración celular y la síntesis de ADN de oligodendrocitos productores de mielina y en la producción de mielina y al igual que la vitamina B9 participa en el metabolismo de la homocisteína (Sasaki *et al.*, 2020). La IDR de vitamina B12 es de 2.4 µg y se encuentra mayoritariamente en la carne, el pescado y otros productos animales (Brouwer *et al.*, 2015).

Las cuatro sustancias relacionadas con la vitamina B12 son la cianocobalamina, la adenosilcobalamina, la metilcobalamina y la hidroxicobalamina (Sasaki *et al.*, 2020). La deficiencia de vitamina B12 se asocia con la inflamación crónica del estómago y enfermedades como la anemia perniciosa, anemia megaloblástica y desórdenes neurológicos (Kozyraki *et al.*

2013). Las vitaminas B1, B6 y B12 son conocidas como neurotrópicas porque tienen efectos neuroprotectores al tratar los síntomas de la neuropatía periférica y restaurar la salud de los nervios (Levit *et al.*, 2021; Calderón-Ospina *et al.*, 2020).

2.8. Mecanismos de Síntesis de Vitaminas del Complejo B por BAL

Las BAL pueden sintetizar algunas vitaminas del Complejo B como riboflavina, folatos, tiamina y cobalamina (Leblanc *et al.*, 2011). Esta capacidad de síntesis es una característica específica de cada cepa y está influenciada por las condiciones de crecimiento, tales como el pH externo en el medio de crecimiento, la temperatura de incubación y la presencia de precursores químicos e incluso la simbiosis entre los cultivos iniciadores (Caycedo *et al.*, 2020; Levit *et al.*, 2021).

La vía de biosíntesis de la vitamina B1 en bacterias es descrita por Radionov y colaboradores (2002), su forma activa es pirofosfato de tiamina y es una coenzima esencial que como se muestra en la Figura 2, se sintetiza mediante el acoplamiento de pirimidina hidroximetilpirimidina (HMP) y restos de tiazol (hidroxietiltiazol), además del uso de aminoácidos como la L-cisteína, Glicina y L-tirosina.

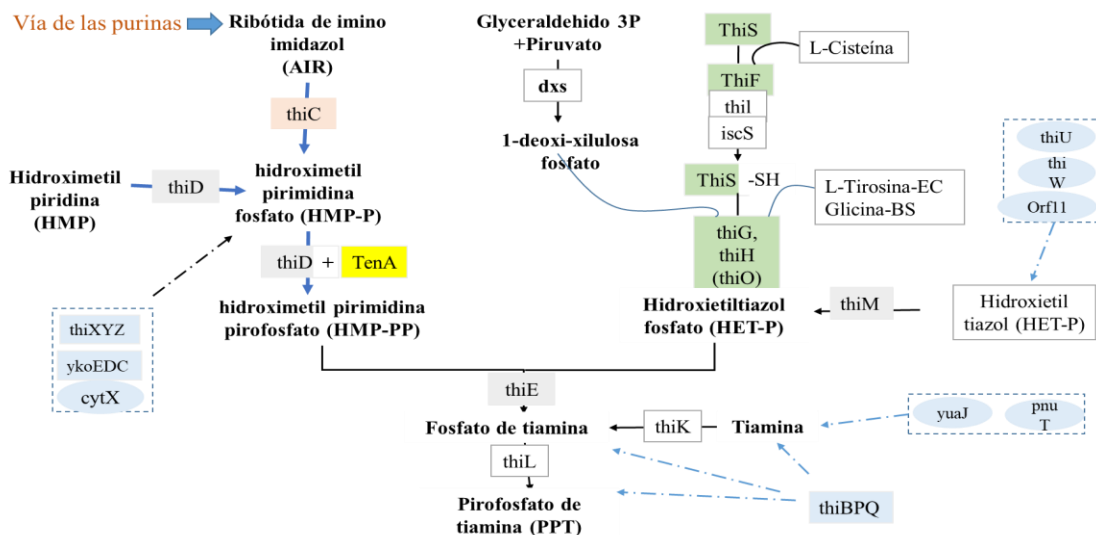


Figura 2. Biosíntesis de la producción de Tiamina (Radionov *et al.*, 2002).

No se han identificado genes reguladores de tiamina en bacterias, pero hay evidencia que en *S. typhimurium*, los operones de TBS thiCEFSGH y thiMD y el operón de transporte de tiamina thiBPQ están regulados transcripcionalmente por el pirofosfato de tiamina. *B. subtilis* tiene un gen regulado por tiamina, thiA, y el operón ywbI-thiKC cuya transcripción está parcialmente reprimida por tiazol, pero no por tiamina (Radionov *et al.*, 2002).

Para la B2, las bacterias utilizan una vía compleja descrita en la Figura 3 que involucra siete etapas enzimáticas de los precursores como guanosina trifosfato (GTP) y D-ribulosa-5-fosfato (Ribulosa-5P), metabolismo de purina y vía de fosfato pentosa (Levit *et al.*, 2021), y aunque no se comprende completamente cómo se regula, se ha encontrado que una sobreproducción de riboflavina se describió cuando los cuatro genes biosintéticos (ribG, ribH, ribB y ribA) se sobre expresaron simultáneamente en *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 que contiene pNZGBAH (Burgues *et al.*, 2004). Por otra parte, la riboflavina es el precursor del mononucleótido de flavina y el dinucleótido de flavina adenina, estas dos coenzimas ayudan en el metabolismo de los carbohidratos, aminoácidos y la producción de energía (Pérez *et al.*, 2022). De acuerdo con Averianova y colaboradores (2020), algunas especies bacterianas productoras naturales de vitamina B2 son: la *Salmonella typhimurium*, *C. ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *E. coli*, *L. lactis* subsp *cremoris* NZ9000.

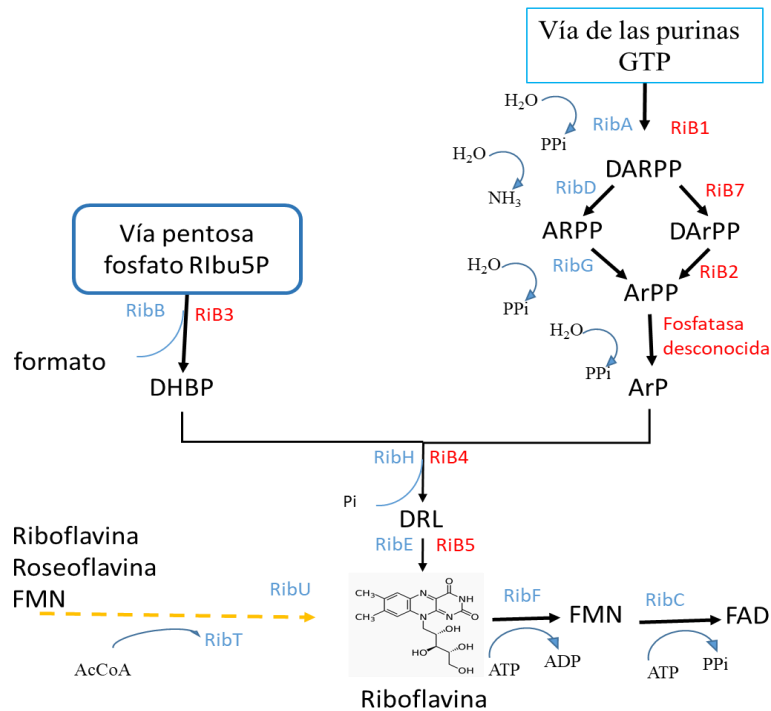


Figura 3. Biosíntesis de riboflavina por *Bacillus subtilis* (Averianova *et al.*, 2020).

Para la vitamina B3, el ácido nicotínico (ácido piridina-3-carboxílico) se obtiene a través de la oxidación de la nicotina y sus derivados que exhiben su actividad biológica en la forma de nicotinamida (ácido nicotínico y su grupo amida) (Fernández *et al.*, 2015).

El ácido nicotínico y el triptófano son los precursores del NAD^+ a través de la vía quinurenina, aunque es bastante ineficiente y depende de enzimas que requieren de vitamina B6 y B2, como también de un enzima que contiene hemo (hierro). Dado que la mayoría de las proteínas contienen aproximadamente un 1% de triptófano, una ingesta diaria de 100 g de proteína se considera suficiente para mantener un nivel adecuado de niacina. La leche contiene 0.51g de triptófano por cada 100 gramos de proteína láctea. Los productos lácteos aportan triptófano, un aminoácido que el cuerpo puede utilizar para la elaboración de niacina; 60 mg de triptófano equivalen a 1 mg de niacina, aunque la leche descremada contiene 0.51g/100g de triptófano (USDEC 2018).

El ácido fólico (ácido pteroyl-L-glutámico) (PGA) está compuesto de ácido para-aminobenzoico (PABA), anillo de pteridina y ácido L-glutámico, es la forma químicamente sintetizada de folato (vitamina B9, vitamina Bc (o folacin) y pteroyl-L-glutamato), se utiliza para fortificación y suplementación; sin embargo, en ingesta alta de ácido fólico sintético puede causar efectos

adversos como la deficiencia de vitamina B12 (Homayouni *et al.*, 2016). Las formas naturales de folato son 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), 5-formiltetrahidrofolato (5-formil-thf), 10-formiltetrahidrofolato (10-formyl-thf), 5,10-metilenetetrahidrofolato (5,10-metilen-thf) , 5,10-meteniltetrahidrofolato (5,10-metenil-thf), 5 forminotetrahidrofolato (5-formimino-thf), 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF) y dihidrofolato (DHF) (Homayouni *et al.*, 2016).

El folato en forma de metiltetrahidrofolato, producido por las BAL, no tiene efectos secundarios cuando se administra en exceso (Zhang *et al.*, 2019) y su síntesis comprende 17 reacciones enzimáticas, siendo sus tres partes estructurales principales la pteridina, el ácido para-aminobenzoico y el glutamato (Homayouni *et al.*, 2016); o también 45 reacciones si se incluye la síntesis de vitámeros de folato a partir de dihidrofolato. La capacidad de producir folato es específica de cada cepa y está influenciada por las condiciones de crecimiento (Levit *et al.*, 2021). Actualmente se tiene conocimiento de que *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *S. thermophilus*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus lactis* pueden sintetizar folatos en medio MRS (Albano *et al.*, 2020). Existen dos genes identificados en la biosíntesis de folatos: folK (EC 2.7.6.3) y folP (EC 2.5.1.15) (Czarnowska *et al.*, 2011).

Para la vitamina B12, Leblanc y colaboradores (2011), mencionan que el término de vitamina B12 se utiliza para describir un tipo de corrinóide de cobalto, del grupo de las cobalamina, que pertenece a la familia del grupo protésico de los derivados del tetrapirrol. La vía biosintética de la cobalamina es una de las vías biosintética que requiere alrededor de 30 reacciones catalizadas por enzimas para su síntesis completa de novo (Raux *et al.*, 2000). Teniendo el origen a partir del ácido 5-aminolevulínico (ALA) que se convierte en Uroporphyrinogen III.

2.9. Producción de Vitaminas del Complejo B por BAL en Productos Fermentados

El uso de BAL para la fermentación de productos lácteos y alimentos se ha considerado como un enfoque de biofortificación para aumentar las concentraciones de algunas vitaminas, principalmente en el contenido de ácido fólico y la vitamina B12 (Livia-Alm, 1982). Por ejemplo, Melini y colaboradores (2019) mencionan que la fermentación de la leche puede aumentar hasta

10 veces su contenido de vitamina B12 y en la vitamina B9 sus valores pueden llegar a ser superiores a 200 µg/L, mientras que en caso de la vitamina B2 puede aumentar o disminuir significativamente su concentración, dependiendo de varios factores como las condiciones de fermentación y algunos otros compuestos como la concentración de MgSO₄, K₂HPO₄, and FeSO₄ (Oraei *et al.*, 2018). Además, la cantidad de vitaminas en los alimentos fermentados se ve influenciado por la cepa fermentadora (Cuadro 5) debido que algunas la asimilan y utilizan en pequeñas cantidades para su desarrollo como factores de crecimiento (Corrales *et al.*, 2013, Varela., 2018, Czarnowska-Kujawska *et al.*, 2021).

Cuadro 5. Producción de vitaminas por bacterias ácido lácticas en medios de cultivo.

Cepa	Medio de cultivo	Vitaminas	Concentración (µg/mL)	Referencia
<i>L. plantarum</i> sp	MRS	B1	0.06	Chibuike <i>et al.</i> , 2019
<i>L. fermentum</i> sp	MRS	B1	0.06	Chibuike <i>et al.</i> , 2019
<i>L. plantarum</i> CRL 725	MRS	B2	0.70	Juárez <i>et al.</i> , 2014
<i>Lc. lactis</i> sp	MRS	B3	0.01	Chibuike <i>et al.</i> , 2019
<i>L. plantarum</i> VKPM B-11007	MRS	B6	3.45	Khromova <i>et al.</i> , 2022
<i>L. casei</i> VKPM B-2873	MRS	B6	11.40	Khromova <i>et al.</i> , 2022
<i>L. fermentum</i> CRL973	FACM	B9	0.01	Laiño <i>et al.</i> , 2014
<i>L. plantarum</i> CRL 103	FACM	B9	0.06	Laiño <i>et al.</i> , 2014
<i>L. plantarum</i> LZ95	MRS	B12	0.10	Li <i>et al.</i> , 2017
<i>L. plantarum</i> CY2	MRS	B12	0.06	Li <i>et al.</i> , 2017
<i>L. amylovorus</i> CRL887	FACM	B9	0.08	Laiño <i>et al.</i> , 2014

MRS: medio de cultivo (de Man, Rogosa y Sharpe), FACM: medio de cultivo libre de folato.

Las bacterias producen folatos de forma intracelular y lo usan para su crecimiento, pero este también puede ser secretado (Greppi *et al.*, 2017). Durante la fermentación, la mayoría de las BAL productoras tienden a consumir el folato en el medio, pero no sintetizarlo. Los productos lácteos fermentados son una opción apropiada de biofortificación de folato (Leblanc *et al.* 2007).

Cuadro 6. Producción de vitaminas por bacterias ácido lácticas en productos lácteos.

Cepa	Matriz de fermentación	Vitaminas	Concentración	Referencias
<i>L. lactis</i> sp	Suero de leche	B2	2.61 µg/mL	
<i>L. acidophilus</i> sp	Leche descremada reconstituida (13.5%)	B2	2.93 µg/mL	Guru <i>et al.</i> , 2013
<i>S. thermophilus</i> CSCC 2000	Leche descremada fermentada	B9	0.05 µg /g	Crittenden <i>et al.</i> , 2003
<i>L. bulgaricus</i> 448	Leche descremada fermentada	B9	0.62 µg/g	Lin y Yung 2000

La leche en polvo utilizada en la elaboración de diversos productos lácteos, también contienen vitaminas del complejo B. Guru y colaboradores (2013), reportan 1250 µg/L y 1187 µg/L de Vitamina B2 en la leche reconstituida de polvo y en suero obtenido en la elaboración de quesos, respectivamente. Crittenden y colaboradores (2003), mencionan que la cantidad de folato en leche descremada reconstituida sin fermentar es de 11.5 ng/g; en cambio, Mahara y colaboradores (2021), encontraron que contenía 41.1 ng/mL.

Es importante mencionar que la leche de vaca es una buena fuente de vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles, excepto ácido ascórbico, vitamina B9 y vitamina B12 (Livia-Alm., 1982); sin embargo, su concentración de vitaminas se ve influenciada por las condiciones de almacenamiento y tratamientos que recibe, como la pasteurización, el desnatado y la fermentación. Por otra parte, el procesamiento y la cocción de los alimentos destruyen algunas de las vitaminas en las materias primas (Melini *et al.*, 2019). De acuerdo con Herrera y colaboradores (2022), las vitaminas que se degradan por pasteurización (85 °C/15 s) son la vitamina B12 de hasta un 94%; en contraste, la vitamina B1 se reduce un 4% por tratamiento de ultra alta temperatura (UHT a 139 °C/5 s).

2.10. Cuantificación de GABA y Vitaminas del Complejo B por HPLC

Detección y cuantificación de GABA. Para la cuantificación del GABA en un medio, es necesario

antes determinar la presencia y actividad de la enzima responsable de la síntesis, la enzima ácido glutamato descarboxilasa (GAD), a través del ensayo colorimétrico conocido como ensayo GAD que se basa en la conversión de una molécula de ácido glutámico en GABA y CO₂, reacción que consume un protón de H⁺ intracelular, mientras se elimina un grupo carboxilo del ácido glutámico por acción de la enzima GAD, liberando dióxido de carbono como producto (Beltrán-Castro *et al.*, 2017). Se utiliza el verde de bromocresol como indicador para visualizar esta reacción ácido-base debido a que este cambia de color conforme cambia el pH. El intervalo de transición del verde de bromocresol oscila entre 3.8–5.4 en la escala de pH, virando de amarillo a azul-verdoso. En solución acuosa, ioniza para dar la forma monoaniónica (amarillo), que desprotona a pH elevado para dar forma dianiónica (azul) (Diamond *et al.*, 2008).

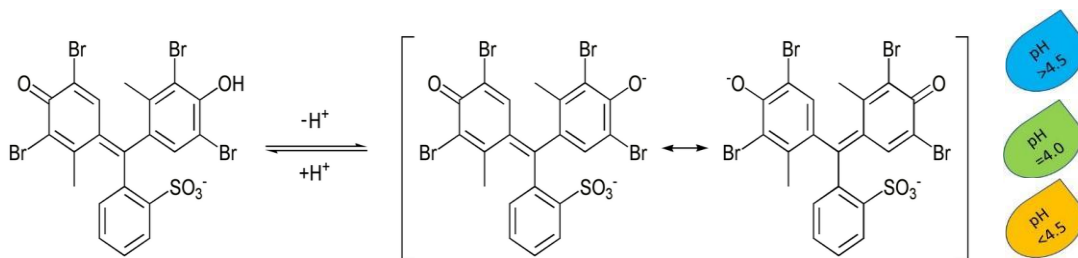


Figura 4. Molécula del verde bromocresol, su ionización y vires de coloración.

Después de haber detectado que las especies bacterianas de estudio presentan la enzima GAD, con capacidad de producir GABA, se procede a cuantificarla. Los métodos a utilizar pueden ser: espectrometría de masas (EM), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), resonancia magnética nuclear (RMN), electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser (CE-LIF), cromatografía líquida acoplada a masas en tándem (LC-MS/MS) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) (Beltrán-Castro, 2017).

Detección y cuantificación de vitaminas. Diversas vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles se han podido determinar en diferentes leches, sobre todo en fórmulas infantiles (Albalá *et al* 1997) que han sido enriquecidas con vitaminas que compensan su pérdida durante el proceso. En leche de burra y de vaca se ha determinado vitaminas como tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina y ácido fólico (Vincenzetti *et al.*, 2020), de las cuales existe diferencia en el contenido vitamínico de la leche fermentada con respecto a la original (Corrales *et al.*, 2013).

Para su determinación, se utilizan métodos como en ensayo microbiológico y la determinación por HPLC; sin embargo, Sasaki y colaboradores (2020), mencionan que el método microbiológico que se utiliza para cuantificar vitaminas del complejo B tiene una mala reproducibilidad en términos del tratamiento de los microorganismos y solo se puede analizar individualmente, teniendo así una mala especificación. El método espectrofotométrico también tiene una mala especificación para el análisis de vitaminas B, como tiamina y riboflavina; pero el método de HPLC puede cuantificar el complejo de vitamina B con alta especificidad y sensibilidad (Sasaki *et al.*, 2020). Albalá y colaboradores (1997), utilizó la cromatografía de par ión con una columna C18 de fase inversa para detectar 6 vitaminas del complejo B, con un detector de UV y a diferente longitud de onda.

3. HIPÓTESIS

Cepas específicas de bacterias ácido lácticas pertenecientes a los géneros *Lactiplantibacillus* y *Limosilactobacillus*, generan los metabolitos GABA y vitaminas del complejo B, durante la elaboración de leche fermentada sometida a un proceso de choque térmico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la generación de los metabolitos ácido gamma aminobutírico y vitaminas del complejo B, por cepas específicas de *Limosilactobacillus fermentum* J23, *Lactiplantibacillus pentosus* J24, *Lactiplantibacillus plantarum* J25 y *Lactiplantibacillus pentosus* J27, en leches fermentadas sometidas a un proceso de choque térmico.

4.2. Objetivos Particulares

1. Evaluar la capacidad acidificante de las cepas de estudio, en leches fermentadas.
2. Detectar, mediante espectrofotometría, la presencia y actividad de la enzima glutamato descarboxilasa en las cepas de estudio.
3. Cuantificar la producción de ácido gamma aminobutírico en leches fermentadas por las cepas de estudio.
4. Evaluar la capacidad de las cepas de estudio para generar vitaminas del complejo B en leches fermentadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Medio de Cultivo y Reactivos

El caldo y agar MRS se obtuvieron de DIFCO™ (Sparks, MD, EUA). Agar bacteriológico de Merck (Darmstadt, Alemania), L-glutamato, cloruro de sodio dibásico, metanol, solución de Orto-ftalaldehído (OPA) Fluoraldehyde y Tritón X-100 de Sigma-Aldrich (Chemical Co., St. Luis, MO, EUA). Fosfato de sodio monobásico, verde de bromocresol de JT Baker (St Luis. MO. USA.), acetato de sodio de Merck (Darmstadt, Alemania) y acetonitrilo de Thermo Fisher (Muskegon, MI. EUA).

5.2. Origen y Reactivación de Cepas

Las cepas de estudio *Limosilactobacillus fermentum* J23, *Lactiplantibacillus pentosus* J24 y J27 y *Lactiplantibacillus plantarum* J25 fueron obtenidas de la colección de cepas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México, las cuales fueron aisladas del proceso de elaboración del queso Cocido artesanal de Sonora, México (Heredia-Castro *et al.*, 2015). La cepa *Levilactobacillus brevis* NBRC 12005 se utilizó como testigo positivo en la producción de GABA. El cultivo de las bacterias se realizó en caldo MRS (pH 6.5), inoculados al 1% (v/v) e incubados a 37 °C, por tres tiempos consecutivos que fueron de 24, 18, 6 o 7 h. Las bacterias del último subcultivo fueron centrifugadas a 3600 xg, 10 °C, 10 min (Sorvall ST16, Thermo Scientific, Chelmsford, MA, EUA) y el paquete celular se lavó dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS; 0.02 M, pH 7.2). Finalmente, se ajustó la concentración celular a 10⁸ UFC/mL (D.O₆₀₀ nm). Para *Levilactobacillus brevis* NBRC 12005, su reactivación se realizó de acuerdo con Santos-Espinosa y colaboradores (2020), considerando los tiempos 24, 18 y 12 h a 37 °C en condiciones anaerobias.

5.3. Determinación de la Actividad de la Enzima GAD

Para la identificación de BAL productoras de GABA se realizó un ensayo colorimétrico descrito por Santos-Espinosa y colaboradores (2019). El último subcultivo de cada cepa se centrifugó a 4696 xg, 25 °C, 20 min (Sorvall ST16) y el paquete celular se lavó dos veces con una solución de NaCl (0.9% p/v) y se resuspendió en 0.5 mL de una solución GAD (1 g de glutamato monosódico, 0.3 mL de Tritón X-100, 90 g de NaCl y 0.05 g de verde de bromocresol, en 1 L de agua destilada, pH 4.0). Las muestras se dejaron incubar a 37 °C durante 4 h en condiciones anaerobias. Finalmente se midió el color de la reacción utilizando el equipo CR-400 (Chroma Meter, Konica Minolta).

5.4. Preparación De la Leche Fermentada

Para la preparación de leche fermentada, leche semidescremada en polvo se reconstituyó al 10% (p/v) y fue tratada térmicamente a 80 °C por 30 min a la cual posteriormente se le aplicó un choque térmico, llevándola a 4 °C. Posteriormente, los cultivos ajustados fueron inoculados (3%, v/v) individualmente en leche para realizar un primer preinóculo y se dejó incubar a 37 °C por 18 h. Para la fermentación, a partir del preinóculo se tomó una alícuota al 3% (v/v) y se adicionó en leche y se dejó incubar a 37 °C por 48 h. Se detuvo la fermentación aplicando un tratamiento térmico (75 °C, 15 min) y se dejó enfriar en hielo hasta alcanzar una temperatura de 4 °C. Se midió la acidez (g de ácido láctico/L), pH, y cuenta viable a las 0 y 48 h. Para *Levilactobacillus brevis* NBRC 12005, el pre-inóculo consistió únicamente de 12 h, pero la fermentación se realizó bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

5.5. Determinación de la Capacidad Acidificante, Recuento de Células Viables y Proteólisis

El pH y la acidez titulable (g/L) se realizaron siguiendo metodologías estándar establecidas por la

AOAC. El recuento de células viables se determinó utilizando la técnica de vertido en placa. Se prepararon diluciones en serie de cada leche fermentada en una solución de agua peptonada y se tomó 1 mL de la dilución adecuada y se colocó en una placa Petri, seguido de la adición de 15 mL de agar MRS. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h en condiciones de anaerobiosis. La concentración se reportó en unidades formadoras de colonias (UFC)/mL.

La determinación de la actividad proteolítica, se cuantificó por medio de la determinación de grupos amino (NH₃) libres por espectrofotometría, utilizando el método del o-phthaldialdehído (OPA) (Church *et al.*, 1983) con algunas modificaciones. El procedimiento consistió en mezclar 1 mL de ácido tricloroacético 0.75N (p/v) con 0.5 mL de leche fermentada más 0.1 mL de agua milli-Q y se agitó por de 1 min en un Vortex (VWR, USA). La mezcla se centrifugó a 4000 xg, 40 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, en una microplaca oscura, se colocaron 20 µL de cada muestra y se agregaron 200 µL del reactivo OPA. Se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente (24 °C) y se registró la fluorescencia, a una longitud de onda de 340 nm de excitación y 455 nm emisión (Espectro MaxM3). Los resultados se expresaron como mg/mL de L-leucina y se infirieron utilizando una curva estándar con diferentes concentraciones (0.5, 0.25, 0.125, 0.061, 0.031, 0.015, 0.0 mg/mL).

5.6. Cuantificación de GABA y Vitaminas del Complejo B

5.6.1 Cuantificación de GABA y ácido glutámico

Para la determinación de GABA y ácido glutámico, 1.5 mL de cada leche fermentada se centrifugó a 12000 xg, 10 min, 4 °C (Eppendorf 5407, Hamburg Alemania). El sobrenadante obtenido se filtró (membrana de 0.22 µm) y se utilizó para la determinación de GABA y ácido glutámico. Se usó el ácido alfa-aminobutírico (AABA) a una concentración de 0.29 mM/L como estándar interno, adicionando 20 µL por cada 80 µL de la mezcla de reacción.

Para la identificación y cuantificación de GABA y ácido glutámico, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución-fase reversa (HPLC-RF) en un sistema Infinity 1290 (Agilent-Technology,

Waldbronn, Alemania) y previo a su análisis, la muestra llevó un proceso de derivatización con OPA (Vázquez *et al.*, 1995). Para ello, en el equipo HPLC, adaptado con un automuestreador, se colocaron dos insertos, uno conteniendo 100 μL de reactivo OPA previamente preparado y el otro conteniendo 100 μL de extracto con estándar interno. El equipo automuestreador fue programado para llevar a cabo la reacción de derivatización, consistiendo en mezclar 10 μL de cada solución y, los 20 μL fueron inyectados al equipo. La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna C18 (250 mm, 25 mm, 5 μm). La fase móvil A consistió de acetato de sodio 0.1 M (pH 7.2), y la fase B consistió de acetonitrilo, metanol y agua mili-Q (45:45:10, pH 7.2). El gradiente de separación fue: 0 min (A: 90, B: 10) 4 y 8 min (A: 70, B: 30), 10 min (A: 60, B: 40), 11 min (A: 50, B: 50), 12 y 15 min (A: 40, B: 60), 16 min (A: 30, B: 70) y 18 a 20 min (A: 20, B: 80), de 0.75 mL/min a una presión de 375 bares. La identificación se realizó con un detector de diodos (Agilent-Technology) y a una longitud de 338 nm y las condiciones de flujo de 0.75 mL/min.

Para la cuantificación, se construyó una curva de calibración de 8 puntos entre 50 y 0.195 $\mu\text{g/mL}$ de estándar de GABA y entre 0.39 y 50 $\mu\text{g/mL}$ ácido glutámico, disueltos en agua milli-Q; se adicionó estándar interno y se corrió bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

5.6.2 Cuantificación de Vitaminas

La preparación de las muestras consistió en pesar 2 g de leche fermentada y se agregaron 5 mL de bicarbonato de sodio al 1%, seguido de 5 min de sonicación (Ultrasonic Bath, Aquasonic 50D VWR Scientific) a una frecuencia de 20 kHz, temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 5 mL de ácido clorhídrico (0.1 N), agitación 5 min en vortex seguido de una centrifugación a 1500 rpm, 10 min, 4 °C (Centrifuga refrigerada Eppendorf modelo 5717R, Hamburg, Alemania) (Sánchez-González, 2015) y el sobrenadante obtenido se pasó por un filtro de 0.22 μm . La leche sin fermentar fue utilizada como testigo y el sobrenadante se filtró dos veces, primero con filtro de 0.45 μm y el segundo de 0.22 μm .

Para la determinación se siguió la metodología reportada por Siji y colaboradores (2011). Las longitudes de onda que se usaron fueron a 214 nm para las vitaminas B3 y B12, 220 nm para B6, 232 nm para B1, 280 nm para B9, y 267 nm para B2 (Agilent-Infinity, 1260). La separación

cromatográfica se realizó con una columna Poroshell120 EC-C18 2.7 μm , 30 x150 mm con un volumen de inyección de 20 μL . Para la cuantificación se realizó una curva estándar de 0.360 mg/mL a 0.0001 mg/mL. La fase móvil A consistió de fosfato mono potásico (10 mM, pH 6.0) y la fase B fue acetonitrilo grado reactivo. El flujo de la fase móvil fue de 0.35 mL/min a una presión de 233.26 bar. La elución se realizó con un gradiente lineal a diferentes tiempos: 0 min (A: 90, B: 1), 7 min (A: 70, B: 30), 18 min (A: 70, B: 30), 24 min (A: 70, B: 30), y 24.56 min (A: 99, B: 1).

5.7. Análisis Estadístico

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía a un 95% de confianza. La comparación de medias para las variables de pH, acidez, se realizó con la prueba de Tukey-kramer; mientras que para la determinación de GABA y vitaminas se comparó con la prueba de LSD-Fisher. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software NCSS 2022.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Capacidad Acidificante (Acidez y pH) y Proteólisis

Los valores de pH y acidez se muestran en la Figura 5. Los valores de pH de las leches fermentadas estuvieron en un rango de 4.4 a 5.2 mostrando diferencia entre muestras ($p < 0.05$) entre las leches fermentadas por J24, J27 y J23, J25. Reyes-Díaz y colaboradores (2018), reportaron que las leches fermentadas con las cepas J23, J24 y J27 disminuyen el pH hasta 4.6, muy cercano a los valores de pH reportado en este estudio para J24 y J27. En este estudio se realizó cambios en el proceso de fermentación lo que puede explicar las diferencias en el cambio de pH entre ambos estudios sobre todo en la J23.

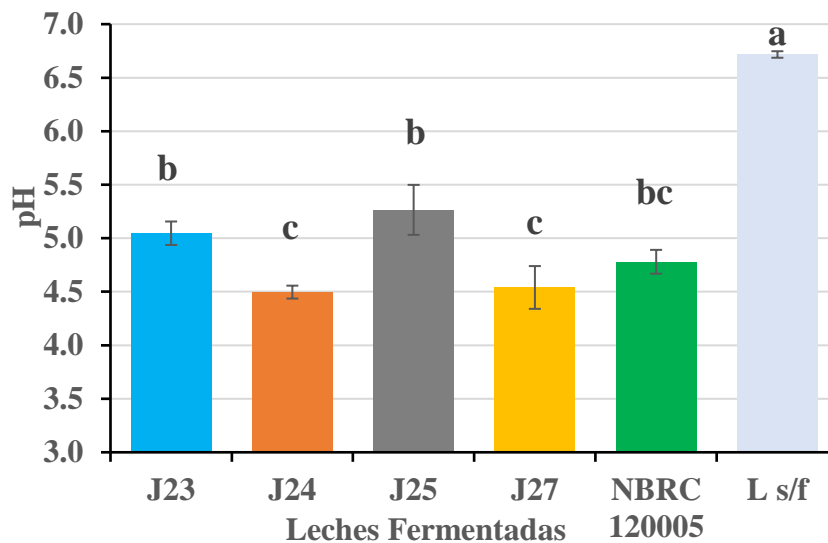


Figura 5. Valores de pH de leches fermentadas a las 48 h de incubación por cepas de *Limosilactobacillus* spp., y *Lactiplantibacillus* spp. Los resultados muestran la media \pm DE (n=3). Literales diferentes indican diferencia ($p < 0.05$) entre leches fermentadas.

De acuerdo con Santiago-López y colaboradores (2018), la actividad β -galactosidasa (en Mili unidades) para J27 fue de 182, para J24 con 137.64, J23 con 35.67 y J25 con 13.66, las cuales

pueden relacionarse con una mayor actividad acidificante, los que concuerda con los datos obtenidos en pH y acidez de la cepas evaluadas. Como es de esperarse, a mayor concentración de ácido láctico, el pH desciende. La producción de ácido láctico por parte de las BAL se ha atribuido a su capacidad de hidrolizar los carbohidratos durante la glucólisis, la cual está ligada a la enzima β -galactosidasa necesaria para hidrolizar la lactosa en galactosas y glucosa (Hidalgo *et al.*, 2005). La disminución de pH y producción de ácido láctico puede variar al modificar las condiciones de fermentación (tiempo de incubación, temperatura y tipo de cepa).

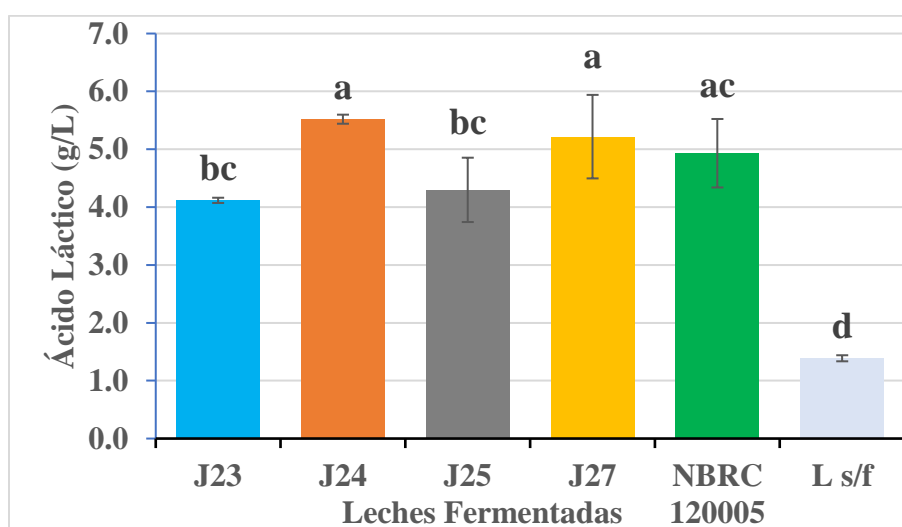


Figura 6. Concentración de ácido láctico (g/L) leches fermentadas a las 48 h de incubación por cepas de *Limosilactobacillus* spp., y *Lactiplantibacillus* spp. Los resultados muestran la media \pm DE (n=3). Literales diferentes indican diferencia ($p < 0.05$) entre leches fermentadas.

La figura 7 muestra los grupos amino libres, expresada en $\mu\text{g/mL}$ a las 48 h. La cepa de *L. brevis* usada como testigo positivo, mostró una mayor hidrólisis en leche fermentada que las otras cepas. La leche fermentada con la cepa J27 presentó un mayor grado de hidrólisis seguida de J24, J23 y J25.

No se presentaron diferencias significativas entre las leches fermentadas por J23 y J25; sin embargo, estas fueron significativamente inferiores a los valores encontrados en el resto de las leches fermentadas. La proteólisis es la degradación de proteínas mediante enzimas específicas llamadas peptidasas o por medio de degradación intracelular (Hidalgo-Morales *et al.*, 2005). El sistema proteolítico de dichas BAL tiene proteinasas de amplia especificidad y son capaces de

liberar un gran número de diferentes oligopéptidos (4-8 aminoácidos) (Singh *et al.*, 2014). Se puede observar que hidrólisis de los aminoácidos es una propiedad cepa dependiente. La capacidad proteolítica de las BAL se ve afectada por las condiciones de fermentación de cada cepa.

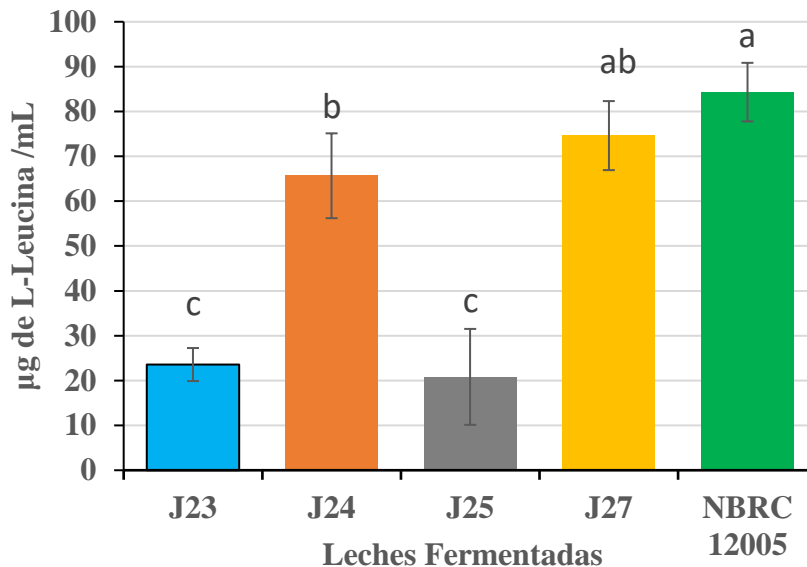


Figura 7. Hidrólisis expresada en µg de L-leucina/mL en leches fermentadas a las 48 h. Los resultados muestran la media ± DE (n=3). Literales diferentes indican diferencia entre leches fermentada ($p < 0.05$).

6.2. Cuenta Viable de BAL

En el cuadro 7 se muestra la cuenta viable en leches fermentadas por las cepas de estudio. Las cepas *Limosilactobacillus fermentum* J24, *Lactiplantibacillus plantarum* J25 y *Lactiplantibacillus pentosus* J27 iniciaron a fermentar en una concentración de 10^6 UFC/mL, a excepción de *Lactiplantibacillus plantarum* J23 que inició a una concentración de 10^7 UFC/mL. Se observó que las cepas aumentaron su concentración hasta 2 logaritmos, con excepción de la leche fermentada con la cepa de *Lactiplantibacillus pentosus* J23 que solo incrementó un ciclo logarítmico. La cepa testigo positivo inició con una concentración celular de 10^7 UFC/mL y alcanzó una concentración de 10^9 UFC/mL.

Cuadro 7. Cuenta viable de BAL en leche fermentada por las cepas de estudio a las 0 y 48 h de incubación.

Leche fermentada	Concentración celular (UFC/mL)	
	0 h	48 h
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> J23	1.76E+07	3.38E+08
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> J24	1.24E+06	8.40E+07
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> J25	2.28E+06	1.53E+08
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> J27	1.70E+06	2.22E+08
<i>Levilactobacillus brevis</i> NBRC 12005	1.74E+07	1.61E+09

UFC: Unidades Formadoras de Colonia.

6.3. Determinación de la Actividad de la Enzima GAD

Los resultados de la prueba colorimétrica para la detección de la actividad de la enzima GAD de cada una de las cepas de estudio se muestran en la Figura 8. Los cultivos tratados con la solución GAD mostraron un cambio de color de amarillo a azul o verde similar a la bacteria testigo positivo, lo que demuestran la actividad de la enzima GAD. Los resultados de color (CIELAB) de L, a, b, se muestran en el cuadro 9. El ángulo de matiz fueron de 175.5° para J27, 171.1° para J25, 167.2° para J24 y de 163.3° para la cepa J23, menores que la cepa testigo *Levilactobacillus brevis* NBRC 12005 con un ángulo de matiz de 223°.

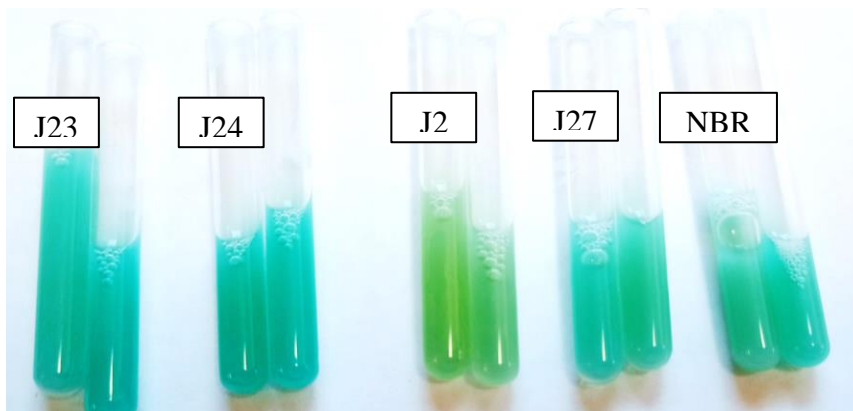


Figura 8. Determinación de la actividad de la enzima GAD por cepas de *Limosilactobacillus* spp., y *Lactiplantibacillus* spp.

Los valores del ángulo de matiz (Θ HUE) de cada cepa, se visualizan en la esfera de color en donde se localizaron los ángulos de cada una de las muestras evaluadas (Figura 9).

Cuadro 8. Valores de L, a, b, y ángulo de Θ HUE, del ensayo colorimétrico.

Bacteria	Valores del espacio de color			
	L*	a*	b*	Θ Hue
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> J23	38.83	-13.97	4.18	163.3
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> J24	36.15	-14.18	3.22	167.2
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> J25	42.10	-14.28	2.24	171.1
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> J27	41.04	-13.56	1.06	175.5
<i>Levilactobacillus brevis</i> NBRC 12005	40.19	-10.52	-9.80	223.0

L*=luminosidad (100: blanco, 0: negro), a*=coordenadas de rojo/verde (+ a indica rojo, - a indica verde), b*= coordenadas amarillo/azul (+b =indica amarillo, -b =indica azul).

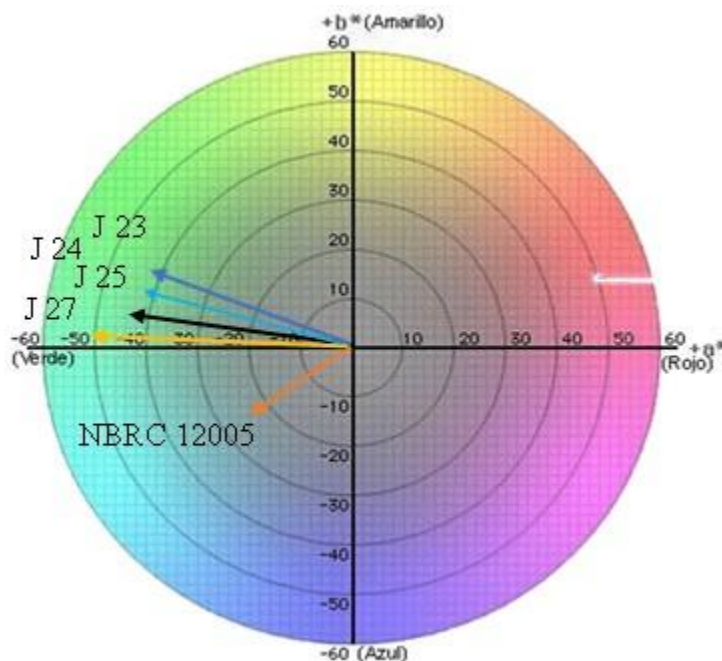


Figura 9. Esfera de localización de color de las cepas de estudio.

Las cepas de estudio se encuentran en el cuadrante 2 de la esfera de color, a excepción de la cepa testigo positivo que se encuentra en el cuadrante 3.

6.4. Cuantificación de Ácido Gamma Aminobutírico y Ácido Glutámico

En la Figura 10 se muestra un cromatograma típico donde se indican los tiempos de retención para GABA a los 12.88 min y para el ácido glutámico a los 5.05 min.

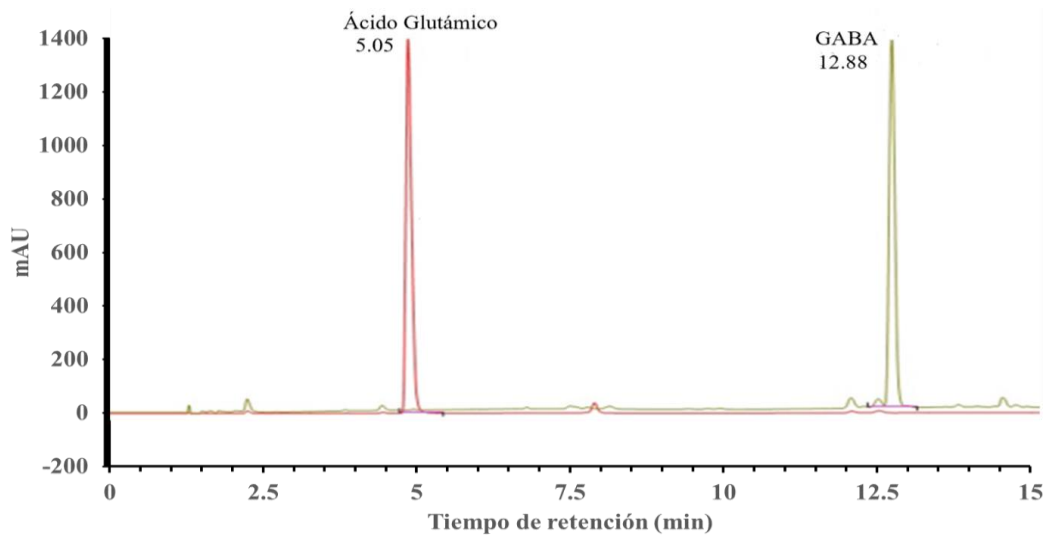


Figura 10. Tiempos de retención de los estándares de GABA y ácido glutámico.

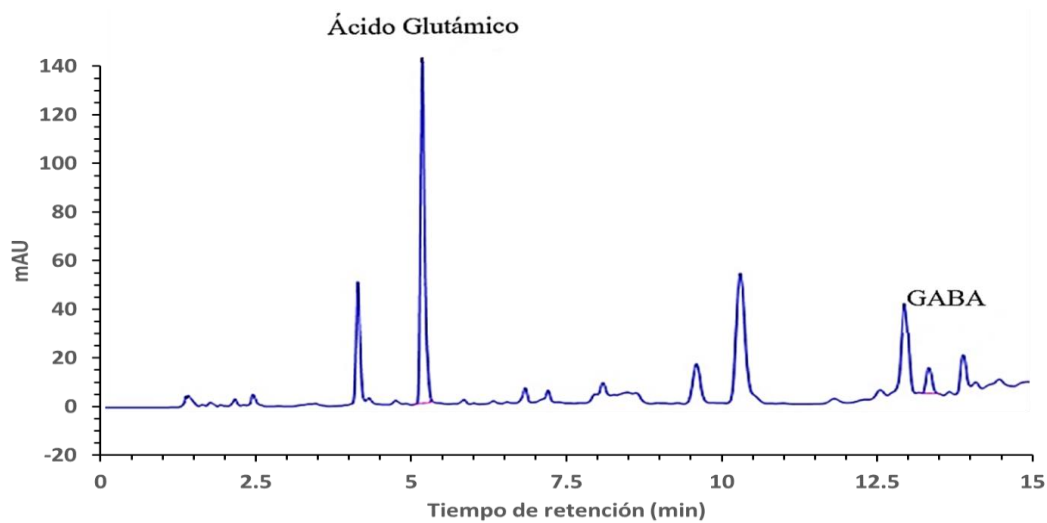


Figura 11. Cromatograma típico para la identificación y cuantificación de GABA y ácido glutámico en leche fermentada por *Limosilactobacillus fermentum* J23, a las 48 h de incubación.

Se realizó una curva de calibración para la cuantificación de cada analito de interés (Anexo 1). La concentración de ácido glutámico en leche fermentada por las cepas de estudio se encontraron en un rango de 13.38 a 36.43 $\mu\text{g/mL}$; mientras que en la leche sin fermentar este fue de 23.33 $\mu\text{g/mL}$, lo que contrasta con lo reportado en estudios previos con 7.57 $\mu\text{g/mL}$ (USDEC, 2018). La Figura 12 muestra la concentración de ácido glutámico de cada una de las leches fermentadas.

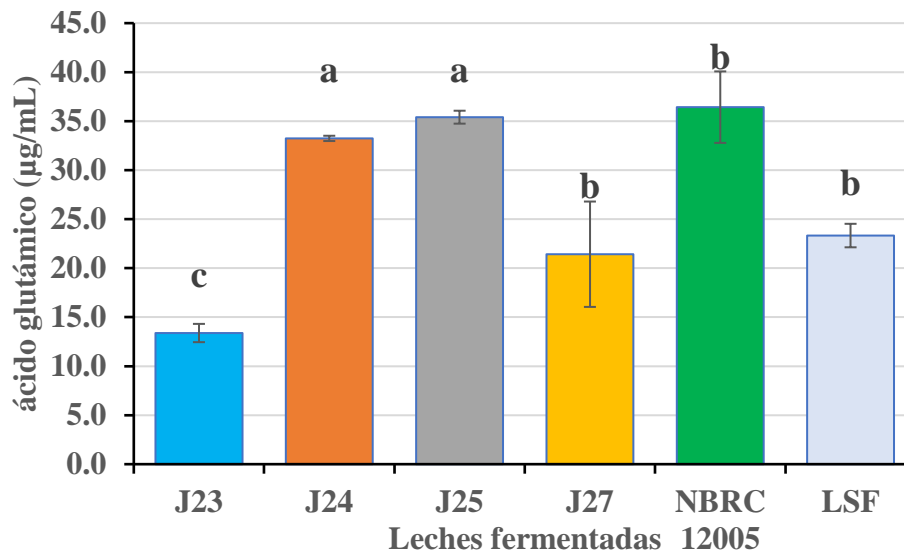


Figura 12. Concentración de ácido glutámico en leches fermentadas por cepas de *Limosilactobacillus* spp., y *Lactiplantibacillus* spp., a las 48 h de incubación. Los resultados muestran la media \pm DE (n=3). Diferentes literales muestran diferencias entre leches fermentadas ($p < 0.05$).

La concentración de GABA en las leches fermentadas por las cepas de estudio se muestra en la Figura 13. La leche fermentada por la cepa J25 mostró una concentración de 7.71 $\mu\text{g/mL}$, seguido de la cepa J27 con 3.41 $\mu\text{g/mL}$, quienes presentaron los valores más altos, seguido de la leche fermentada con la cepa J23 (2.91 $\mu\text{g/mL}$) y J24 (2.71 $\mu\text{g/mL}$). Las leches fermentadas por las cepas de estudio, incluyendo la cepa testigo, presentaron una concentración mayor de GABA que LSF; sin embargo, solo J25 y J27 fueron significativamente superiores a LSF ($p < 0.05$).

Los ensayos de correlación de Pearson (r) entre el ácido glutámico y el GABA fue de $r = -0.66$, con un valor de $p = 0.048$. La cepa que presentó mayor correlación fue la J25 con un coeficiente $r = -0.99$ y un valor de $p = 0.016$. El resto de las cepas, de manera particular correlación negativa ($p > 0.05$).

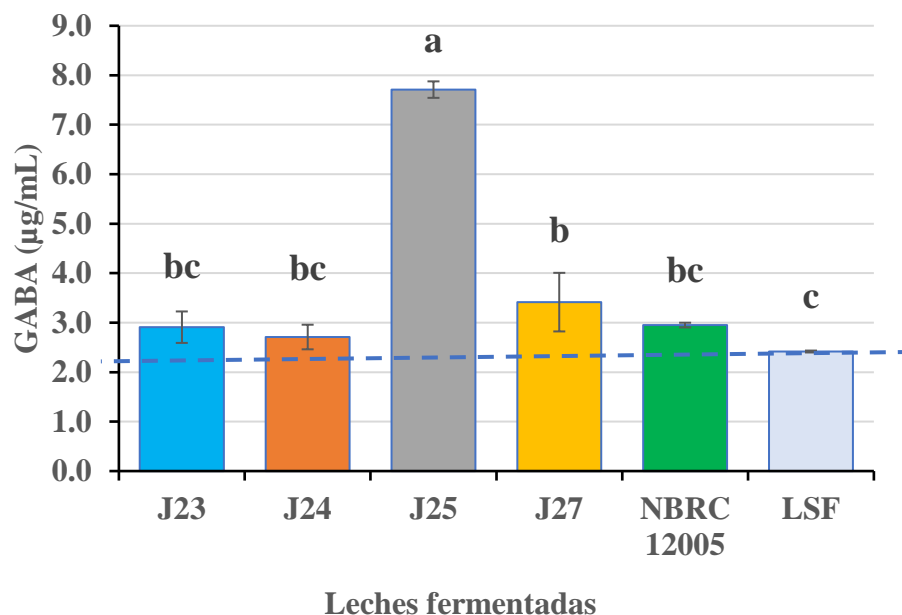


Figura 13. Concentración de GABA en leche fermentada por cepas de *Limosilactobacillus* spp., y *Lactiplantibacillus* spp., a las 48 de incubación. Los resultados muestran la media \pm DE (n=3). Diferentes literales muestran diferencias entre leches fermentadas ($p < 0.05$).

Los datos obtenidos muestran que las cepas con menor concentración de ácido glutámico son las que utilizaron este aminoácido para la producción de GABA. La capacidad de generar GABA se debe principalmente a la actividad de la enzima GAD la cual depende del pH, la cantidad de ácido glutámico presente y el cofactor de PLP en la muestra. Estas cepas estarían optando por otros mecanismos de defensa como las proteínas de choque térmico, la bomba de protones, sistema de deiminación de arginina (ADI) o del aspartato, modificaciones a su membrana celular, o por la acumulación de trealosa (Guan & Liu, 2019).

Algunos estudios mencionan que existe una mutación genética que inhibe la actividad de la enzima GAD, y por tanto se inhibe la producción de GABA en BAL (Nomura *et al.*, 2000). Manzanarez y colaboradores (2016) mencionan que esta mutación se debe a una inserción de una base de tiamina en lugar de una base de adenina lo que provoca mutaciones en el fragmento al no poseer la región que codifica los genes gadCB por parte de las BAL y por consiguiente la proteína no es funcional (Nomura *et al.*, 2000).

6.5. Cuantificación de Vitaminas del Complejo B

Las curvas de calibración para la determinación de las vitaminas se muestran en el Anexo II. Los resultados de la cuantificación de vitaminas en leches fermentadas por las cepas de estudio se observan en la Cuadro 9.

Cuadro 9. Concentración de vitaminas ($\mu\text{g/g}$) del complejo B en leches fermentadas.

	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> J23	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> J24	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> J25	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> J27
B1	0.12 ± 0.01^{bc}	0.10 ± 0.01^c	0.21 ± 0.03^b	1.28 ± 0.10^a
B2	0.95 ± 0.14^c	0.86 ± 0.12^c	1.26 ± 0.17^b	1.68 ± 0.08^a
B3	3.75 ± 0.23^c	13.11 ± 1.45^a	9.36 ± 0.92^b	14.42 ± 1.49^a
B6	2.04 ± 0.20^{bc}	4.03 ± 0.60^a	2.50 ± 0.07^b	1.67 ± 0.15^c
B9	0.14 ± 0.04^b	ND	0.23 ± 0.02^a	0.22 ± 0.03^a
B12	2.06 ± 0.01^c	2.15 ± 0.14^c	6.97 ± 0.27^a	5.81 ± 0.71^b

Los resultados muestran la media \pm DE (n=3). Diferentes literales por fila muestran diferencia entre leches fermentadas ($p < 0.05$). ND: no detectado.

La leche sin fermentar presentó concentraciones de las vitaminas B2 y B3 a razón de $0.70 \mu\text{g/g}$ y $0.57 \mu\text{g/g}$, respectivamente, pero no hubo presencia de las vitaminas B1, B6, B9 y B12. En parte, esto podría ser atribuido a que la leche se sometió a un tratamiento térmico ($80 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min) y a enfriamiento rápido (Czarnowska *et al.*, 2021). La concentración de B1 se encontró en un rango de 0.10 a $1.28 \mu\text{g/g}$ en las leches fermentadas. La concentración de B2 se encontró en un rango de 0.85 a $1.68 \mu\text{g/g}$. Las leches fermentadas por las cepas J27 y J25 presentan la mayor concentración siendo de 1.68 y $1.26 \mu\text{g/g}$, respectivamente. En un estudio de Gurú y colaboradores (2013) reportaron concentraciones de $2.41 \mu\text{g/g}$ de B2 en leche fermentada por 7 días con *L. acidophilus* a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $2.15 \mu\text{g/g}$ al fermentar con *L. lactis* en suero de leche por 9 días a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

La concentración de B3 se encontró en un rango de 3.75 a $14.43 \mu\text{g/g}$, siendo mayor para la leche fermentada con la cepa J27. Considerando que la leche en polvo sin fermentar contiene $9.51 \mu\text{g/g}$, solo en las leches fermentadas por las cepas J24 y J27 presentaron concentraciones mayores. Respecto a B6, las concentraciones fueron desde 1.67 a $4.03 \mu\text{g/g}$ encontrando mayor concentración en la leche fermentada con la cepa J24. Estos resultados son concentraciones

mayores a las reportadas por Khromova y colaboradores (2022) de 2.865 $\mu\text{g/g}$ y 9.46 $\mu\text{g/g}$ para *L. plantarum* VKPM B-11007 y *L. casei* VKPM B-2873, respectivamente.

Para la vitamina B9, las concentraciones estuvieron en un rango de 0.13 a 0.22 $\mu\text{g/g}$, donde las leches fermentadas con las cepas J25 y J27 fueron las que presentaron la mayor concentración con valores de 0.22 $\mu\text{g/g}$. Las leches fermentadas por las cepas de estudio mostraron concentraciones de la vitamina B12 en un rango de 2.06 a 6.97 $\mu\text{g/g}$, siendo la leche fermentada con la cepa J25 la que presentó la mayor concentración. La concentración encontrada en las leches fermentadas fueron mayores a la leche sin fermentar que fue de 0.04 $\mu\text{g/g}$ y a las reportadas por Li y colaboradores (2017) con 0.21 $\mu\text{g/g}$ y 0.13 $\mu\text{g/g}$ para *L. plantarum* LZ95 y *L. plantarum* CY2, respectivamente.

Las leches fermentadas con la cepa J27 mostraron la mayor concentración de vitaminas B1, B2 y B3 con valores de 1.29, 1.68 y 14.42 $\mu\text{g/g}$, respectivamente; mientras que la leche fermentada con la cepa J24 presentó mayor concentración de vitamina B6 con 4.03 $\mu\text{g/g}$ y la leche fermentada con J25 presentó mayor concentración de vitamina B9 (0.237 $\mu\text{g/g}$) y B12 (6.97 $\mu\text{g/g}$). Los hallazgos obtenidos en nuestro estudio muestran el potencial que pueden tener las bacterias para producir vitaminas durante el proceso de fermentación.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se encontró que las cepas de estudio presentaron concentraciones de 7-8 Log UFC/mL en leches fermentadas durante 48 h, con una capacidad fermentativa caracterizada por una alta producción de ácido láctico y, particularmente J24 y J27, mostraron la mayor producción de grupos amino libres. Las cepas de estudio fueron positivas a la actividad de la enzima GAD, no obstante, la concentración de GABA fue 2.71-7.71 µg de GABA/mL. Las leches fermentadas con *Lactiplantibacillus plantarum* J25 y *Lactiplantibacillus pentosus* J27 se destacaron por la producción de vitaminas del complejo B. Estos hallazgos confirman la capacidad por las BAL de estudio de biosintetizar metabolitos de interés científico y tecnológico durante la fermentación láctica, que podrían participar en diferentes bioactividades con potenciales beneficios a la salud.

8. REFERENCIAS

- Aguilar-Toalá E. J. 2019. Metabolitos Intracelulares de *Lactobacillus casei* CRL 431 contra el estrés oxidativo inducido por aflatoxina B₁ (Tesis Doctoral). CIAD. A. C. Hermosillo, Sonora.
- Albano C., Silvetti T., Brasca M. 2020. Screening Of Lactic Acid Bacteria Producing Folate And Their Potential Use As Adjunct Cultures For Cheese Bio-Enrichment. *FEMS Microbiology Letter* 367(9):1-59
- Anggraini L., Marlida Y., Wizna W., Jamsari J., and Mirzah M. 2019. Optimización De Medio Nutritivo Para *Pediococcus acidilactici* DS15 Para Producir GABA. *Journal of World's Poultry Research* 9(3):139–146.
- AOAC (2012) 947.5: Volumetría Destinada Para La Cuantificación De Acidez Titulable En Leche.
- Araújo J. R., Martel F., Borges N., Araújo J. M., and Keating E. 2015. Folates and Aging: Role in Mild Cognitive Impairment, Dementia and Depression. *Ageing Research Review* 22(1): 9-19.
- Asarát M., Apostolopoulos V., Vasiljevic T. 2015. Short-Chain Fatty Acids Produced By Synbiotic Mixtures In Skim Milk Differentially Regulate Proliferation And Cytokine Production In Peripheral Blood Mononuclear Cells. *International Journal of Food Science and Nutrition* 66(1):755–765
- Averianova L. A., Balabanova L. A., Son O. M., Podvolotskaya Anna B., Tekutyeva Liudmila A. 2020. Production of Vitamin B2 (Riboflavin) By Microorganisms: An Overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8(570828):1-23.
- Auteri M., Grazia Z. M., Serio R. 2015. GABA and GABA Receptors in the Gastrointestinal Tract: From Motility to Inflammation. *Pharmacological Research* 93(1):11-21
- Bailey L., B., Stover P. J., McNulty H., Fenech M. F., Gregory J. F., Mills J., Pfeiffer C. M., 2015. Biomarkers of Nutrition for Development- Folate Review. *The Journal of Nutrition* 145(1):1636S–80S
- Beltrán Castro J. A., (2017). Selección De Bacterias Ácido Lácticas Productoras De Ácido Gamma-Aminobutírico Aisladas Del Queso Crema De Chiapas (Tesis Doctoral). Ingeniería En Industrias Alimentarias. Tecnológico Nacional De México. Sinaloa, México.
- Brouwer B. E. M, Dhonukshe R. R., Van W. J. P., Zwaluw N. L. 2015. Dietary Sources of Vitamin B-12 and Their Association with Vitamin B-12 Status Markers in Healthy Older Adults in the B-PROOF Study. *Nutrients* 7(1): 7781-7797.
- Burgess C., O'Connell-Motherway M., Sybesma W., Hugenholtz J. And Van Sinderen D. 2004. Riboflavin Production in *Lactococcus Lactis*: Potential For In Situ Production of Vitamin-Enriched Foods. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10):5769.
- Calderón O. C. A., Nava M. M. O. B. 2020. Vitamins in the Nervous System: Current Knowledge of the Biochemical Modes of Action and Synergies of Thiamine, Pyridoxine, and Cobalamin. *CNS Neuroscience and Therapy* 26(1): 5-13.

- Calderón O. C. A., Franco G. H. G., Leal M. F., Orozco V. A. H., Plascencia P. S., Sánchez M. J. H. 2022. Clinical Use of Neurotropic B Vitamins in Diseases of the Peripheral Nervous System in Mexico and Central America. *Med. Int. Méx.* 38 (4): 887-902.
- Carrizo S. L., Montes De Oca, C. E., Hebert, M. E., Saavedra, L., Vignolo, G., Leblanc, J. G. And Rollan, G. C. 2017. Lactic Acid Bacteria from Andean Grain Amaranth: A Source of Vitamins and Functional Value Enzymes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 27(1); 289-298.
- Caycedo L. L., Corrales R. L. C., Trujillo S. D. M. 2020. Las Bacterias, Su Nutrición Y Crecimiento: Una Mirada Desde La Química. *NOVA.* 19(36): 49-94
- Chibuike N. A., Onwuakor C. E., Aguiyi J. C., Ifeanyi V O., Godspower O. C., Peter O. C., Garos K E., Egbere J. O. 2019. Screening Of Some Lactic Acid Bacteria Isolated From Selected Nigerian Fermented Foods For Vitamin Production. *Advances in Microbiology* 9(1): 943-955
- Combs Gerald F. 2012. The Vitamins: Chapter 1 - What Is a Vitamin? Editor(S): Gerald F. Combs. Academic Press, (Fourth Edition). Cornell University, Ithaca, NY. Pág. 3-6
- Crittenden R.G., Martinez N.R., Playne M.J. 2003. Synthesis and Utilization of Folate by Yoghurt Starter Cultures and Probiotic Bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80 (1):217- 222
- Cucick A., Gianni K., Todorov, S.D., De Leblanc, A.M., Leblanc, J.G. 2020. Evaluation of the Bioavailability and Intestinal Effects of Milk Fermented By Folate Producing Lactic Acid Bacteria in a Depletion/Repletion Mice Model. *Journal of Functional Foods* 66(1):1-10.
- Corrales L., Ávila. S., Estupiñán. M., 2013. *Bacteriología Teoría Y Práctica.* Bogotá- Colombia: Editorial Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca.
- Czarnowska-Kujawska, M., Paszczyk, B. 2021. Changes In The Folate Content And Fatty Acid Profile In Fermented Milk Produced With Different Starter Cultures During Storage. *Molecules* 26 (606): 1-13.
- Deng Z., Li D., Yan X., Lan J., Han D., Fan K., Chang J., Ma Y. 2023. Activation Of GABA Receptor Attenuates Intestinal Inflammation By Modulating Enteric Glial Cells Function Through Inhibiting NF-Kb Pathway. *Life Sciences* 5(1):329-121984
- Di Cagno R., Mazzacane F., Giuseppe C., De Angelis M., Giuliani G., Meloni M., De Servi B., Gobbetti M., 2010. Synthesis Of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) By *Lactobacillus Plantarum* DSM19463: Functional Grape Must Beverage And Dermatological Applications. *Applied Microbial and Cell Physiology* 86(1): 731-741
- Diamond D., Lau K. T., Brady, S., Cleary, J. 2008. Review "Integration of Analytical Measurements and Wireless Communications-Current Issues and Future Strategies. *Talanta.* 75 (3): 559-606.
- Diana M., Quílez, J., and Rafecas, M. 2014. Gamma-Aminobutyric Acid as a Bioactive Compound in Foods: A Review. *In Journal of Functional Foods* 10 (1): 407–420.
- Farhan S. M., Haroon S. M, Sarwar M., 2021. Chapter 5: Deficiency of Vitamin B-Complex and Its Relation with Body Disorders. Tomado De Leblanc Jean Guy. B-Complex Vitamins - Sources, Intakes and Novel Application. *Intechopen.* ISBN: 9 78-1-83969-798-2

- Fernández F, L., Figueras S. A., Carnet G. C., Valls A. M., Rodríguez C. A. C., 2015. Niacina. Aspectos Esenciales. *Revista Información Científica* 90 (2); 401-414
- Fusco V., Quero G. M., Cho G. S., Kabisch J., Meske D. Neve, H. F. 2015. The Genus *Weissella*: Taxonomy, Ecology and Biotechnological Potential. *Frontiers in Microbiology* 6:1-22
- George F., Daniel C., Thomas M., Singer E., Guilbaud A., Tessier F. J., Revol J., Borges F., And Foligné B. 2018. Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *In Frontiers In Microbiology* 9 (1): 2899-2907
- González C. F. A., Torres Ll. M. J., Rodríguez F. J. C., Espinosa De Los Monteros J. J., García And B. H. S. Vallejo C. V. 2011. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity in Milks Fermented By *Lactobacillus* Strains. *Cyta - Journal of Food* 9 (2): 146-151.
- Greppi A., Hemery Y., Berrazaga I., Almaksour Z., Humblot C. 2017. Ability Of Lactobacilli Isolated From Traditional Cereal-Based Fermented Food To Produce Folate In Culture Media Under Different Growth Conditions. *LWT - Food Science and Technology*. 18(1): 277-284
- Guru V. And Viswanathan K. 2013. Riboflavin Production in Milk Whey Using Probiotic Bacteria-*Lactobacillus Acidophilus* and *Lactococcus Lactis*. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Science* 3(4): 169-176
- Guan Ningzi and Liu Long. 2020. Microbial Response to Acid Stress: Mechanisms and Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(1):51–65
- Han, S. H., Hong K. B., Suh, H. J., 2017. Biotransformation of Monosodium Glutamate to Gamma-Aminobutyric Acid by Isolated Strain *Lactobacillus Brevis* L-32 for Potentiation of Pentobarbital-Induced Sleep in Mice. *Food Biotechnology* 31(1): 80–93.
- Herrera A., Orrego D, Bejarano L. A. F., Klotz C. B. 2022. Effect of Heat Treatment on Vitamin Content during the Manufacture of Food Products at Industrial Scale. *Revista DYNA*. 89(223):127-132
- Heredia-Castro P., Méndez-Romero J. I., Hernández-Mendoza A., Acedo-Felix E., González-Córdova A. F., And Vallejo-Córdoba. B. 2015. Antimicrobial Activity And Partial Characterization Of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances Produced By *Lactobacillus Spp.* Isolated From Artisanal Mexican Cheese. *Journal of Dairy Science* 98 (12): 8285–8293.
- Hidalgo M. M., Robles O. V., And Garcia H. S. 2005. *Lactobacillus Reuteri* B-Galactosidase Activity and Low Milk Acidification Ability. *Canadian Journal of Microbiology* 51(3): 261–267.
- Homayouni R. A., Yari K. A., Khalili M., Jafarzadeh S., 2016. Folate Bio-Fortification of Yoghurt and Fermented Milk: A Review. *Dairy Science and Technology* 96(1):427 - 441
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., and Sansawa, H. 2003. Blood-Pressure-Lowering Effect Of A Novel Fermented Milk Containing Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) In Mild Hypertensive. *European Journal of Clinical Nutrition* 57(1): 490–495.
- Juárez Del Valle M., Laiño J. E., De Giori G. S., Leblanc J. G. 2014. Riboflavin Producing Lactic Acid Bacteria as a Biotechnological Strategy to Obtain Bio-Enriched Soymilk. *Food*

- Jong P. S., Hyun K. D., Jee K. H., Shin M., Yang S. Y., Yang J., Hoon J. Y. 2020. Enhanced Production Of Γ -Aminobutyric Acid (GABA) Using *Lactobacillus plantarum* EJ2014 With Simple Medium Composition. *Food Science and Technology* 23(6438):1-7
- Karimian E., Moayedi A., Khomeiri M., Aalami M., Sadeghi Mahoonak S. 2020. Application Of High-GABA Producing *Lactobacillus Plantarum* Isolated From Traditional Cabbage Pickle In The Production Of Functional Fermented Whey-Based Formulate. *Journal of Food Measurement and Characterization* 1(1): 1-9
- Khanlari Z., Moayedi A., Ebrahimi P., Khomeiri M., and Sadeghi A. 2021. Enhancement Of Γ -Aminobutyric Acid (GABA) Content In Fermented Milk By Using *Enterococcus Faecium* And *Weissella Confusa* Isolated From Sourdough. *Journal of Food Processing and Preservation* 45:1-10.
- Khromova, N.Y.; Epishkina, J.M.; Karetkin, B.A.; Khabibulina, N.V.; Beloded, A.V.; Shakir, I.V.; Panfilov, V.I. 2022. The Combination of in Vitro Assessment of Stress Tolerance Ability, Auto aggregation, Vitamin B-Producing Ability for New Probiotic Strain Introduction. *Microorganisms* 10(470): 1-16
- Ko C. Y., Lin, H. T. V., and Tsai, G. J. 2013. Gamma-Aminobutyric Acid Production in Black Soybean Milk by *Lactobacillus Brevis* FPA 3709 and the Antidepressant Effect of the Fermented Product on a Forced Swimming Rat Model. *Process Biochemistry* 48 (4): 559–568.
- Komatsuzaki N., Nakamura T., Toshinori K., Shima J., 2008. Characterization of Glutamate Decarboxylase from a High Gamma- Aminobutyric Acid (GABA)-Producer, *Lactobacillus paracasei*. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry* 72(2): 278-285
- Komatsuzaki N., Shima J., Kawamoto S., Momosed H., Kimura T., 2005. Production Of G-Aminobutyric Acid (GABA) By *Lactobacillus paracasei* Isolated From Traditional Fermented Foods. *Food Microbiology* 22 (1) 497–504.
- Kozyraki R, And Cases O. 2013. Vitamin B12 Absorption: Mammalian Physiology and Acquired and Inherited Disorders. *Biochimie*. 95(5):1002-1007.
- Laiño J. E., Juárez Del Valle M., Savoy De Giori G., Leblanc J. G. J. 2014. Applicability of a *Lactobacillus Amylovorus* Strain as Co-Culture for Natural Folate Bio-Enrichment of Fermented Milk. *International Journal of Food Microbiology* 191 (2014):10-16
- Leblanc J. G., De Giori G. S., Smid E. J., Hugenholtz J., And Sesma F. 2007. Folate Production by Lactic Acid Bacteria and Other Food-Grade Microorganisms. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* 1(1):329-339
- Leblanc J. G., Laiño J. E., Del Valle M. J., Vannini V., Van Sinderen D., Taranto M. P., Sesma F. 2011. B-Group Vitamin Production by Lactic Acid Bacteria - Current Knowledge and Potential Applications. *Journal of Applied Microbiology* 111 (6), 1297–1309.
- Le Vo T. D., Kim T. W., and Hong S. H. 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.
- Levit R., Savoy De Giori G., De Moreno A., Leblanc, J. G., 2018. Protective Effect of the

Riboflavin-Overproducing Strain *Lactobacillus Plantarum* CRL 2130 on Intestinal Mucositis in Mice: Riboflavin Overproducing Strain Vs Intestinal Mucositis. *Nutrition* 54 (1):165-172

- Levit R., Savoy De Giori G., De Moreno A., Leblanc J. G. 2021. Recent Update on Lactic Acid Bacteria Producing Riboflavin and Folate: Application for Food Fortification and Treatment of Intestinal Inflammation. *Journal of Applied Microbiology* 130 (5): 1412–1424.
- Li P., Gu Q., Yang L., Yu Y., Wang Y., 2017. Characterization of Extracellular Vitamin B12 Producing *Lactobacillus Plantarum* Strains and Assessment of the Probiotic Potentials. *Food Chemistry* 1(1): 1-35
- Lim H. S., Cha In-Tae, Woon R. S., Shin Hae-Hun, And Seo Myung-Ji. 2017. Enhanced Production Of Gamma-Aminobutyric Acid By Optimizing Culture Conditions Of *Lactobacillus Brevis* HYE1 Isolated From Kimchi, A Korean Fermented Food. *Journal Microbiology and Biotechnology* 27(3): 450-459
- Lin M.Y and Young C.M. 2000. Folate Levels in Cultures of Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal* 10 (1): 409-413
- Livia Alm. 1982. Effect of Fermentation on B-Vitamin Content of Milk in Sweden. *Journal of Dairy Science* 65 (3): 353-359
- Lu X., Xie C., and Gu Z. 2009. Optimization of Fermentative Parameters for GABA Enrichment by *Lactococcus lactis*. In *Czech Journal of Food Science* 27(6): 433-442.
- Ly D., Mayrhofer S., Yogeswara I. B. A., Nguyen T. H., And Domig K. J. 2019. Identification, Classification and Screening for Γ -Amino-Butyric Acid Production in Lactic Acid Bacteria from Cambodian Fermented Foods. *Biomolecules* 9(12): 1-16
- Maldonado G. M. C., Cazorla S. I., Balcells M. F., Martínez M. M. J., Lemme D. J. M., Perdigón G. 2020. Consumo De Leches Fermentadas Probióticas Y Su Impacto Sobre El Sistema Inmune, Capítulo 4. En: Ferrari, Alejandro; Gabriel Vinderola; Ricardo Weill. *Alimentos Fermentados: Microbiología, Nutrición, Salud Y Cultura*. Instituto Danone Del Cono Sur. Argentina. 94-115
- Mahara F. A., Nuraida L., Nuryani Lioe H., 2021. Folate in milk fermented by Lactic Acid Bacteria from different food sources. *Prevent Nutrition Food Science*. 26(2): 230–240.
- Manzanarez Q. C., García R. J., Beltrán B. L., Torres L. M., Mazonra M. M., Hernández M. A. And González C. A. and Vallejo C. B. 2023. Novel peptides in fermented milk with specific *Lactobacillus* strains potential antiobesity effect: In vitro and in silico analysis. *ACS Food Science and Technology* 3(3):428-438.
- Montgomery S. C., Williams, C. M. And Maxwell, P. J. 2015. Nutritional Support of Patient with Inflammatory Bowel Disease. *Surgery Clinic* 95(1): 1271-1279.
- Martínez G. M. J, Melián F. C., Romeo D. M. 2016. Nutrición En Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. Nutrition Hospitalary* 33(4): 1699-5198
- Melini F., Melini V., Luziatelli F., Ficca A. G. And Ruzzi M. 2019. Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-To-Date Systematic Review. *Nutrients* 11(1189): 2-24
- National Academies Press (US). (1998). *Dietary Reference Intakes For Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, And Choline*. Institute

Of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and Its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. Washington (DC)

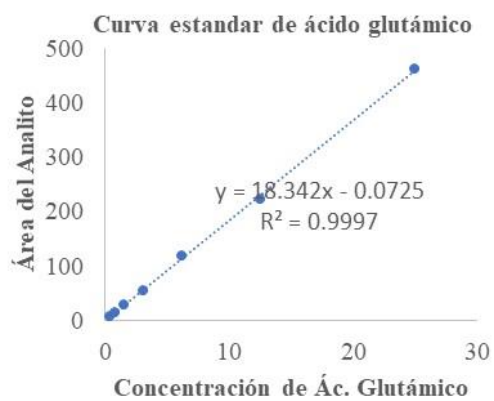
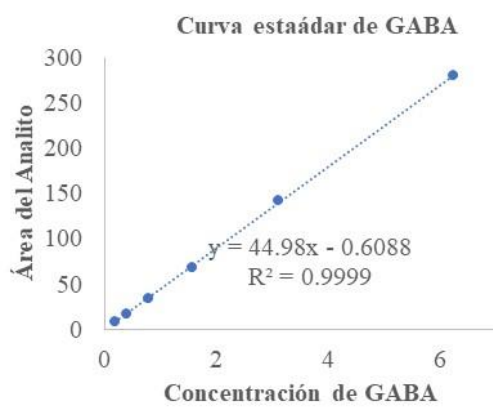
- Nomura M., Kobayashi M., Ohmomo S., Okamoto T. 2000. Inactivation of the Glutamate Decarboxylase Gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. American Society for Microbiology 66 (5): 2235–2237.
- Oraei M., Razavi S. H., and Khodaiyan F. 2018. Optimization of effective minerals on riboflavin production by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051 Using Statistical Designs. Avicenna Journal Medical Biotechnology 1, 49–55
- Parvez K.A. Malik S. Ah Kang H. Y. Kim. 2006. Probiotics And Their Fermented Food Products Are Beneficial For Health. Journal of Applied Microbiology. 100(6): 1171–1185.
- Pegah H., Abbas A. S., Sedigheh M., and Farzaneh H., 2018. Production of Vitamins B3, B6 and B9 by *Lactobacillus* Isolated From Traditional Yogurt Samples from 3 Cities in Iran. Applied Food Biotechnology 5 (2):107-120
- Pellegrino, L., Masotti, F., Cattaneo, S., Hogenboom, J.A., De Noni, I. (2013). Nutritional Quality of Milk Proteins. In: Mcsweeney, P., Fox, P. (Eds) Advanced Dairy Chemistry. Springer, Boston, MA. Pág. 515–538
- Pérez V. D., Teran M. D. M., Savoy De G. G., Leblanc J. G., De Moreno De Leblanc A. 2022. Neuroprotective effect of riboflavin producing lactic acid bacteria in Parkinsonian Models. Neurochemistry Research 47(5): 1269-1279
- Pihlanto Leppälä, A. 2001. Bioactive Peptides Derived From Bovine Whey Proteins: Opioid and Ace-Inhibitory Peptides. Review. Trends Food Science and Technology 11(9-10): 347-56
- Raux A. E., Schubertb H. L. And Warrena M. J. 2000. Biosynthesis of Cobalamin (Vitamin B12): A Bacterial Conundrum. Cellular and Molecular Life Sciences. 57(2000): 1880-1893
- Radionov D. A, Vitreschak A. G, Mironov A. A, Gelfand M. S. 2002. Comparative Genomics of Thiamin Biosynthesis in Prokaryotes. New Genes and Regulatory Mechanisms. Journal of Biological Chemistry 277(50): 48949-48959.
- Reyes-Díaz A, Mata-Haro V, Hernández-Hernández J., González-Córdova A. F., Hernández M. A., Reyes-Díaz R., Torres-Llanes M. J., Beltrán-Barrientos L. M. and Vallejo C. B. 2018. Milk fermented by specific *Lactobacillus* strains regulates the serum levels of IL-6, TNF- α and IL-10 cytokines in a LPS-stimulated murine model. Nutrients 10(691): 1-15
- Reyes-García M. G., Hernández-Hernández F., Hernández-Téllez B., García-Tamayo F. 2007. GABA_(A) Receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulate their IL-6/IL-12 production. Journal of Neuroimmunology 188 (2007) 64–68
- Ribeiro S. C., Domingos M. F. P., Stanton C., Ross R. P., and Silva C. C. G. 2018. Production Of -Aminobutyric Acid (GABA) by *Lactobacillus otakiensis* and other *Lactobacillus* sp. isolated from traditional Pico Cheese. International Journal of Dairy Technology. 71 (4): 1012–1017.
- Santiago-López. L., Hernández M. A., Mata H. V., Vallejo C. B., And González C. A. 2018. Immune Response Induced By Fermented Milk With Potential Probiotic Strains Isolated From Artisanal Cócido Cheese. Food and Agricultural Immunology 29(1): 911–929.
- Santos-Espinosa. A., Beltrán B. L. M., Reyes D. R., Mazorra M. M. A., Hernández M. A., González

- A. G. A., Sáyago A. S. G., Vallejo C. B., And González C. A. F. 2020. Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Production In Milk Fermented By Specific Wild Lactic Acid Bacteria Strains Isolated From Artisanal Mexican Cheeses. *Annals Of Microbiology*. 70(12): 1-11.
- Santos Espinosa A. (2019). Producción de ácido Γ -Amino butírico en leches fermentadas por cepas específicas de *Lactobacillus spp.* y *Lactococcus spp.* (Tesis Doctoral). Centro De Investigación En Alimentos Y Desarrollo. Hermosillo. Sonora.
- Santos E. A, Manzanarez Q. C. G., Reyes D. R, Hernández M. A., Vallejo C. B, And González C. A. F. 2018. Ácido Γ -Amino Butírico (GABA) Producido Por Bacterias Ácido Lácticas En Alimentos Fermentados. *Interciencia*. 43(3): 175–181.
- Sánchez-González, D., M. (2015). Impacto De La Fortificación Con Vitaminas Del Complejo B (Tiamina B1, Riboflavina B2, Nicotinamida B3, Ácido Fólico B9) En Harinas De Trigo Y Alimentos Derivados (Tesis Doctoral). Facultad De Ciencias Exactas Y Naturales. Universidad De Buenos Aires.
- Sasaki K., Hatate H., And Tanaka R., 2020. Determination of 13 Vitamin B and the related compounds using HPLC with UV detection and application to food supplements. *Chromatographic* 83(1):839–851
- Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P., 2006. Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71(1): 394–406.
- Shiby V. K.; Mishra, H. N. 2013. Fermented milks and milk products as functional foods: Review. *Critical Review Food Science and Nutrition* 53(1): 482–496.
- Siji Joseph. 2011. Analysis of Water-Soluble Vitamins from Multivitamin Tablets for Nutrition Labeling; Application Note. *Agilent Application Solution 5990 (7950)*: 1-12
- Siragusa S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., and Gobbetti, M. 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.
- Sokovic B. S., Djokic, J., Dinic, M., Veljovic, K., Golic, N., Mihajlovic, S., and Tolinacki, M. 2019. GABA-Producing Natural Dairy Isolate from Artisanal Zlatar Cheese Attenuates Gut Inflammation and Strengthens Gut Epithelial Barrier in Vitro. *Frontiers in Microbiology* 10 (527): 1-13.
- Song H. Y., And Yu R. C. 2018. Optimization of Culture Conditions for Gamma-Aminobutyric Acid Production in Fermented Adzuki Bean Milk. *Journal of Food and Drug Analysis* 26 (1): 74–81.
- Strandwitz P. 2018. Neurotransmitter Modulation by the Gut Microbiota. In *Brain Research* 1693 (B): 128–133.
- Thomas, C.M.; Hong, T.; Van Pijkeren, J.P.; Hemarajata, P.; Trinh, D.V.; Hu, W.; Britton, R.A.; Kalkum, M.; Versalovic, J. 2012. Histamine Derived From Probiotic *Lactobacillus Reuteri* Suppresses TNF Via Modulation Of PKA And ERK Signaling. *Plos ONE* 7(2): 1-15
- Vázquez O. F. A. G. Higuera C. C. I., Hernández G. 1995. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp, *Journal of Liquid Chromatography* 18(10): 2059-2068.
- Wang Y., Wu J., Lv M., Shao Z., Hungwe M., Wang J., Bai X., Xie J., Wang Y., And Geng W.

2021. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9(1): 1-19.
- Widyastuti Y., Rohmatussolihat F. A. 2014. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food and Nutrition Sciences* 5(1):435-442
- Wu, Q., and Shah, N. P. 2017. High Γ -Aminobutyric Acid Production from Lactic Acid Bacteria: Emphasis on *Lactobacillus Brevis* as a Functional Dairy Starter. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57 (17): 3661–3672.
- Vincenzetti S., Pucciarelli S., Santini G., Klimanova Y., Polzonetti V. And Polidori P. 2020. B-Vitamins Determination in Donkey Milk. *Beverages*. 6 (46):1-9
- Xu, N., Wei, L., Liu, J. 2017. Biotechnological advances and perspectives of gamma-Aminobutyric acid production. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33 (64): 33-64.
- Yang, S. Y., Lu Z. X., Lu F. X., Bie X. M., Sun L. J., Zeng X. X. 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, S. Y., Lü F. X., Lu Z. X., Bie X. M. J. Y., Sun L. J., And Yu B. 2008. Production of Γ -Aminobutyric Acid by *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* Y2 under submerged Fermentation. *Amino Acids* 34 (3): 473–478.
- Agung-Yogeswara I. B. A., Maneerat S., and Haltrich D. 2020. Glutamate Decarboxylase from Lactic Acid Bacteria A Key Enzyme in GABA Synthesis. *Microorganisms* 8(12): 1–24.
- Zhang L., Hua Y., Xua Y., Lia P., Maa H., Lib X., Li M. 2019. The Correlation between Intestinal Dysbiosis and the Development of Ankylosing Spondylitis. *Microbial Pathogenesis* 132(1):188-192.

9. ANEXOS

9.1. Curvas Estándar del Ácido Glutámico y GABA



9.2. Curvas Estándar para la Determinación de Vitaminas

